

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

MANEJO FISIOLÓGICO E SANITÁRIO DE PLANTAS DOADORAS DE  
EXPLANTES E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE NOGUEIRA-PECAN

Luciano da Silva Alves  
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração Sistemas de Produção Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Março de 2020

### CIP - Catalogação na Publicação

Alves, Luciano da Silva  
MANEJO FISIOLÓGICO E SANITÁRIO DE PLANTAS DOADORAS  
DE EXPLANTES E ESTABELECIMENTO IN VITRO DE  
NOGUEIRA-PECAN / Luciano da Silva Alves. -- 2020.  
118 f.  
Orientador: Claudimar Sidnei Fior.

Coorientadora: Marília Lazarotto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2020.

1. *Carya illinoensis*. 2. Contaminação microbiana.  
3. Estiolamento. 4. Micropropagação. I. Fior,  
Claudimar Sidnei, orient. II. Lazarotto, Marília,  
coorient. III. Título.

LUCIANO DA SILVA ALVES  
Engenheiro Agrônomo - UFRGS

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **MESTRE EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 27.03.2020  
Pela Banca Examinadora  
(Via videoconferência)

Homologado em: 20.08.2020  
Por

CLAUDIMAR SIDNEI FIOR  
Orientador - PPG Fitotecnia  
de  
UFRGS  
Fitotecnia

CHRISTIAN BREDEMEIER  
Coordenador do Programa  
Pós-Graduação em

MARÍLIA LAZAROTTO  
Coorientadora - UFPel

GILMAR SCHÄFER  
PPG Fitotecnia/UFRGS

DIEGO PASCOAL GOLLE  
UNICRUZ

LIA REJANE SILVEIRA REINIGER  
Departamento de Fitotecnia  
UFSM

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial a minha mãe Neli e minhas irmãs Gabriela e Claudenice, que sempre demonstram seu carinho e apoio em pequenos gestos.

A todos os amigos, visíveis e invisíveis, ambos tão presentes das mais variadas formas, me inspirando e apoiando para a realização desta tarefa.

Ao meu Orientador, Professor Claudimar Sidnei Fior, por me mostrar o rumo da pesquisa na busca de soluções para temas tão relevantes, pela amizade e cordialidade.

A minha Coorientadora, Professora Marília Lazarotto, por ser sempre tão acessível, pelas informações passadas e providência das plantas matrizes para este trabalho.

Aos colegas do PPG Fitotecnia: Aquélis Emer, Bibiana Antonello, Luciana Paim, Mara Winhelmann, Márcio Hilgert, Marília Tedesco e Eduarda Avrella. À Kassia Trapp e Monique Caumo pela partilha de momentos.

Aos bolsistas, Juliana Höerlle, Verônica Groff, Pedro Denículi, Karine Gavski, Daniele Bobsin, Pedro Sodrzeieski, Gian Carlos Gonçalves, Bruna Pletsch, Igor Glaeser e Halisson Barbacovi. Aprendi muito com vocês.

A todos os professores, funcionários e colegas do PPG Fitotecnia e do Departamento de Horticultura e Silvicultura. Ao servidor Idenir de Conto por toda a ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Às empresas Divinut Indústria de Nozes LTDA e Pecanita Alimentos pela doação das mudas que tornaram possível a realização deste trabalho.

“Quando a situação for boa, desfrute-a. Quando a situação for ruim, transforme-a. Quando a situação não puder ser transformada, transforme-se.”

Viktor Frankl

# MANEJO FISIOLÓGICO E SANITÁRIO DE PLANTAS DOADORAS DE EXPLANTES E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE NOGUEIRA-PECAN<sup>1</sup>

Autor: Luciano da Silva Alves  
Orientador: Claudimar Sidnei Fior  
Coorientador: Marília Lazarotto

## RESUMO

O setor produtivo de noqueira-pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] apresenta grande demanda por mudas clonais. A micropropagação pode atender a essa demanda, no entanto, é dificultada devido à contaminação por microrganismos, além da ausência de estudos sobre tratamentos das plantas doadoras de explantes que possam minimizar esse problema. Objetivou-se avaliar o manejo fisiológico e sanitário por meio da aplicação de tratamentos preventivos, entre eles o estiolamento de brotações e sua efetividade sobre o estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares isolados de indivíduos juvenis e adultos de noqueira-pecan. Para isso, *seedlings* e mudas enxertadas com aproximadamente dois anos de idade foram submetidas a uma poda drástica, posteriormente a um período de vernalização e, a fim de obter brotações apicais estioladas, foram transferidas para uma câmara escura. A cada coleta de brotações estioladas e de acordo com o estudo em questão, essas brotações foram submetidas a um protocolo de desinfestação superficial e, posteriormente, isolou-se os segmentos apicais e os segmentos nodais. Esses explantes foram cultivados em diferentes meios de cultura de acordo com protocolos estabelecidos para a espécie. Foram contabilizados os explantes com presença de micélio de fungos, colônias bacterianas, oxidação e regeneração de brotos. Nos estudos com *seedlings*, foi possível o estabelecimento de explantes livres de contaminação por fungos e bactérias, não sendo observada a manifestação desses microrganismos durante os subcultivos. Nos estudos com explantes isolados de indivíduos adultos, a contaminação fúngica foi controlada, mas a bacteriana persistiu. Em ambos os casos, houve alta incidência de oxidação que foi atribuído aos componentes do meio de cultura, mas que não foi um impeditivo à regeneração de brotos em alguns explantes. Diante dos resultados obtidos, é possível inferir que a adoção de tratamentos para o manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras, sobretudo o estiolamento, viabiliza o estabelecimento de explantes caulinares de *C. illinoensis* com baixos índices de contaminação. No entanto, são necessárias adequações nos protocolos para minimizar problemas comuns ao cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, como a oxidação.

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (118f.) Março, 2020.

# PHYSIOLOGICAL AND SANITARY MANAGEMENT OF EXPLANTS DONORS PLANTS AND IN VITRO ESTABLISHMENT OF PECAN<sup>1</sup>

Author: Luciano da Silva Alves

Advisor: Claudimar Sidnei Fior

Co-advisor: Marília Lazarotto

## ABSTRACT

The pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] productive sector presents great demand for clonal seedlings. Micropropagation can meet this demand, however, it is hampered due to contamination by microorganisms, in addition to the lack of studies on treatments of explant donor plants that minimize this problem. The objective of this study was to evaluate physiological and sanitary management through the application of preventive treatments, including the etiolation of shoots and their effectiveness on the in vitro establishment of stem explants isolated from juvenile and adult pecan trees. For this, seedlings and grafted seedlings with approximately two years of age were subjected to a drastic pruning, posteriorly a period of vernalization and, in order to obtain apical shoots etiolated, were transferred to a dark environment. At each collection of etiolate shoots and according to the study in question, these shoots were subjected to a superficial disinfection protocol and, subsequently, the apical and nodal segments were isolated. These explants were cultivated in different culture media according to protocols established for the specie. Explants with the presence of mycelium of fungi, bacterial colonies, oxidation and regeneration of shoots were counted. In studies with seedlings, it was possible to establish explants free of contamination by fungi and bacteria, with no manifestation of these microorganisms being observed during subcultures. In studies with explants isolated from adult individuals, fungal contamination was controlled, but bacterial contamination persisted. In both cases, there was a high incidence of oxidation that was attributed to the components of the culture medium, but that was not an impediment to the regeneration of shoots in some explants. In view of the results obtained, it is possible to infer that the adoption of treatments for physiological and sanitary management, especially etiolation, makes possible the establishment of stem explants of *C. illinoensis* with low levels of contamination. However, adjustments to the protocols are necessary to minimize problems common to the in vitro cultivation of woody species, such as oxidation.

---

<sup>1</sup>Master Dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (118p.) March, 2020.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 A família Juglandaceae e a espécie <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch.....	5
2.2 Propagação da espécie <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch.....	9
2.2.1 Propagação sexuada.....	9
2.2.2 Propagação assexuada.....	10
2.3 Referências.....	21
3 CAPÍTULO 1 – Ensaio para o estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes caulinares de <i>seedlings</i> de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch submetidas à manejo fisiológico e sanitário .....	28
3.1 Introdução.....	30
3.2 Material e Métodos.....	32
3.2.1 Plantas doadoras de explantes.....	33
3.2.2 Manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras de explantes.....	33
3.2.3 Desinfestação superficial das brotações estioladas.....	34
3.2.4 Meios de cultura e incubação dos explantes.....	35
3.2.5 Variáveis analisadas e método estatístico.....	37
3.3 Resultados e discussão.....	38
3.3.1 Estudo I.....	38
3.3.2 Estudo II.....	40
3.4 Conclusões.....	52
3.5 Referências.....	52
4 CAPÍTULO 2 - Ensaio para o estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes caulinares de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch submetidos à manejo fisiológico e sanitário.....	56
4.1 Introdução.....	58
4.2 Material e métodos.....	61



	Página
4.2.1 Plantas doadoras de explantes.....	61
4.2.2 Manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras de explantes.....	62
4.2.3 Desinfestação superficial, incubação e acondicionamento dos explantes.	63
4.3 Resultados e discussão.....	71
4.4 Conclusões.....	91
4.5 Referências.....	91
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	96
6 APÊNDICES.....	98

## RELAÇÃO DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

	Página
1. Descrição da concentração dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição utilizados para a desinfestação superficial em estudos com brotações estioladas de <i>seedlings</i> de noqueira-pecan [ <i>Carya Illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch].....	35
2. Análise da regressão logística do estabelecimento inicial e subcultivos do segmento apical e 1º segmento nodal isolados de <i>seedlings</i> de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch submetidas à manejo fisiológico e sanitário (Estudo I) (p<0,05).....	38
3. Análise de regressão logística do estabelecimento inicial e subcultivos do segmento apical e 1º segmento nodal isolados de <i>seedlings</i> de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch submetidas à manejo fisiológico e sanitário (Estudo II) (p<0,05).....	40
4. Resultados obtidos após 150 dias de estabelecimento de segmentos apicais (T1) e segmentos nodais (1º logo abaixo aos segmentos apicais) (T2) isolados de brotações de <i>seedlings</i> de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch submetidas à manejo fisiológico e sanitário.....	48

### CAPÍTULO 2

1. Percentual de contaminação bacteriana em função da posição dos segmentos nodais (PSgN), não apicais, e do período de coleta das brotações estioladas em ambiente sem luz a 30±2 °C de genótipos adultos das cultivares ‘Choctaw’, ‘Shawnee’, ‘Stuart’ e ‘Barton’ de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch.....	75
2. Número médio de gemas em brotações estioladas e não estioladas, obtidas a cada coleta ao longo de 32 dias de manutenção de mudas de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch em uma câmara escura e em casa de vegetação, respectivamente.....	78

3. Comprimento médio de brotações estioladas e não estioladas, obtidas a cada coleta ao longo de 32 dias de manutenção de mudas de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) K. Koch em uma câmara escura e em casa de vegetação, respectivamente.....	79
4. Resultados obtidos após 30 e 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> de explantes isolados de brotações estioladas e não estioladas, retirados de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) K. Koch. Contaminados: com presença de micélios de fungos e sinais de bactérias sob ou sobre os explantes; Oxidados: 50% ou mais de escurecimento do tecido do explante.....	80

## RELAÇÃO DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

	Página
1. Brotação estiolada de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch dividida de acordo com a localização das gemas em segmento apical e 1º segmento nodal (A) e representação da excisão do segmento apical (B) com aproximadamente 5 mm.....	36
2. Aspecto do segmento apical (Esquerda) e 1º segmento nodal (Direita) logo após a incubação (A) e início da regeneração de brotos no segmento apical e aumento da oxidação no segmento nodal aos 7 dias após a incubação (B), excisados de brotações estioladas de <i>seedlings</i> de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch submetidas à manejo fisiológico e sanitário.....	39
3. Etapas do procedimento de higienização de uma brotação estiolada de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch, realizado previamente à desinfestação superficial, por meio da retirada das folhas (A, B) e dos primórdios foliares do segmento apical (C, D).....	41
4. Aspectos de uma brotação estiolada de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch antes (A) e após desinfestação superficial em etanol a 70% (v/v) por um min, seguido de NaClO a 1,5% (i.a.) por dez min (B) e com a adequação do protocolo, sendo utilizado ClO <sub>2</sub> a 0,007% (i.a.) por 30 min, seguido de NaClO 1,5% (i.a.) por 10 min (C).....	43
5. Resposta dos explantes caulinares estiolados de <i>seedlings</i> de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch 30 dias após incubação em meio de cultura BDS (A) e a retomada da regeneração em diferentes fases 30 após subcultivo para o meio de cultura WPM (90 dias após a incubação).....	45
6. Regeneração de brotos após 120 dias de incubação de segmentos nodais isolados de brotações estioladas de <i>seedlings</i> de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch, submetidos a dois diferentes métodos de desinfestação superficial, consistindo em ClO <sub>2</sub> a 0,007% (i.a.) por 30 min, seguido de NaClO 1,5% (i.a.) por 10 min (A) e ClO <sub>2</sub> a 0,007% (i.a.) por 30 min, seguido de NaClO 1,0% (i.a.) por 10 min (B).....	49

## CAPÍTULO 2

1. Ilustração da excisão do segmento apical e segmentos nodais de uma brotação estiolada de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch sobre uma solução de água deionizada e carvão ativado .....	67
2. Segmento nodal estiolado de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch com aspectos de oxidação fenólica limitadas às regiões excisadas após 30 dias de incubação.....	77
3. Crescimento inicial (A) e com intervalo de um dia (B) de uma brotação estiolada em mudas enxertadas de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch submetidas ao escuro e a uma temperatura constante de 30±2 °C.....	82
4. Contaminação bacteriana em explantes isolados de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch após 90 dias <i>in vitro</i> de acordo com o seu tamanho e sua posição nas brotações estioladas .....	83
5. Contaminação bacteriana em explantes isolados de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch após 90 dias <i>in vitro</i> de acordo com sua posição nas brotações estioladas, coletadas a cada três dias (Blocos).....	85
6. Regeneração de brotos em explantes isolados de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch após 90 dias <i>in vitro</i> de acordo com o seu tamanho e sua posição nas brotações estioladas.....	86
7. Regeneração e repicagem de brotos de um segmento apical estabelecido <i>in vitro</i> , isolado de genótipo adulto de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch submetido à manejo fisiológico e sanitário. Formação de múltiplos brotos aos 60 dias (Esquerda) e isolamento desses brotos aos 90 dias (Direita).....	87

## APÊNDICES

	Página
APÊNDICE 1. Aspectos de uma brotação estiolada de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch (A) obtidas por meio da submissão de mudas ao escuro em uma câmara sob temperatura constante de $30 \pm 2$ °C (B).....	98
APÊNDICE 2. Sequência de estudos e metodologias adotadas sobre as plantas e propágulos de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch e os protocolos para a incubação <i>in vitro</i> de seus explantes.....	99
APÊNDICE 3. Regressão logística para a ocorrência da variável contaminação fúngica em função dos blocos, explantes e tamanho do explante ( $p < 0,05$ ) no estabelecimento <i>in vitro</i> de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch.....	100
APÊNDICE 4. Regressão logística para a ocorrência da variável contaminação bacteriana em função dos blocos, explantes e tamanho do explante ( $p < 0,05$ ) no estabelecimento <i>in vitro</i> de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch.....	100
APÊNDICE 5. Regressão logística para a ocorrência da variável oxidação em função dos blocos, explantes e tamanho do explante ( $p < 0,05$ ) no estabelecimento <i>in vitro</i> de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch.....	101
APÊNDICE 6. Regressão logística para a ocorrência da variável regeneração em função dos blocos, explantes e tamanho do explante ( $p < 0,05$ ) no estabelecimento <i>in vitro</i> de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch.....	101
APÊNDICE 7. Comparação múltipla das variáveis qualitativas de contaminação fúngica; contaminação bacteriana; oxidação e regeneração (teste de Qui-quadrado) em função dos blocos no estabelecimento <i>in vitro</i> de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch.....	102
APÊNDICE 8. Comparação múltipla das variáveis qualitativas de contaminação fúngica; contaminação bacteriana; oxidação e regeneração (teste de Qui-quadrado) em função dos explantes no estabelecimento <i>in vitro</i> de genótipos adultos de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch.....	103

APÊNDICE 9. Comparação múltipla das variáveis qualitativas de contaminação fúngica; contaminação bacteriana; oxidação e regeneração (teste de Qui-quadrado) em função do tamanho dos explantes no estabelecimento *in vitro* de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch..... 104

## 1 INTRODUÇÃO

A fruticultura de clima temperado é um dos setores mais expressivos do agronegócio brasileiro, distribuindo-se por diversas regiões do país em virtude dos avanços na pesquisa e melhor gestão das propriedades rurais (Fachinello *et al.*, 2011). Dessa forma, o desenvolvimento e adoção de tecnologias nos pomares são favorecidos, com vistas ao atendimento das exigências do mercado consumidor interno e de países importadores (Fachinello *et al.*, 2011).

Muitas espécies de frutíferas temperadas têm sido cultivadas fora do seu local de origem com o objetivo de explorar áreas potenciais para genótipos ambientalmente adaptados e, ao mesmo tempo, oferecer alternativas de novos produtos ao mercado. É neste contexto que podemos encontrar a noqueira-pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. Pertencente à família das nozes (Juglandaceae), a espécie destaca-se em diversas regiões do mundo por ser uma importante cultura comercial desse tipo de fruto seco, além da sua madeira para movelaria e energia (Missouri Botanical Garden, 2018).

O interesse por alimentos saudáveis tem atraído cada vez mais consumidores para o mercado das nozes (Vadivel; Kunyanga; Biesalski, 2012; Piza; Moriya, 2014). Estudos têm demonstrado que o consumo *in natura* da noz-pecan (pecan) traz benefícios para a saúde em função dos seus diferentes compostos funcionais (Villarreal-Lozoya;



Lombardini; Cisneros-Zevallos, 2007). No entanto, o atendimento da demanda crescente é prejudicado, visto que a deficiência de métodos propagativos rápidos e com sanidade garantida dificulta a obtenção de mudas e interfere negativamente na implantação e reposição de plantas em pomares (Haroon, 2010).

Desde a década de 1970 se espera pelo desenvolvimento da propagação clonal *in vitro* de porta-enxertos de noqueira-pecan de forma a superar a variabilidade genética entre as plantas nos pomares (Knox e Smith, 1981, Hansen; Lazarte, 1984, Merkle; Sommer; Wetxstein, 1987). Além disso, os métodos utilizados, até então, seja por estaquia ou enxertia, são considerados desvantajosos pela morosidade, pelo custo e pela baixa taxa de sobrevivência (Renukdas; Manoharan; Garner, 2010). A micropropagação é uma ferramenta eficaz para a multiplicação de plantas em massa, em tempo relativamente curto e com alto índice de fidelidade genética, demandado quando os métodos convencionais de propagação não atendem aos objetivos, entre eles, a produção de exemplares livres de doenças (Palchoudhury *et al.*, 2019).

O estabelecimento de culturas *in vitro* de espécies lenhosas é limitado, principalmente, por problemas como a recalcitrância à técnica e a contaminação por microrganismos (Xavier; Wendling; Silva, 2013). Nesse último caso, pode ocorrer durante o estabelecimento, causado por uma desinfestação ineficiente, e durante as fases posteriores, de multiplicação e enraizamento, causado por microrganismos endofíticos (Pasqual *et al.*, 2010). De acordo com Renukdas, Manoharan e Garner (2010), a propagação *in vitro* de noqueira-pecan em grande escala é limitada pela contaminação do meio de cultura por microrganismos, sobretudo por fungos.

No combate à contaminação com origem endofítica dos explantes, é preconizada a adição de produtos como fungicidas e antibióticos ao meio de cultura (Pasqual *et al.*, 2010). Geralmente as concentrações de antibióticos adicionados ao meio de cultura

devem ser elevadas para que sejam efetivas no controle do crescimento de colônias bacterianas (Pereira; Fortes, 2003). Diante disso, faz-se necessário a adoção de cuidados, visto que há muitas dificuldades no manuseio de antibióticos devido à impossibilidade de autoclavagem, a exposição dos laboratoristas, além da destinação correta dos resíduos de meio de cultura contendo essas substâncias. De acordo com Gastalho, Silva e Ramos (2014), a administração de antibióticos tem impacto sobre o ambiente e pode conduzir ao aparecimento de resistência microbiana, tanto nas bactérias que se deseja controlar, como naquelas que estão no ambiente, com a possível seleção de genes de resistência entre populações bacterianas. Desta forma, outros métodos que representem menores riscos quanto ao descarte dos resíduos do meio de cultura contendo antibióticos devem ser explorados.

Uma das preocupações na elaboração dos protocolos que compõem este trabalho foi a adoção de um método eficiente no controle da contaminação por microrganismos, a fim de dispensar o uso de antibióticos e eximir a preocupação com o descarte inadequado do meio de cultura e conseqüente risco ao ambiente. Além disso, sabe-se que as condições fisiológicas e fitossanitárias das plantas doadoras influenciam na capacidade de resposta dos explantes *in vitro*. Desta forma, buscou-se aplicar tratamentos preventivos sobre as plantas matrizes, denominados por Grattapaglia e Machado (1998) como estágio zero, ou seja, que antecedem a seleção e incubação de explantes. Um desses tratamentos é o estiolamento de ramos que, de acordo com esses mesmos autores, destaca-se por minimizar os efeitos da oxidação fenólica e facilitar o enraizamento *in vitro* e *ex vitro*. Além disso, estudos apontam seus efeitos sobre a redução da manifestação de microrganismos endofíticos no estabelecimento *in vitro* de algumas espécies (Pelizza *et al.*, 2016; Restrepo Osorio *et al.*, 2018).

A técnica de estiolamento consiste em submeter a planta doadora de propágulos ao alongamento dos entrenós das brotações, através do seu cultivo em um ambiente desprovido de luz. Diante desse rápido alongamento, a taxa de multiplicação dos microrganismos não acompanha o alongamento do ápice, dessa forma, esse explante tem maiores chances de não estar contaminado (Torres; Teixeira; Pozzer, 1998). Com essas informações, formulou-se a hipótese de que, a restrição à luz para o estiolamento de brotações apicais em plantas matrizes de noqueira-pecan, associada a outros tratamentos, pode favorecer o estabelecimento dos explantes com menores índices de contaminação. Sendo assim, a fim de contribuir para a elaboração de um protocolo visando à micropropagação da espécie, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos do manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras de explantes, sobretudo:

- Sobre o estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares isolados de *seedlings* de noqueira-pecan após adequação no protocolo de desinfestação superficial.
- A sua viabilidade, principalmente o estiolamento de brotações, e as adequações necessárias para o fornecimento de explantes em genótipos adultos de noqueira-pecan, representadas por mudas-enxertadas.
- Sobre o estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares em diferentes meios de cultura, isolados de genótipos adultos de noqueira-pecan.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A família Juglandaceae e a espécie *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch

A família botânica Juglandaceae pertence à ordem Fagales, subdivide-se em 3 subfamílias (Engelhardioideae; Juglandoideae; Rhoipteleoideae), compreendendo 9 gêneros que reúnem cerca de 51 espécies (Stevens, 2017). Caracteriza-se pela deciduidade foliar e presença de frutos secos, tipo nozes e distribui-se, predominantemente, em regiões de clima temperado do Hemisfério Norte, embora também seja encontrada em regiões subtropicais em ambos os hemisférios (Stevens, 2017).

A subfamília Juglandoideae, a qual pertence a espécie alvo do presente trabalho, caracteriza-se pela inflorescência ereta, quase em formato de cone, pela dicogamia de suas flores e esclereides nas paredes das nozes, originando um endocarpo com lacunas (Stevens, 2017). Dentre os gêneros de maior importância dessa subfamília, *Carya* e *Juglans* destacam-se por possuírem espécies de valor econômico, sendo fontes de madeira nobre, ornamentação, frutos comestíveis e óleo para a indústria de cosméticos e tintas (Sistemática de Plantas Vasculares, 2017; Guo *et al.*, 2020).

O gênero *Carya* é composto por cerca de 25 espécies (Judd *et al.*, 2009; Casales; Van der Watt; Coetzer, 2018). Dentre as espécies desse gênero, *Carya illinoensis*

(Wangenh.) C. Koch, comumente chamada de noqueira-pecan, é considerada o membro economicamente mais importante e destaca-se no comércio de frutos secos nos Estados Unidos da América (EUA) (Thompson; Conner, 2012; Casales; Van der Watt; Coetzer, 2018).

A noqueira-pecan é uma espécie nativa da América do Norte, ocorrendo em amplas regiões que vão desde o centro-oeste dos EUA até o México (Sparks, 2005; McWilliams, 2013). Somente nos EUA, ao todo 14 estados ao sul do país cultivam a espécie, com ampla variação entre as temporadas de colheita (Moore *et al.*, 2009). Além da sua região de origem, há outras regiões produtoras que incluem Austrália, Israel, Peru, África do Sul e Argentina (Barrios *et al.*, 2010). Na China, vem sendo amplamente cultivada em mais de 22 províncias em função da alta demanda por nozes (Zhang; Peng; Li, 2015).

A noqueira-pecan é caracterizada por indivíduos que podem atingir até 40 metros de altura em condições adequadas, com folhas compostas pinadas, formadas por nove a 15 folíolos (Fronza *et al.*, 2018). A espécie é monóica, com flores estaminadas que se desenvolvem em ramos de ano e flores pistiladas que se formam em ramos herbáceos, separadas na mesma planta (Fronza; Hamann, 2016). No Brasil, o florescimento ocorre entre os meses de setembro e novembro e a dicogamia faz com que não ocorra a liberação de pólen e a receptividade do pistilo no mesmo período (Andersen, 2004).

Após a polinização, os tecidos adjacentes às flores originam um pseudofruto, denominado Tryma, caracterizado por uma cápsula de quatro valvas inicialmente de cor verde e fechada, tornando-se marrom e ocorrendo a sua abertura (Black; Bewley; Halmer, 2006). Esse momento coincide com a maturação fisiológica e a liberação do fruto verdadeiro (noz-pecan) (Lim, 2012). Essa estrutura é frequentemente chamada de semente e assim será mantido nesta revisão de acordo com a citação nos trabalhos.

A medida em que amadurece, ocorre o enrijecimento da parede do ovário, o que o classifica botanicamente como um fruto seco, além do baixo teor de água e elevado teor de óleo da semente (Sabaté; Ros; Salas-Salvadó, 2006). Desta forma, suas camadas externa (pericarpo) e interna (endocarpo) são lenhosas (Black; Bewley; Halmer, 2006), alojando a semente, popularmente chamada de amêndoa, que é formada pelos cotilédones e o eixo embrionário, os quais são a porção comestível (Fronza; Hamann, 2016).

Além das pecans (*C. illinoensis*), outros frutos secos populares são a amêndoa (*Prunus dulcis*), as castanhas do Brasil (*Bertholletia excelsa* e *Anacardium occidentale*), avelã (*Corylus avellana*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), pinhões (*Araucaria* spp.), pistache (*Pistacia vera*) e nozes (*Juglans* spp.) (Sabaté; Ros; Salas-Salvadó, 2006; Vadivel; Kunyanga; Biesalski, 2012). Em geral, as pecans, independente da cultivar, apresentam baixo teor de açúcares (Wakeling *et al.*, 2001), além de compostos fenólicos que lhe conferem uma importante fonte alimentar antioxidante (Rábago-Panduro *et al.*, 2020).

As pecans são comercializadas, principalmente, para o consumo *in natura* das amêndoas, além de possuírem grande potencial para fabricação de inúmeros produtos, como a preparação de doces, tortas, biscoitos e óleo (McWilliams, 2013). Neste último caso, é utilizado tanto na alimentação, quanto para a indústria de cosméticos e farmacêutica (Lim, 2012). Há também estudos preliminares que apontam as características físicas e químicas da casca das pecans como adequadas para a utilização como substrato para plantas (Fermino; Trevisan; Busnello, 2015), além de ser comumente utilizado na composição de chás. Quanto à madeira das árvores, estudos demonstram que suas características lhe conferem potencial para uma utilização mais nobre do que seu simples uso como lenha (Gatto *et al.*, 2008; Thompson; Conner, 2012).

A noqueira-pecan vem sendo cultivada em vários lugares no mundo, principalmente em regiões com temperaturas amenas (Poletto *et al.*, 2015). Em sua condição nativa, a espécie está estabelecida em regiões onde o clima é de invernos suaves a extremamente rigorosos e em locais muito úmidos a semiárido (Sparks, 2005). A espécie não é tolerante a solos mal drenados e salinos, apresentando melhor desempenho em áreas de baixa a moderada umidade (Lim, 2012). A sua sensibilidade à umidade excessiva do solo pode ser evidenciada pelo declínio da produção em locais onde há elevação do lençol freático (Sparks, 2005).

No Brasil, a espécie foi introduzida em meados do século 1900 por imigrantes norte-americanos e, desde então, várias cultivares foram selecionadas para uma melhor adaptação às condições edafoclimáticas de algumas regiões do país (Fronza; Hamann, 2016). A estimativa é de que existam cerca de 10 mil hectares cultivados no país, principalmente por agricultores de base familiar em propriedades de até 15 hectares (Bilharva *et al.*, 2018), representando uma alternativa de renda para os agricultores (Filippin, 2011). Em 2015, somente no estado do Rio Grande do Sul, a área colhida foi de aproximadamente 2.312 hectares (Fronza *et al.*, 2018). Nos anos seguintes, essa área ultrapassou os 5 mil ha, despontando como o maior produtor de pecans do Brasil (Bilharva *et al.*, 2018). Em 2019, o Brasil alcançou a marca de quarto maior produtor mundial (Revista da Fruta, 2020).

A produção brasileira de pecans está em plena expansão e é voltada, principalmente, ao mercado interno, sendo mais de 50% dos frutos consumidos oriundos de importação (Fronza; Hamann, 2016). No Rio Grande do Sul, Rovani e Wollmann (2018) integrando informações como as temperaturas superiores aos 35 °C, a falta de horas de frio, o excesso de precipitação, as estiagens e o excesso de umidade relativa,

constataram que a maioria dos requisitos climáticos para o desenvolvimento da espécie no estado foram atendidos, evidenciando o seu potencial.

Apesar da expansão significativa de áreas, as informações do seu cultivo no Brasil ainda são limitadas (Fronza *et al.*, 2018), aliadas à falta de um método para a propagação comercial que vise a uniformidade e sanidade garantida das mudas, bem como a seleção de materiais genéticos superiores, não sendo essa uma realidade exclusivamente brasileira.

## **2.2 Propagação da espécie *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch**

### **2.2.1 Propagação sexuada**

A propagação sexuada é a primeira fase da produção de mudas de noqueira-pecan, utilizadas para a produção dos porta-enxertos, seguida pela fase assexuada, ou seja, a enxertia (Poletto *et al.*, 2015). Esse método é utilizado para antecipar o período produtivo, bem como manter as características desejáveis da planta matriz por meio da clonagem, visto que a noqueira-pecan apresenta crescimento lento e com longo período de juvenilidade (Warren, 2015).

De acordo com Moore *et al.* (2009), a propagação sexuada nessa espécie é lenta, em função do tempo requerido para a germinação das sementes, além de segregar indivíduos com variação genotípica considerável, características que limitam a homogeneidade dos porta-enxertos. Além disso, apesar de um percentual considerável, variando de 70% a 90%, a germinação é desuniforme (Smith; Cheary; Carroll, 1997). Esses são os principais problemas referidos pelos viveiristas, representando um entrave para a produção de mudas (Poletto *et al.*, 2015). Sendo assim, o tempo requerido para a produção das mudas acabam elevando o seu custo (Fronza; Poletto; Hamann, 2015).



Acredita-se que esses aspectos da germinação sejam atribuídos à dormência embrionária das sementes, necessitando um período de frio para a superação (Poletto *et al.*, 2015), no entanto, na literatura não há resultados de estudos que comprovem essa hipótese. Para a obtenção de uma germinação e desenvolvimento de plântulas uniformes, Poletto *et al.* (2015) recomendam um período de estratificação antes da semeadura, colocando as sementes por 90 dias em areia úmida, a uma temperatura constante de 4,0 °C. Sparks *et al.* (1995) sugerem que a dormência é adquirida à medida que a semente perde água, uma vez que a viviparidade demonstra que a semente não está adormecida antes da deiscência. Além disso, o longo período necessário para a germinação também é atribuído à restrição mecânica ao alongamento da raiz causado pelo tegumento da semente (Smith; Cheary; Carroll, 1997; Haroon, 2010).

### **2.2.2 Propagação assexuada**

Tendo em vista a morosidade para a entrada em produção, que inicia entre 10 e 12 anos após o plantio da muda a campo oriunda de sementes (Fronza; Hamann, 2016), é desejável o uso de técnicas de propagação assexuada que, simultaneamente, possibilitem a homogeneidade das mudas, a preservação das características genéticas de fenótipos superiores e a antecipação do período produtivo. Para o estabelecimento de pomares de noqueira-pecan, esses atributos são conquistados com a utilização de mudas enxertadas, constituídas por propágulos de fenótipos adultos selecionados enxertados em porta-enxertos obtidos por meio de sementes (Fronza *et al.*, 2018).

A enxertia é uma técnica que associa duas partes (porta-enxerto e enxerto) de diferentes plantas afins, morfológica e fisiologicamente, de forma que a seiva circule entre elas, permitindo uma vida comum e o crescimento como um indivíduo único, visando, dentre alguns aspectos de interesse, a precocidade na produção (Ribeiro *et al.*,

2005). A técnica exige que as mudas de noqueira-pecan tenham, pelo menos, de dois a três anos de idade para serem enxertadas, além do tempo adicional de estabelecimento do enxerto (Warren, 2015). Para a maioria dos viveiristas, são consideradas adequadas taxas acima de 75% de sobrevivência das mudas produzidas no processo de enxertia (Nesbitt; Goff; Stein, 2002). Apesar de laborioso e lento, esse é considerado, atualmente, o único método viável de propagação clonal comercial da espécie (Nesbitt; Goff; Stein, 2002).

Visto que, de acordo com Knox e Smith (1981), há indicações de que os porta-enxertos exercem algum controle sobre a quebra de dormência das gemas e rendimento dos frutos de noqueira-pecan, um método de clonagem desses porta-enxertos é preferível. De acordo com Zhang, Peng e Li (2015), o uso de porta-enxertos clonais geneticamente idênticos pode superar a variabilidade das plantas. A estaquia, pode atender a essa demanda, entretanto, a propagação vegetativa de noqueira-pecan por este método ainda não foi esclarecida, uma vez que, de acordo com Warren (2015), a espécie não responde bem à técnica, sendo considerado um método promissor para fornecer porta-enxertos uniformes, merecendo estudos adicionais.

De acordo com Rocha (2013), o sucesso de qualquer empreendimento agrícola é dependente, entre outros fatores, da qualidade do material propagativo utilizado. Segundo esse mesmo autor, esse material deve ser produzido seguindo os preceitos tecnológicos mais modernos, resultando em um elevado potencial produtivo de espécies vegetais cultivadas em escala comercial. Para Thompson e Conner (2012), ainda que a clonagem por meio da enxertia tenha melhorado a uniformidade das plantas e a qualidade da colheita em noqueira-pecan, simplificando o manejo e o processamento dos frutos, as técnicas desse tipo de propagação ainda requerem maior cuidado e atenção aos detalhes do que em muitas outras espécies. Neste sentido, o setor produtivo de mudas de noqueira-pecan carece de um aporte tecnológico.

Visto que os métodos de propagação atuais de noqueira-pecan são considerados desvantajosos pelo tempo, custo e baixa taxa de sobrevivência das plantas transplantadas a campo, a micropropagação, atualmente, é o método considerado potencial para a multiplicação clonal em massa de genótipos selecionados da espécie (Renukdas; Manoharan; Garner, 2010).

### **2.2.2.1 Micropropagação**

A micropropagação é uma técnica que utiliza pequenos fragmentos de tecidos e órgãos vegetais, denominados explantes, que são isolados de uma planta matriz e cultivados *in vitro* em um meio de cultura apropriado (Gupta *et al.*, 2020). Essa técnica possibilita a obtenção de mudas geneticamente idênticas à planta doadora de explantes; a formação de plantas com elevada qualidade sanitária e, ainda, auxilia na propagação de plantas cujas sementes têm baixo poder germinativo (Echeverrigaray *et al.*, 2001).

A planta de noqueira-pecan cresce lentamente e com o aumento da demanda, métodos alternativos de propagação poderiam acelerar a produção de mudas e beneficiar esse setor, além da fixação de atributos que podem contribuir para a exploração econômica da espécie (Warren, 2015). Por se tratar de um investimento de longo prazo, a implantação de um pomar de noqueira-pecan requer um alto rigor, o que justifica a necessidade de oferta de mudas de excelente qualidade. Neste sentido, o desenvolvimento da micropropagação de noqueira-pecan é interessante, visto que poderá favorecer a produção de mudas clonais com sanidade garantida a partir de técnicas de regeneração de tecidos oriundos de uma planta matriz com características desejáveis.

O estabelecimento dos explantes corresponde à primeira etapa de um sistema de micropropagação, iniciando-se com a seleção dos tecidos ou órgãos mais adequados a serem utilizados para a subsequente multiplicação, a qual inicia após a obtenção de uma

cultura suficientemente adaptada às condições *in vitro* (Grattapaglia; Machado, 1998). O tipo de explante selecionando, seu tamanho, idade e a maneira como é cultivado, podem afetar o início da micropropagação e se a morfogênese pode ser induzida (Grattapaglia; Machado, 1998). Procura-se utilizar explantes com maior proporção de tecido meristemático, devendo-se considerar a finalidade da micropropagação, sendo os segmentos apicais caulinares os mais indicados (Grattapaglia; Machado, 1998).

Ainda nessa etapa, a formulação do meio de cultura é outro fator determinante para o êxito da atividade, não havendo uma formulação padrão (Grattapaglia; Machado, 1998). Os ingredientes comumente utilizados são compostos inorgânicos, orgânicos, inertes e complexas substâncias naturais, seguido ou não com a suplementação de reguladores de crescimento (Cid, 2014). O meio denominado MS, desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), com suas modificações e diluições, apresenta bons resultados para diversas espécies, sendo o mais utilizado (Grattapaglia; Machado, 1998).

Nos estudos com noqueira-pecan, diferentes meios de cultura foram utilizados até o presente, não havendo um protocolo padrão definido para um determinado tipo de explante, sendo o meio *Wood Plant Medium* (WPM), elaborado por Lloyd e Mccown (1980), líquido ou gelificado, o mais utilizado (Hanzen; Lazarte, 1984; Wetzstein; Ault; Merkle, 1989; Renukdas; Manoharan; Garner, 2010). Esse meio é comumente utilizado na micropropagação de arbustos e árvores, apresentando menores concentrações de nitrato e amônia em relação ao meio MS, além de mais potássio e altos níveis de íons sulfato (Quisen; Angelo, 2008). Contudo, nos estudos de Wetzstein, Ault e Merkle (1990), o meio MS foi mais eficaz na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de noqueira-pecan, em relação ao meio WMP.

Além do meio de cultura utilizado, bem como a fonte e as condições fisiológicas do explante, a regeneração de plantas *in vitro* é um processo complexo que envolve

diversos outros fatores, entre eles o genótipo, as condições ambientais e a combinação de reguladores de crescimento (Luciani *et al.*, 2006). Algumas células possuem a capacidade de responder a estímulos específicos como, por exemplo, hormonais (Taiz *et al.*, 2017). Nesse sentido, os reguladores de crescimento, substâncias sintéticas análogas aos hormônios vegetais, utilizadas na cultura de tecidos, são fundamentais para o estabelecimento da competência e a determinação (canalização para vias particulares do desenvolvimento), condições necessárias para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (Taiz *et al.*, 2017). Nos fragmentos vegetais utilizados como explantes, a desdiferenciação celular pode resultar na formação de calos com células ou grupos de células competentes. Quando essas são transferidas para meios indutores, tornam-se determinadas, ou seja, comprometidas com uma rota específica de desenvolvimento (Torres *et al.*, 2000).

De acordo com o explante utilizado, a micropropagação pode ser conduzida por diferentes vias (Grattapaglia; Machado, 1998). A regeneração pode ser direta, quando a diferenciação em gemas se dá diretamente sem a passagem pela fase de calo, ou indireta, quando se forma primeiro um calo (grupo de células com crescimento desordenado, formando um tecido indiferenciado com baixa determinação e elevada competência para formação de raízes e gemas adventícias) o qual, posteriormente, se diferencia em gemas (Torres *et al.*, 2000).

Nos trabalhos de propagação *in vitro* de noqueira-pecan, diferentes tipos de explantes e vias de regeneração foram utilizados. Por embriogênese somática, o êxito não foi alcançado devido à pouca regeneração de brotos e enraizamento desses brotos, além da baixa taxa de sobrevivência nas condições *ex vitro* (Merkle; Sommer; Wetzstein, 1987; Wetzstein; Ault; Merkle, 1989, 1990; Yates; Reilly 1990; Mathews; Wetzstein, 1993). Por organogênese direta, houve uma evolução nos protocolos com base em tentativas

inconsistentes de proliferação de brotações, alongamento ou desenvolvimento de raízes a partir de explantes caulinares e, na sua maioria, oriundos de tecidos de exemplares jovens (plântulas obtidas da germinação *in vivo* de sementes ou *in vitro* de embriões zigóticos) (Knox; Smith, 1981; Wood, 1982; Hanzen; Lazarte, 1984).

A organogênese direta é uma das vias mais utilizadas para o processo de regeneração de brotos *in vitro* e favorável em termos da estabilidade genética (Lima *et al.*, 2012). Por essa via, resultados considerados promissores foram alcançados através de um protocolo desenvolvido para a regeneração de plantas de noqueira-pecan, a partir de segmentos nodais isolados de plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos cultivados *in vitro* (Renukdas; Manoharan; Garner, 2010). Nesse protocolo, houve eficiência na indução da brotação superior a 95% e de enraizamento, superior a 90%, apesar dos elevados índices de contaminação fúngica na ordem de 20 a 40% após três semanas de cultura. No entanto, além da alta incidência de contaminação a ser contornada, a micropropagação através de explantes isolados de plântulas obtidas a partir de embriões zigóticos resulta em plantas heterogêneas e esses autores recomendam a replicação desse protocolo sobre tecidos retirados de exemplares adultos, a fim de tentar a produção de mudas clonais de genótipos superiores.

O potencial da micropropagação por organogênese direta em explantes isolados de indivíduos adultos de noqueira-pecan foi investigado através de estudos realizados por Corte-olivares; Phillips e Butler-nance (1990). Nesse estudo, o resultado foi, em média, uma brotação por explante e 40% de enraizamento desses brotos utilizando o meio de cultura BDS (Dunstan; Short, 1977). Entretanto, não foram abordadas a adoção de estratégias de manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras de explantes em desenvolvimento a campo previamente à coleta dos explantes, tampouco a aclimatização das plantas micropropagadas, restringindo-se à desinfestação superficial, e que,

provavelmente, não foi suficiente, acarretando em reduzido estabelecimento *in vitro* dos explantes, decorrente da elevada contaminação microbiana.

A micropropagação é largamente utilizada e bem-sucedida em todas as classes de plantas hortícolas (George, 2008), sendo utilizada com menor destaque para espécies lenhosas em função de diversos problemas enfrentados em diferentes etapas da técnica (Grattapaglia; Machado, 1998). Além da contaminação do meio de cultura por microrganismos, de acordo com Fráguas (2003), a micropropagação de espécies de plantas lenhosas é dificultada, entre outros fatores, pela presença excessiva de componentes do meio nutritivo que conduzem a desordens metabólicas e morfológicas.

Entre os problemas relatados, está a hiper-hidratação (vitrificação), caracterizada pelo desenvolvimento estrutural anormal das células, da síntese de clorofila, da estrutura enzimática, entre outros (Cid, 2014), ocasionado por fatores estressantes como o ferimento da excisão, as forças iônicas do meio de cultura e o ambiente *in vitro* altamente úmido e com a concentração de gases (Kevers *et al.*, 2004). Os brotos hiper-hidratados parecem túrgidos, com seus órgãos de cor verde claro, translúcidos e quebradiços, com enraizamento e mecanismo de fechamento dos estômatos deficientes, o que dificulta a aclimatização (Kevers *et al.*, 2004). Quando aclimatizadas, geralmente as mudas são mal formadas e sem valor comercial.

Esses fatores estressantes impostos pelas condições *in vitro* também são responsáveis pela indução de variações genéticas nas plantas regeneradas, denominado variação somaclonal. De acordo com Krishna *et al.* (2016), grande parte dessa variabilidade pode estar relacionada com o estresse oxidativo devido aos níveis elevados de espécies reativas de oxigênio que são originados. Com isso, podem ocorrer alterações cromossômicas, tanto em número, quanto em arranjo, além de deleções e substituição de bases de DNA, gerando plantas com características diferentes e, muitas vezes

indesejáveis quando comparadas as da planta selecionada para a doação dos explantes (Cid, 2014; Krishna *et al.*, 2016).

Outros problemas atribuídos à micropropagação são a recalcitrância, sobretudo nas espécies lenhosas, e o declínio do vigor dos explantes, caracterizado pela ausência de resposta na incubação e aos sucessivos subcultivos para o fornecimento de múltiplos brotos, respectivamente (Grattapaglia; Machado, 1998). Nesse último caso, geralmente os explantes não respondem mais aos estímulos após longos períodos *in vitro* (Grattapaglia; Machado, 1998). Além da excisão do explante (Bonga, 2017), as condições *in vitro* acarretam distúrbios na regulação das vias metabólicas e a perda irreversível da totipotência das células, devendo ser selecionado o tecido que expresse maior totipotência para uma maior viabilidade de um explante (Gaspar *et al.*, 2000). Nos estudos iniciais com noqueira-pecan, a espécie não mostrou recalcitrância aos estímulos da micropropagação (Knox; Smith, 1981), diferentemente de outra espécie da mesma família (*Juglans nigra* L.) em que o estabelecimento dos seus explantes e multiplicação só foi possível após ajustes do meio de cultura (Stevens; Pijut, 2018).

Além dos problemas já citados, a grande quantidade de compostos fenólicos, entre outros fatores, confere a essa classe de plantas limitações nas fases iniciais da micropropagação por problemas de oxidação fenólica (Oliveira; Dias; Brondani, 2013; Cid, 2014). Sua ocorrência é atribuída à ação de uma classe de enzimas denominadas polifenol oxidase e que são sintetizadas em resposta a ferimentos ou senescência dos tecidos vegetais (Cid, 2014). A excisão tende a secretar elevadas proporções de compostos fenólicos (precursores de taninos e ligninas) que extravasam e serão oxidados por essas enzimas (Andrade *et al.*, 2000). Com isso, o estabelecimento e a sobrevivência do explante fica comprometida, causando até mesmo a morte desses explantes em muitas espécies vegetais (Cid, 2014), já que se formam compostos fitotóxicos que alteram a



composição do meio de cultura e absorção de nutrientes pelo explante (Grattapaglia; Machado, 1998; Andrade *et al.*, 2000). A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo, da fase de desenvolvimento da planta e da estação do ano, ou seja, as condições da planta matriz, bem como o tipo de explante utilizado, no qual vai diferir em níveis endógenos de compostos fenólicos e, por consequência, a adoção de um protocolo adequado em cada caso (Grattapaglia; Machado, 1998).

O grande desafio para os processos regenerativos de plantas *in vitro* a partir de explantes de espécies lenhosas, sobretudo quando coletados a campo de exemplares adultos, é a contaminação do meio de cultura ocasionado por microrganismos (Mantovani; Franco, 1998). O combate aos microrganismos presentes na superfície do vegetal é realizado com métodos de desinfestação superficial e, para isso, diferentes metodologias e agentes desinfestantes são utilizados (Cid, 2014). Entre os agentes desinfestantes que podem ser utilizados, destacam-se o etanol e o hipoclorito de sódio em variadas concentrações e tempos de exposição e que influenciam nos índices de contaminação (Cid, 2014). Ainda assim, as plantas são fontes potenciais de microrganismos endofíticos, que podem manifestar-se em diferentes fases do cultivo *in vitro* e tornarem-se limitantes à micropropagação (Grattapaglia; Machado, 1998).

Assim como em outras espécies lenhosas, a propagação *in vitro* de noqueira-pecan em grande escala é limitada pela contaminação do meio de cultura por microrganismos, sobretudo por fungos (Renukdas; Manoharan; Garner, 2010). Mesmo com a utilização de material juvenil (*seedlings*) mantido em ambiente com maior rigor fitossanitário, grandes problemas com a contaminação fúngica e a viabilidade desses explantes no cultivo *in vitro* são relatados. Na literatura, distintos protocolos de desinfestação superficial dos explantes de noqueira-pecan foram utilizados, a exemplo do cultivo *in vitro* de segmentos nodais retirados de mudas de noqueira-pecan com quatro semanas de idade, Wood (1982)

obteve um crescimento de contaminantes parcialmente controlado pela adição de antibióticos ao meio de cultura. No entanto, poucos estudos exploraram a aplicação de estratégias de manejo fisiológico e sanitário sobre as plantas doadoras de explantes, sobretudo o seu uso combinado.

Além das dificuldades impostas por essa classe de plantas, o cultivo *in vitro* em grande escala tem como entrave a excessiva demanda por mão de obra, o que encarece os custos da produção de mudas (Gerald, 2011). Geralmente, cada espécie necessita de uma metodologia específica no processo de micropropagação, compreendida por etapas que vão desde a manutenção das plantas doadoras de explantes, passando pela desinfestação do material vegetal, até a adoção de um meio de cultura mais adequado para a multiplicação e enraizamento (Diniz *et al.*, 2008). Ainda assim, essa técnica de cultivo *in vitro* permite uma melhor relação custo-benefício, pois possibilita produzir, em escala comercial, uma grande quantidade de material uniforme e selecionado (Cid, 2014).

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), a fim de minimizar os problemas recorrentes durante o estabelecimento, na fase que antecede a coleta dos explantes é preconizada a adoção de um manejo fisiológico e sanitário por meio da adoção de um conjunto de tratamentos. Entre eles estão a manutenção em ambiente protegido; a aplicação de fungicidas, bactericidas e inseticidas; manutenção em substrato esterilizado; a simulação de um período de vernalização no caso de espécies de clima temperado e o estiolamento de ramos. Esse último destaca-se no combate à contaminação endofítica dos explantes.

A técnica de estiolamento consiste em submeter a planta matriz ao alongamento dos entrenós através do seu cultivo em um ambiente desprovido de luz, não havendo a formação de clorofila, fazendo com que a taxa de replicação do microrganismo não acompanhe o rápido alongamento do ápice, dessa forma essa região do vegetal tem

maiores chances de não estar contaminada (Torres; Teixeira; Pozzer, 1998). Essa prática também provoca alterações fisiológicas, modificando o conteúdo de precursores de compostos fenólicos no tecido vegetal (Krishna *et al.* 2008), podendo ser empregado para minimizar problemas na fase inicial da micropropagação.

Menores índices de oxidação fenólica no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas como abacateiro (*Persea americana* Mill.) (Lauraceae) (Restrepo Osorio *et al.*, 2018), amoreira (*Rubus* sp.) (Rosaceae) (Pelizza *et al.*, 2016) e oliveira (*Olea europaea* L.) (Oleaceae) (Moreira *et al.*, 2017) foram atribuídos ao estiolamento. Quanto à contaminação por microrganismos, em estudos com *Castanha sativa* (Fagaceae), os resultados indicaram que o estiolamento proporcionou o estabelecimento e multiplicação de explantes livres de contaminação (Ballester; Sanchez; Vieitez, 1989). Já com noqueira-pecan, a técnica também foi utilizada, mas a fim de obter melhores resultados de enraizamento dos explantes *in vitro*, não sendo abordados seus efeitos sobre a oxidação, tampouco sobre a contaminação por microrganismos (Hansen; Lazarte, 1984).

Na literatura, não foram encontradas informações quanto ao uso da técnica de estiolamento de brotações apicais em plantas de noqueira-pecan para o fornecimento de explantes livres de microrganismos endofíticos e a redução da oxidação fenólica. Além disso, as informações do uso de técnicas de manejo fisiológico e sanitário em plantas doadoras de explantes da espécie são restritas, como nos estudos de Ávila-treviño *et al.* (2013), onde um fungicida não sistêmico foi aplicado semanalmente com a irrigação sobre as plantas doadoras de explantes, não sendo abordados os efeitos sobre a contaminação. Mesmo em protocolos tidos como assépticos, como no caso do uso de embriões isolados de sementes tratadas com solução fungicida, houve alta incidência de contaminação após três semanas em meio de cultivo (Renukdas; Manoharan; Garner, 2010).

Nesse sentido, em função da falta de informações para a espécie quanto ao manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras de explantes, justifica-se o desenvolvimento de estudos com uma combinação de tratamentos preventivos, entre eles o estiolamento de brotações, a fim de constatar os seus efeitos sobre o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de noqueira-pecan.

### 2.3 Referências

ANDERSEN, P. C. **The pecan tree**. Gainesville, FL: University of Florida, 2004.

Disponível em:

<https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/HS/HS22900.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2018.

ANDRADE, M. W. *et al.* Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

ÁVILA-TREVIÑO, J. A. *et al.* Morphogenic responses in the *in vitro* propagation of pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch). **Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, Chapingo, v. 14, n. 3, p. 469-481, Dec. 2013.

BALLESTER, A.; SANCHEZ, M. C.; VIEITEZ, A. M. Etiolation as a pretreatment for *in vitro* establishment and multiplication of mature chestnut. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 77, n. 3, p. 395–400, 1989.

BARRIOS, D. O. *et al.* SWOT analysis and perspectives of pecan production in Chihuahua-Mexico. **Revista Mexicana de Agronegocios**, Torreón, v. 14, n. 27, p. 348-359, 2010.

BLACK, M.; BEWLEY, J. D.; HALMER, P. (ed.). **The encyclopedia of seeds: science, technology and uses**. Wallingford, UK: CABI, 2006. 828 p.

BONGA, J. M. Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers? **Trees**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 781–789, 2017.

BRASIL já é o 4º maior produtor mundial de noz pecã. **Revista da Fruta**, Fraiburgo, 28 jan. 2020. Disponível em: <https://www.revistadafruta.com.br/eventos/brasil-ja-e-o-4-maior-produtor-mundial-de-noz-peca,347921.jhtml>. Acesso em: 2 mar. 2020.

CASALES, F. G.; VAN DER WALLT, E.; COETZER, G. M. Propagation of Pecan (*Carya illinoensis*): A review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 17, n. 18, p. 586–605, 2018.

CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. ed. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2014. 325 p.

CORTE-OLIVARES, J.; PHILLIPS, G. C.; BUTLER-NANCE, S. A. Micropropagation of pecan. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 25, n. 10, p. 1308, 1990.

DINIZ, J. D. N. *et al.* Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 107-113, mar. 2008.

DUNSTAN, D. I.; SHORT, K. C. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 41, n. 1, p. 70–72, 1977.

ECHEVERRIGARAY, S. *et al.* Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. *In*: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (ed.) **Biotechnology na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. cap. 7. p. 257-276.

FACHINELLO, J. C. *et al.* Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 109–120, 2011. Suplemento 1.

FERMINO, M. H.; TREVISAN, M.; BUSNELLO, Â. C. Cascas de tungue e de noz pecan como alternativa de substrato para horticultura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, n. 4, p. 459–464, 2015.

FILIPPIN, I. L. **Viabilidade econômica do cultivo de noqueira pecã em áreas de reserva legal e de preservação permanente**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira “Roxo de Valinhos” em diferentes ambientes**. 2003. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

FRONZA, D.; POLETTO, T.; HAMANN, J. J. **O cultivo da noqueira-pecã**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2015. 301 p.

FRONZA, D.; HAMANN, J. J. **Técnicas para o cultivo da noqueira-pecã**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2016. 424 p.

FRONZA, D. *et al.* Pecan cultivation: general aspects. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 48, n. 2, [art.] e20170179, 2018.

GASPAR, T. *et al.* Loss of plant organogenic totipotency in the course of neoplastic progression. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Cambridge, v. 36, p. 171–181, 2000.

GASTALHO, S.; SILVA, G.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, [Lisboa], v. 3, n. 1, p. 29-45, jan. 2014.

GATTO, D. A. *et al.* Características tecnológicas das madeiras de *Luehea divaricata*, *Carya illinoensis* e *Platanus x acerifolia* quando submetidas ao vergamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 121-131, 2008.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure: background. *In*: GEORGE, E. V.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (ed.). **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 1-28.

GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas**: produção industrial de plantas *in vitro*. São Paulo: Antiqua, 2011. 393 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In*: TORRES, A. C. *et al.* **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. (ed.) Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.

GUO, W. *et al.* Portal of Juglandaceae: a comprehensive platform for Juglandaceae study. **Horticulture Research**, London, v. 7, [art. 35], [p. 1-8], 2020.

GUPTA, N. *et al.* A review on micropropagation culture method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, [India], v. 8, n. 1, p. 86-93, 2020.

HANSEN, K. C.; LAZARTE, J. E. *In vitro* propagation of pecan seedlings. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 19, p. 237-239, 1984.

HAROON, A. **Propagation of pecan (*Carya illinoensis*) using *in vitro* techniques**. 2010. 222 f. Thesis (Doctorate Degree of Philosophy) - Department of Botany, University of the Punjab, Lahore, 2010.

JUDD S. W. *et al.* **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612 p.

KEVERS, C. *et al.* Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 2, p. 181-191, 2004.

KNOX, C. A.; SMITH, H. Progress in tissue culture methods for production of "Riverside" stocks. **The Pecan Quarterly**, Bryan, v. 15, n. 1, p. 27-34, 1981.

KRISHNA, H. *et al.* Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 118, n. 2, p. 132-138, 2008.

KRISHNA, H. *et al.* Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. **3 Biotech**, Berlin, v. 6, n. 1, [art.] 54, [p. 1-18], 2016.

LIM, T. K. *Carya illinoensis*. *In*: LIM, T. K. (ed.). **Edible medicinal and non medicinal plants**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 51-59.

LIMA, C. O. C. *et al.* Direct organogenesis of *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 249-254, 2012.

- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, Carlisle, v. 30, p. 421–427, 1980.
- LUCIANI, G. *et al.* Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, n. 2, p. 139–143, 2006.
- MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM, CEPEF: FATEC, 1998. 21 p. (Centro de Pesquisas Florestais. Série técnica, 12).
- MATHEWS, H.; WETZSTEIN, H. Y. A revised protocol for efficient regeneration of somatic embryos and acclimatization of plantlets in pecan, *Carya illinoensis*. **Plant Science**, Shannon, v. 91, n. 1, p. 103–108, 1993.
- MERKLE, S. A.; SOMMER, H. E.; WETXSTEIN, H. Y. Somatic embryogenesis in tissue cultures of pecan. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 22, p. 128–130, 1987.
- MCWILLIAMS, J. **The Pecan: a history of America's native nut**. Austin: University of Texas Press, 2013. 192 p.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Carya illinoensis*. St. Louis, [2018]. Disponível em: <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=281352>. Acesso em: 30 jun. 2018.
- MOORE, E. D. *et al.* Effectiveness of state-level Pecan promotion programs: the case of the Texas Pecan checkoff program. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 44, n. 7, p. 1914–1920, 2009.
- MOREIRA, R. M. *et al.* Mother plant luminescence and zeatin concentration in the *in vitro* establishment of an olive plant. **Agronomy Science and Biotechnology**, Londrina, v. 3, n. 2, p. 81–87, 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, n. 3, p. 473–497, July 1962.
- NESBITT, M. L.; GOFF, W. D.; STEIN, L. A. Effect of scionwood packing moisture and cut-end sealing on Pecan graft success. **HortTechnology**, Alexandria, VA, v. 12, n. 2, p. 257–260, 2002.
- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, PR, v. 33, n. 76, p. 439–453, 2013.
- PALCHOUDHURY, S. *et al.* An improved and efficient organogenic regeneration protocol using epicotyl segment of *in vitro* grown kagzilime (*Citrus aurantifolia*)

seedling. **Journal of Plant Development Sciences**, Nova Delhi, v. 11, n. 7, p. 389-395, 2019.

PASQUAL, M. *et al.* Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHRWINSKI-PEREIRA, J. E. (ed.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2010. cap. 2, p. 61-161.

PELIZZA, T. R. *et al.* *In vitro* establishment of blackberry (*Rubus* sp.) cultivar “Xavante”. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 9, p. 1542–1545, 2016.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 11, p. 1273–1279, 2003.

PIZA, P. L. B. T.; MORIYA, L. M. Cultivo da macadâmia no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 39–45, 2014.

POLETTI, T. *et al.* Métodos de superação de dormência da semente de noqueira-pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 39, n. 6, p.1111-1118, 2015.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 48 p. (Documentos, 61).

RÁBAGO-PANDURO, L. M. *et al.* Changes in bioactive compounds content and antioxidant capacity of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh. K. Koch)] during storage. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, México, v. 19, n. 3, p. 1439–1452, 2020.

RENUKDAS, N. N.; MANOHARAN, M.; GARNER, J. O. Jr. *In vitro* propagation of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch]. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 211–215, 2010.

RESTREPO OSORIO, C. *et al.* *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass) through morphogenesis. **Acta Agronómica**, Palmira, v. 67, n. 1, p. 162–169, 2018.

RIBEIRO, G. D. *et al.* **Enxertia em fruteiras**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2005. 8 p. (Recomendações Técnicas, 920).

ROCHA, H. S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S (ed.) **Aspectos práticos na micropropagação de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. cap. 5, p. 133-164.

ROVANI, F. F. M.; WOLLMANN, C. A. Análise sazonal e anual dos requisitos climáticos do cultivo da noqueira pecã (*Carya illinoensis*) no Rio Grande do Sul. **Geosp – Espaço e Tempo**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 191-209, 2018.



SABATÉ, J.; ROS, E.; SALAS-SALVADÓ, J. Nuts: nutrition and health outcomes. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 96, p. S1–S2, 2006. Suplemento S2.

SISTEMÁTICA de plantas vasculares. [S.l.]: Depto. de Ecología & Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, UDELAR, [2017]. Disponível em: <http://www.thecompositaehut.com/>. Acesso em: 7 abr. 2018.

SMITH, M. W.; CHEARY, B. S.; CARROLL, B. L. Effect of water bath temperature and stratification on germination of pecan seed. **Hortscience**, Alexandria, VA, v. 32, n. 7, p.1272-1273, Dec. 1997.

SPARKS, D. *et al.* Fruiting stress induces shuck decline and premature germination in pecan. **Hortscience**, Alexandria, VA, v. 120, p. 43–53, 1995.

SPARKS, D. Adaptability of Pecan as a species. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 40, n. 5, p. 1175–1189, 2005.

STEVENS P. F. **Angiosperm phylogeny website, version 14**. [St. Louis], July 2017. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em: 30 jun. 2018.

STEVENS, M. E.; PIJUT, P. M. Rapid *in vitro* shoot multiplication of the recalcitrant species *Juglans nigra* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Cambridge, v. 54, n. 3, p. 309–317, 2018.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

THOMPSON, T. E.; CONNER, P. J. Pecan. *In*: BADENES, M. L.; BYRNE, D. H. (ed.). **Fruit breeding**. Boston: Springer US, 2012. p. 771–801.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 133-145.

TORRES, A. C. *et al.* **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2000.

VADIVEL, V.; KUNYANGA, C. N.; BIESALSKI, H. K. Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control. **Nutrition**, Tarrytown, v. 28, n. 11/12, p. 1089–1097, 2012.

VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, London, v. 102, n. 4, p. 1241-1249, Jan. 2007.

WAKELING, L. T. *et al.* Composition of pecan cultivars Wichita and Western Schley [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] grown in Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 49, n. 3, p. 1277–1281, 2001.

WARREN, C. J. **Evaluation of different propagation methods (budding, grafting and cuttings) for pecan.** 2015. 48 f. Thesis (Master of Science) Texas A&M University, [College Station, Texas], 2015.

WETZSTEIN, H. Y.; AULT, J. R.; MERKLE, S. A. Further characterization of somatic embryogenesis and plantlet regeneration in pecan (*Carya illinoensis*). **Plant Science**, Shannon, v. 64, n. 2, p. 193–201, 1989.

WETZSTEIN, H. Y.; AULT, J. R.; MERKLE, S. A. Factors influencing somatic embryogenesis and plantlet regeneration in pecan, *Carya illinoensis*. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 280, p. 69-74, July 1990.

WOOD, B. W. *In vitro* proliferation of pecan shoots. **HortScience**, Alexandria, VA, n. 17, p. 890-891, 1982.

XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

YATES, I. E.; REILLY, C. C. Somatic embryogenesis and plant development in eight cultivars of pecan. **HortScience**, Alexandria, v. 25, p. 573–576, 1990.

ZHANG, R.; PENG, F.; LI, Y. Pecan production in China. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 197, p. 719–727, 2015.

### **3 CAPÍTULO 1**

**Ensaio para o estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares isolados de *seedlings* de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch submetidas à manejo fisiológico e sanitário**

## RESUMO

A produção comercial de mudas de noqueira-pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] é dificultada pela falta de métodos propagativos rápidos e com uniformidade genética. Técnicas como a micropropagação podem minimizar essas dificuldades por meio do atendimento de uma demanda crescente por mudas clonais. Entretanto, a técnica é dificultada, principalmente, pela contaminação por microrganismos, o que pode ser contornado por meio do uso de tratamentos preventivos aplicados às plantas doadoras de explantes, entre eles, o estiolamento de brotações apicais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares isolados de *seedlings* submetidas a um manejo fisiológico e sanitários. Após uma poda drástica e um período de vernalização, mudas oriundas de sementes da cultivar 'Barton' foram mantidas no escuro a uma temperatura de  $30 \pm 2$  °C. Brotações estioladas com cerca de 2 cm de comprimento foram coletadas e submetidas à desinfestação superficial por imersão em solução de dióxido de cloro (0,007% i.a.) e testando-se duas concentrações de hipoclorito de sódio (1,5 e 1% i.a.), consistindo nos Estudos I e II deste trabalho. O segmento apical e o 1º segmento nodal (tratamentos) foram isolados e cultivados *in vitro* em meio BDS até os 60 dias. Posteriormente, foram subcultivados em meio WPM. O meio BDS foi acrescido de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $0,02 \text{ } \mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D),  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel® e pH ajustado para 5,8. Já o meio WPM foi acrescido de  $20 \text{ g L}^{-1}$  glicose,  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel e pH ajustado para 5,7. Em ambos, foram acrescidos  $13,32 \text{ } \mu\text{M}$  de benzilaminopurina e o pH foi ajustado antes da autoclavagem a 121 °C, 1,2 atm. de pressão durante 15 min. Foram avaliadas a presença de micélio de fungos, colônias bacterianas, oxidação e regeneração de brotos nos explantes e os resultados submetidos a análise de regressão logística. Ao final de 150 dias de avaliações, em ambos os estudos, houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis contaminação fúngica, com o menor percentual observado nos segmentos apicais. A contaminação bacteriana não se manifestou nos ápices do Estudo II e apresentou baixos percentuais nos segmentos nodais. A oxidação foi observada, mas não foi um impeditivo para a regeneração de brotos nos explantes. Desta forma, visto que a incidência de contaminação fúngica estabilizou logo no início dos estudos e a bacteriana apresentou baixa incidência, conclui-se que o manejo fisiológico e sanitário aplicado às plantas doadoras é capaz de minimizar consideravelmente esses problemas na fase de estabelecimento. No entanto, o protocolo precisa ser adequado para uma menor incidência de oxidação.

### 3.1 Introdução

*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch, popularmente conhecida no Brasil como noqueira-pecan, é uma espécie arbórea pertencente à família botânica Juglandaceae, representada por indivíduos que podem ultrapassar os 30 metros de altura. Suas sementes são caracterizadas pela grande quantidade de compostos benéficos para a saúde como polifenóis, entre outros, os quais conferem uma importante fonte alimentar antioxidante (Domínguez-Avila *et al.*, 2015). Diante dessa informação e o aumento do consumo de alimentos saudáveis com efeitos nutracêuticos, há uma grande demanda por nozes no mercado.

De acordo com Haroon (2010), há uma queda acentuada de noqueiras-pecan e seus produtos devido ao ataque de doenças e à falta de métodos rápidos de propagação. Ainda assim, é crescente o interesse no cultivo da espécie em diversas regiões do mundo. Suas perspectivas de cultivo são bastante promissoras nos países do Hemisfério Sul, especialmente devido à época de colheita que coincide com a plena entressafra da cultura nos países considerados grandes produtores e, ao mesmo tempo, os maiores consumidores.

No Brasil, o seu cultivo é favorecido, principalmente, pela adaptação edafoclimática na região sul (Fronza; Hamann, 2016). No entanto, as informações do cultivo no país ainda são limitadas e a implantação de pomares é dificultada devido ao tempo requerido para a produção e, conseqüentemente, pelo alto custo das mudas ofertadas (Fronza; Poletto; Hamann, 2015). Além disso, o setor produtivo carece da produção de mudas com maior uniformidade genética e padrão morfológico (Fronza; Hamann, 2016), visto que a propagação sexuada não propicia a produção de porta-enxertos homogêneos (Poletto *et al.*, 2015; Warren, 2015). Essas mudas quando levadas a campo, acarretam a formação de pomares desuniformes com plantas muito grandes,

com diferentes demandas por água e nutrientes, além de dificultar as operações mecanizadas (Fronza; Hamann, 2016).

A micropropagação, técnica que se baseia na formação de novos indivíduos a partir da regeneração de tecidos oriundos de uma planta doadora (Grattapaglia; Machado, 1998), pode beneficiar a produção clonal de mudas de noqueira-pecan com uma melhor relação custo-benefício, ou seja, oferecendo plantas de qualidade e com as características desejáveis requeridas, entre elas a resistência a doenças e nozes de maior tamanho, além de um maior número de mudas uniformes em menor tempo. Nessa técnica, o principal objetivo durante a fase de estabelecimento é a obtenção de culturas sem a manifestação de microrganismos endofíticos e, em melhores casos, culturas axênicas, ou seja, explantes livres desses microrganismos.

A contaminação do meio de cultura, sobretudo por fungos, é considerada o fator limitante para a propagação *in vitro* de noqueira-pecan em grande escala (Renukdas; Manoharan; Garner, 2010). Como é comum em espécies lenhosas, este problema se agrava quando os explantes são obtidos de plantas doadoras provenientes do campo, onde os níveis de contaminação tendem a ser maiores (Ferreira *et al.*, 2009). Ainda assim, plantas doadoras de explantes mantidas em ambientes que permitem maior rigor fitossanitário, como casas de vegetação, podem ser fontes de microrganismos. Na maioria dos estudos com noqueira-pecan, mesmo nos casos onde as plantas matrizes foram mantidas nesses ambientes, foram utilizados métodos de desinfestação superficial dos explantes, assim como a inclusão de antibióticos e fungicidas, tanto na etapa de desinfestação, quanto na incubação, a fim de reduzir a associação com microrganismos. Poucos estudos exploraram o uso do manejo fisiológico e sanitário por meio de tratamentos preventivos aplicados às plantas doadoras de explantes para o controle de microrganismos endofíticos.

Entre as técnicas de manejo fisiológico e sanitário que podem ser utilizadas, destaca-se o estiolamento de brotações apicais (Torres; Teixeira; Pozzer, 1998). Essa técnica resulta em um acentuado alongamento dos entrenós, não sendo acompanhado pela taxa de multiplicação e movimentação de microrganismos na mesma velocidade (Pasqual *et al.*, 2010). Além disso, de acordo com Cutter (1986), o ápice caulinar é uma região em constante divisão celular, formando uma estreita faixa de células em diferenciação. Sendo assim, mesmo quando não estiolado, Almeida, Yara e Almeida (2005) levantaram a hipótese de que essa região pode ser axênica ou, pelo menos, de pequena mobilidade para os microrganismos no vegetal. Nos estudos com noqueira-pecan, a inclusão dessa técnica, entre outras, em um manejo preventivo sobre as plantas matrizes doadoras de explantes e a adequação dos protocolos de micropropagação podem vencer os problemas nas etapas iniciais advindos, principalmente, da contaminação por microrganismos.

Essas informações conduzem a ideia de que o estiolamento favorece a obtenção não só de ápices, mas de segmentos nodais axênicos, ou seja, propiciando a obtenção de um material livre de microrganismos de diferentes classes, como fungos e bactérias, possibilitando a incubação de explantes livres desses agentes contaminantes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de contaminação, oxidação fenólica e regeneração de brotos no estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares isolados de *seedlings* de noqueira-pecan submetidas a um manejo fisiológico e sanitário, sobretudo o estiolamento de brotações apicais.

### **3.2 Material e Métodos**

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### 3.2.1 Plantas doadoras de explantes

Ao todo, foram utilizadas 40 mudas obtidas de sementes (*seedlings*) da cultivar ‘Barton’, com aproximadamente 2 anos e 3 meses de idade e cultivadas em sacos de polietileno pretos, com 50 cm de altura (3,9 L), contendo como substrato uma mistura de material orgânico e solo mineral. As sementes para a produção das mudas foram oriundas de polinização aberta em um pomar comercial localizado no município de Cachoeira do Sul, RS.

### 3.2.2 Manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras de explantes

Por 19 semanas antes à incubação dos explantes, as plantas doadoras permaneceram em casa de vegetação, onde foram fertirrigadas com uma solução nutritiva contendo 2,3 g L<sup>-1</sup> de uma fórmula NPK 16-5-16 na dose de 100 mL por planta a cada 7 dias e a irrigadas a cada 2 dias com a dose de igual volume. A formulação e a frequência da fertirrigação foram adotadas após a constatação da baixa condutividade elétrica (CE) do lixiviado (de 0,8 a 1,2 mS), obtido através do método *Pour Thru* (Cavins *et al.*, 2000), em cinco mudas ao acaso, indicando um nível de nutrientes insuficiente para sustentar um rápido crescimento. De acordo com estes mesmos autores, a faixa de condutividade elétrica considerada normal para a maioria das plantas em crescimento varia de 2,6 a 4,6 mS.

Essas plantas foram submetidas a uma poda drástica com o auxílio de uma tesoura de poda e padronizadas a uma altura de, aproximadamente, 40 cm acima do nível do substrato. Posteriormente, foram transferidas para uma câmara do tipo *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) a  $5 \pm 2$  °C, na ausência de luz, onde permaneceram por 15 dias para vernalização e suplementação das horas de frio necessárias à superação da dormência e posteriormente estimular suas brotações.



Após esse período de vernalização, e a fim de obter brotações apicais estioladas (Apêndice 1A), as plantas foram mantidas no escuro sob temperatura constante de  $30 \pm 2$  °C, sendo essa condição monitorada com o auxílio de um termostato acoplado a um aquecedor elétrico de cerâmica, instalados no interior de uma câmara com isolamento térmico (Apêndice 1B). A coleta de brotações, iniciada após 10 dias de manutenção das mudas nessas condições, ocorreu quando estas apresentavam aproximadamente 2 cm de comprimento, medida adotada como padrão, sendo excisadas com uma lâmina de bisturi. Tanto para os procedimentos de poda drástica, como para os de coleta das brotações estioladas, as ferramentas de corte utilizadas foram desinfestadas com etanol a 70% (v/v) a cada incisão, a fim de evitar a transmissão de microrganismos entre as plantas e brotações.

Em função da desuniformidade das brotações, as coletas ocorreram a cada três dias, ao longo de 15 dias e foram precedidas (em 24h) pela aplicação de um fungicida sistêmico e de contato a base dos ingredientes ativos Metalaxil + Mancozeb (0,12 e 1,92 g L<sup>-1</sup>). Após a coleta, essas brotações foram imediatamente submersas em uma solução de água deionizada com 1 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, para prevenir a desidratação e a oxidação na região dos cortes, até serem levadas imediatamente ao laboratório.

### **3.2.3 Desinfestação superficial das brotações estioladas**

Até esta etapa, as mudas receberam os mesmos tratamentos e, a partir de observações feitas em testes preliminares, um método distinto dos protocolos usuais, ou seja, uma etapa etílica seguida por hipoclorito de sódio (NaClO), foi elaborado para a desinfestação superficial das brotações estioladas. Desta forma, a etapa etílica foi substituída por dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) e a etapa com NaClO foi mantida, mas em

diferentes concentrações como uma forma de observar a sua ação, constituindo os estudos deste trabalho, exemplificados na Tabela 1 e descritos a seguir.

### 3.2.3.1 Estudo I

Neste estudo, a desinfestação consistiu em 30 min em solução contendo ClO<sub>2</sub> a 0,007% (i.a.), seguida de 10 min em NaClO a 1,5% (i.a.), ambas sob agitação.

### 3.2.3.2 Estudo II

Já neste estudo, a etapa com ClO<sub>2</sub> foi mantida, ou seja, 30 minutos em solução a 0,007% (i.a.), seguida de 10 min em NaClO com uma menor concentração, sendo 1% (i.a.), ambas sob agitação.

TABELA 1. Descrição da concentração dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição utilizados para a desinfestação superficial em estudos com brotações estioladas de *seedlings* de noqueira-pecan [*Carya Illinoensis* (Wangenh.) C. Koch].

Estudos	Descrição dos agentes e etapas da desinfestação superficial
I	ClO <sub>2</sub> 0,007% por 30 min + NaClO 1,5% por 10 min
II	ClO <sub>2</sub> 0,007% por 30 min + NaClO 1% por 10 min

Posteriormente, em ambos os estudos, foi realizada a tríplice lavagem com água deionizada e autoclavada em câmara de fluxo laminar. Os estudos foram conduzidos em um intervalo de 30 dias a partir de explantes coletados das mesmas plantas doadoras.

### 3.2.4 Meios de cultura e incubação dos explantes

Com o auxílio de um bisturi, foi realizada a excisão do segmento apical e do segmento nodal logo abaixo ao ápice (1º segmento nodal) com aproximadamente 5,0 mm de comprimento, contendo uma gema no terço superior (Figura 1A e 1B), consistindo nos tratamentos. Esse procedimento foi realizado sobre diferentes pontos de folhas de papel toalha autoclavado, uma brotação por folha.

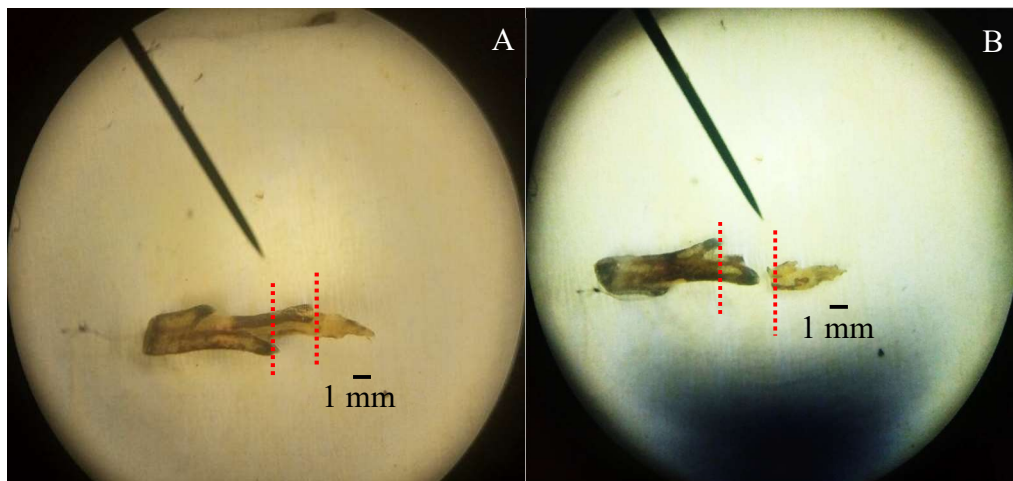


FIGURA 1. Brotação estiolada de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch dividida de acordo com a localização das gemas em segmento apical e 1º segmento nodal (A) e representação da excisão do segmento apical (B) com aproximadamente 5 mm de comprimento.

Dois meios de cultura foram utilizados para diferentes fases dos estudos, sendo eles o meio BDS (Dunstan; Short, 1977) e o meio WPM (Lloyd; McCown, 1980), ambos avaliados por outros pesquisadores para o estabelecimento de explantes de noqueira-pecan. A substituição do meio de cultura foi adotada após a constatação da oxidação dos brotos em protrusão, sendo atribuído aos componentes do meio de cultura.

A incubação e o primeiro subcultivo foram realizados em tubos de ensaio, um explante por tubo, contendo 10 mL de meio de cultura BDS a 100% da concentração de sais, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 13,32 µM de benzilaminopurina (BAP), 0,02 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma) e pH ajustado para 5,8. O meio de cultura adotado foi baseado no protocolo de Corte-Olivares, Phillips e Butler-Nance (1990) e a concentração de BAP no protocolo de Renukdas, Manoharan e Garner (2010).

A partir do segundo subcultivo (60 dias), foram utilizados frascos de volume de 200 mL, contendo 30 mL de meio de cultura WPM a 100% da concentração de sais, acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de glicose, 13,32 µM de benzilaminopurina (BAP), 3,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e pH ajustado para 5,7, com base no protocolo de Renukdas, Manoharan e

Garner (2010). Nessa etapa, os explantes foram cultivados de forma coletiva, ou seja, quatro explantes por frasco.

A cada preparo de meio de cultura, o pH foi ajustado antes da autoclavagem a 121 °C, 1,2 atm. de pressão durante 15 min. Os recipientes com os explantes foram acondicionados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 24 a 29 °C e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **3.2.5 Variáveis analisadas e método estatístico**

As avaliações foram feitas a cada 30 dias, período em que também foram feitos os subcultivos, e finalizadas aos 150 dias após a incubação. Foram contabilizados os explantes com a presença de micélio de fungos; colônias bacterianas; oxidação e regeneração de brotos, além do número de brotos por explante.

Considerou-se oxidado aquele explante com escurecimento dos tecidos e regenerado aquele que, mesmo oxidado, apresentou a protrusão de brotos. A avaliação da oxidação foi realizada com base no escurecimento iniciado na região dos cortes, comprometendo 50% ou mais da área do tecido do explante e aqueles que posteriormente tiveram, além do explante, os seus brotos oxidados. Explantes com brotos verdes não foram contabilizados como oxidados.

Os estudos foram conduzidos em delineamento de blocos inteiramente casualizados, tomando como fator de bloqueamento o período de coleta das brotações estioladas, avaliando a brotação estiolada em 2 níveis (segmento apical e 1º segmento nodal), constituindo nos tratamentos. O Estudo I foi constituído por cinco blocos e o Estudo II, quatro blocos, com oito explantes por parcela. O tratamento controle não foi considerado, visto que em testes preliminares com explantes não estiolados, houve a constatação de contaminação por microrganismos em 100% dos explantes.

Os dados correspondentes às variáveis dependentes foram submetidos a análise de regressão logística devido às características binárias (presença/ausência) de probabilidade de ocorrência em função das variáveis independentes (explante/bloco) e o grau de significância foi aferido seguindo uma distribuição Qui-quadrado.

Todas as manipulações e análise de dados foram realizadas usando o software XLSTAT, versão 2019.4.1.

### 3.3 Resultados e discussão

Quanto as variáveis analisadas, após a incubação até o último subcultivo realizado aos 120 dias, obtiveram-se os seguintes resultados:

#### 3.3.1 Estudo I

De acordo com a análise de regressão logística, observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos (segmento apical e 1º segmento nodal) para a contaminação fúngica durante o período de 120 dias de avaliações, bem como para a contaminação bacteriana. Já para as variáveis regeneração, durante todo o período, e oxidação, exceto aos 60 dias, não houve diferença significativa (Tabela 2).

TABELA 2. Análise da regressão logística do estabelecimento inicial e subcultivos do segmento apical e 1º segmento nodal isolados de *seedlings* de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch submetidas à manejo fisiológico e sanitário (Estudo I) ( $p < 0,05$ ).

Variáveis analisadas	Contaminação				Oxidação		Regeneração	
	Fúngica		Bacteriana		Qui-quadrado	Pr	Qui-quadrado	Pr
	Qui-quadrado	Pr	Qui-quadrado	Pr				
30 dias	10,565	0,001	4,644	0,031	0,102	0,749	0,616	0,432
60 dias	10,565	0,001	4,644	0,031	9,234	0,002	0,830	0,362
90 dias	10,565	0,001	4,644	0,031	0,247	0,619	0,066	0,797
120 dias	10,565	0,001	4,644	0,031	0,247	0,619	0,066	0,797

Até os 120 dias, os maiores percentuais de contaminação fúngica foram observados nos segmentos nodais (21,19%). Não houve a manifestação da contaminação bacteriana até os 15 dias após a incubação e, após esse período, ocorreu em ambos os tratamentos, ainda assim, em baixos níveis, manifestada até o segundo subcultivo (60 dias), sem novas ocorrências a partir de então.

Quanto a regeneração, já aos sete dias após a incubação, foi possível observar a protrusão de brotos nos segmentos apicais (Figura 2), sendo observado nos segmentos nodais a partir dos 15 dias, não diferindo estatisticamente desde então, provavelmente em função de um equilíbrio do balanço hormonal entre os explantes e o meio de cultura e, conseqüentemente, uma melhora na reação dos segmentos nodais.

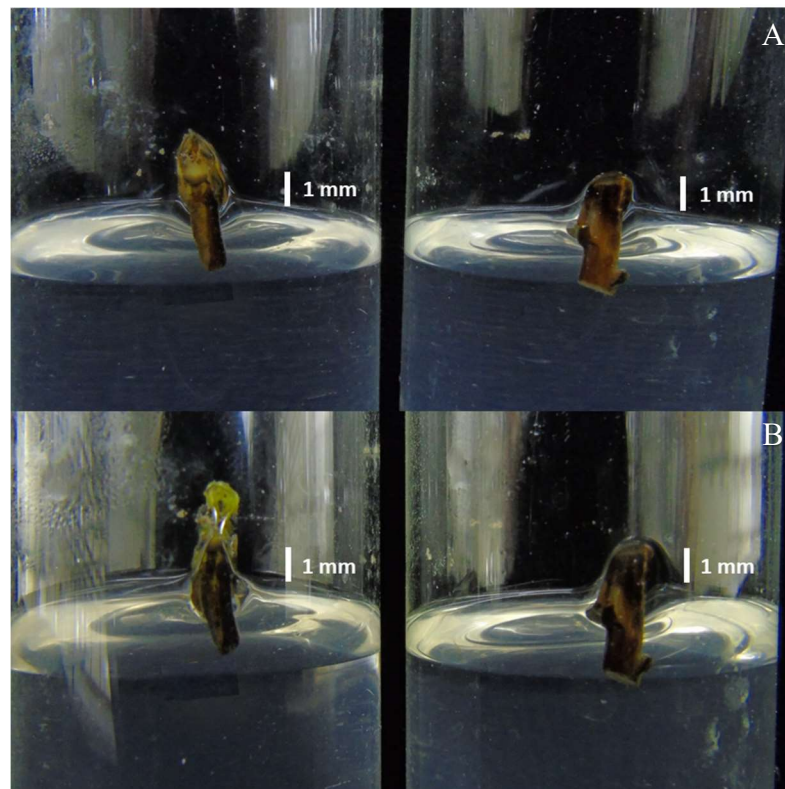


FIGURA 2. Aspecto do segmento apical (Esquerda) e 1º segmento nodal (Direita) logo após a incubação (A) e início da regeneração de brotos no segmento apical e aumento da oxidação no segmento nodal aos 7 dias após a incubação (B), excisados de brotações estioladas de *seedlings* de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch submetidas à manejo fisiológico e sanitário.

Após o quarto subcultivo (120 dias), toda a quarta coleta (Bloco 4) referente ao Tratamento 1 foi perdida para a contaminação exógena, caracterizado pelo crescimento micelial de fungos sobre um ponto da superfície do meio de cultura e que se desenvolveu rapidamente em todo o frasco. Essa é uma das desvantagens do cultivo de explantes de forma coletiva em frascos com maior capacidade de volume de meio de cultura, comparado ao cultivo em tubos, visto que o tempo de manipulação para a acomodação de vários explantes e a superfície de abertura do frasco são maiores, favorecendo a entrada de microrganismos.

### 3.3.2 Estudo II

Assim como no Estudo I, a regressão logística demonstrou diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis contaminação fúngica e contaminação bacteriana, além da regeneração até os 120 dias. Para a variável oxidação, não houve diferença significativa durante todo o período de avaliações (Tabela 3).

TABELA 3. Análise de regressão logística do estabelecimento inicial e subcultivos do segmento apical e 1º segmento nodal isolados de *seedlings* de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch submetidas à manejo fisiológico e sanitário (Estudo II) ( $p < 0,05$ ).

Variáveis analisadas	Contaminação				Oxidação		Regeneração	
	Fúngica		Bacteriana		Qui-quadrado	Pr	Qui-quadrado	Pr
	Qui-quadrado	Pr	Qui-quadrado	Pr				
30 dias	13,563	0,000	6,824	0,009	2,664	0,103	16,358	<0,0001
60 dias	13,563	0,000	8,991	0,003	0,659	0,417	12,024	0,001
90 dias	13,563	0,000	8,991	0,003	0,698	0,403	12,198	0,000
120 dias	13,563	0,000	8,991	0,003	1,796	0,180	16,055	<0,0001

A contaminação fúngica manifestou-se somente nos segmentos apicais em uma média de 12,50%. Esse fato pode ser explicado como consequência de uma higienização inadequada das brotações estioladas, etapa que antecedeu a desinfestação superficial. Isso

porque nos segmentos apicais estão presentes os primórdios foliares que são de difícil remoção, além de ser uma região com densa pilosidade, o que dificulta o contato dos agentes desinfestantes, sobretudo em menor concentração de NaClO, conforme a metodologia adotada nesse estudo (Figura 3).

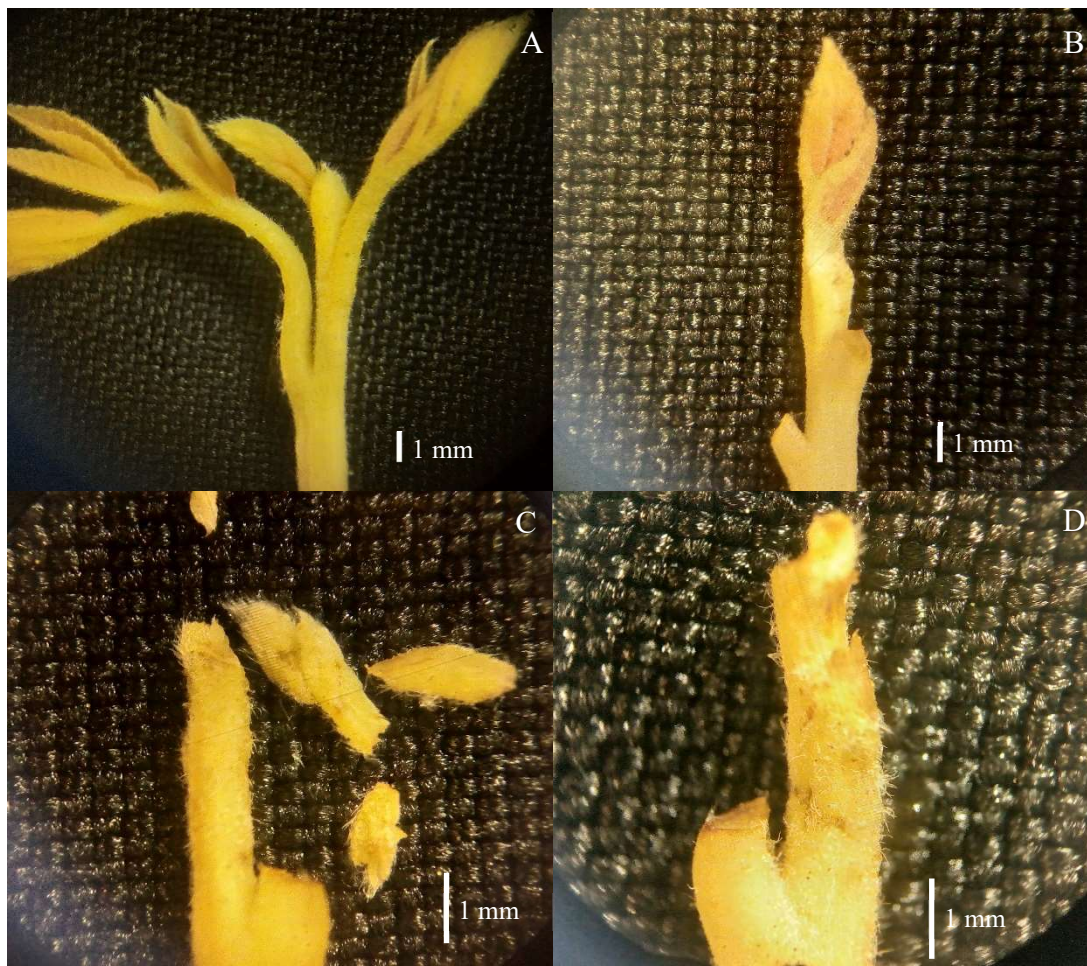


FIGURA 3. Etapas do procedimento de higienização de uma brotação estiolada de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch, realizado previamente à desinfestação superficial, por meio da retirada das folhas (A, B) e dos primórdios foliares do segmento apical (C, D).

Essa suposição baseia-se nos resultados dos estudos de Knox e Smith (1980) que, utilizando microscopia eletrônica, concluíram que tecidos jovens de noqueira-pecan, obtidos após um rápido crescimento, são livres de fungos endofíticos desde o ápice até 5 cm abaixo, enquanto os tecidos mais velhos continham hifas fúngicas nos espaços intercelulares. Sendo assim, considerando que esse percentual de contaminação do Estudo



II teve origem superficial, a associação de um detergente concentrado às soluções durante a etapa de desinfestação superficial pode auxiliar na redução desses índices de contaminação, diminuindo a tensão superficial e melhorando a capacidade de penetração dos agentes desinfestantes. Quanto à contaminação bacteriana, diferentemente do Estudo I, ocorreu somente nos segmentos nodais e em baixos níveis (2,5%).

Em relação à oxidação, os resultados obtidos em ambos os estudos foram possíveis mediante algumas adequações. Em estudos preliminares, essa variável foi desencadeada pela agressividade dos agentes utilizados nos protocolos usuais de desinfestação superficial, ou seja, uma combinação da etapa etílica com a etapa de NaClO. Mesmo em um curto tempo de exposição a diferentes concentrações desses agentes, houve um acentuado escurecimento dos tecidos (Figura 4A e 4B). No entanto, o uso isolado de etanol ou NaClO em diferentes concentrações, apesar de reduzir o escurecimento superficial, não foi eficiente ao controle da contaminação por microrganismos (Dados não publicados). Em segmentos apicais estiolados de mudas de abacateiro (*Persea americana* Mill. 'Hass') (Lauraceae), também houve altos índices de escurecimento superficial após uma combinação de agentes no processo de desinfestação, utilizando, entre outros, o NaClO a 2% (i.a.) por 10 min, ocasionando a necrose e morte de 100% desses explantes (Restrepo Osorio *et al.*, 2018).

Muitas vezes, os produtos utilizados para a desinfestação superficial podem danificar de forma irreversível o tecido vegetal que será utilizado como explante (Casales; Van der Watt; Coetzer, 2018). Provavelmente as brotações estioladas sejam mais suscetíveis a danos causados por esses agentes, visto que, de acordo com Fachinello *et al.* (1995), brotações herbáceas apresentam baixo grau de lignificação, e o estiolamento, por sua vez, inibe este processo (Biasi, 1996), por meio da inibição de enzimas precursoras de lignina (Taiz *et al.*, 2017), tornando os tecidos mais sensíveis. Diante disso, nos

Estudos I e II, a etapa etílica foi excluída e substituída por  $\text{ClO}_2$  diluído em uma solução aquosa a uma concentração de 0,007% (i.a.), sendo a indicada pelo fabricante de um produto comercial para a higienização em atividades de pós-colheita.

Com a adoção dessa metodologia, o escurecimento superficial das brotações também foi observado, mas de forma menos intensa (Figura 4C). Já o uso isolado de  $\text{ClO}_2$  na mesma concentração e com a mesma finalidade em um estudo realizado paralelamente, não provocou nenhum escurecimento, entretanto, essa concentração não foi eficaz no controle da contaminação por microrganismos (Dados não publicados). Ainda assim, o seu uso em protocolos de desinfestação superficial é promissor, uma vez que, de acordo com Sigrist (2007), o  $\text{ClO}_2$  é duas vezes e meia mais efetivo que o  $\text{NaClO}$  sobre os microrganismos. Além disso, sua eficácia sobre a alteração da permeabilidade da membrana desses agentes contaminantes é comprovada (Srebernich, 2007). Esse tipo de característica pode facilitar a ação de outros agentes desinfestantes.

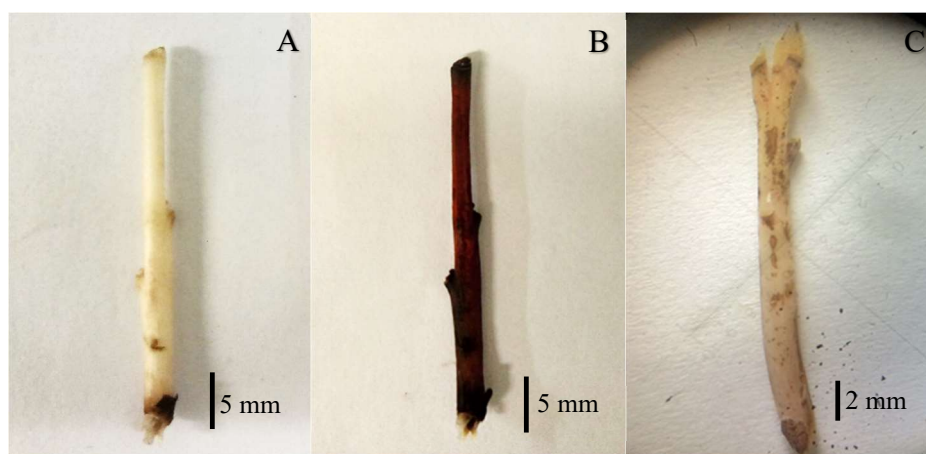


FIGURA 4. Aspectos de uma brotação estiolada de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch antes (A) e após desinfestação superficial em etanol a 70% (v/v) por um min, seguido de  $\text{NaClO}$  a 1,5% (i.a.) por 10 min (B) e com a adequação do protocolo, sendo utilizado  $\text{ClO}_2$  a 0,007% (i.a.) por 30 min, seguido de  $\text{NaClO}$  1,5% (i.a.) por 10 min (C).

Após a incubação, mesmo com a adequação do protocolo de desinfestação superficial, observou-se a oxidação, mas que não foi um impeditivo para a regeneração

de brotos nos explantes. Acreditou-se que os índices iniciais dessa variável, observadas no Estudo I, fossem desencadeados pela agressividade do NaClO aos tecidos dos explantes. Diante disso, optou-se pela elaboração do Estudo II, onde adotou-se uma menor concentração desse agente. Ainda assim, essa metodologia não reduziu os índices dessa variável, mas pode ter contribuído com a regeneração de brotos por sua ação menos agressiva aos tecidos dos explantes. Nesse estudo, observou-se que a regeneração ocorreu de forma mais homogênea entre os tratamentos, podendo ter relação também com as condições fisiológicas das plantas doadoras de explantes e os níveis endógenos de citocinina, já que ambos os estudos foram realizados com as mesmas plantas em um intervalo de 30 dias. Pereira *et al.* (2015), em seus estudos com bananeira (*Musa* sp. 'Farta Velhaco') (Musaceae), observaram altos índices de oxidação dos explantes (80%), mesmo após a adoção de uma menor concentração de cloro ativo na desinfestação superficial (1% i.a.), e nesse caso não ocasionou a morte e permitiu o desenvolvimento e a continuidade dos estudos *in vitro*, assim como observado nos explantes estiolados de noqueira-pecan.

Posteriormente, em ambos os estudos, após o primeiro subcultivo ocorrido aos 30 dias para o mesmo meio de cultura, observou-se que os brotos originados da regeneração foram tomados por um escurecimento de aspecto semelhante à base do explante oxidado, evoluindo até a sua necrose (Figura 5A) e, em alguns casos, calos. Esse fato foi observado em grande parte dos explantes que haviam regenerado, sendo mais evidente nos segmentos apicais do Estudo I, exemplificado pela diferença significativa entre os tratamentos aos 60 dias (Tabela 2), comprometendo o efetivo alongamento desses explantes. Mesmo com o aspecto necrótico dos brotos, optou-se pelo subcultivo desses explantes em uma nova formulação do meio de cultura, a fim de observar a sua reação.

Adotou-se o meio WPM, com base no protocolo estabelecido por Renukdas, Manoharan e Garner (2010) em seus estudos com explantes de *seedlings*.

Após essa substituição foi possível observar durante a avaliação no subcultivo seguinte (90 dias), diferentes fases da regeneração dos explantes. Aqueles que apresentaram grande parte do tecido oxidado desde o início do experimento (Figura 5B), bem como os que iniciaram a regeneração e tiveram suas brotações acometidas pela oxidação (Figura 5C), começaram a regenerar. Já os que se desenvolviam normalmente em meio BDS, emitiram múltiplas brotações em meio WPM (Figura 5D).

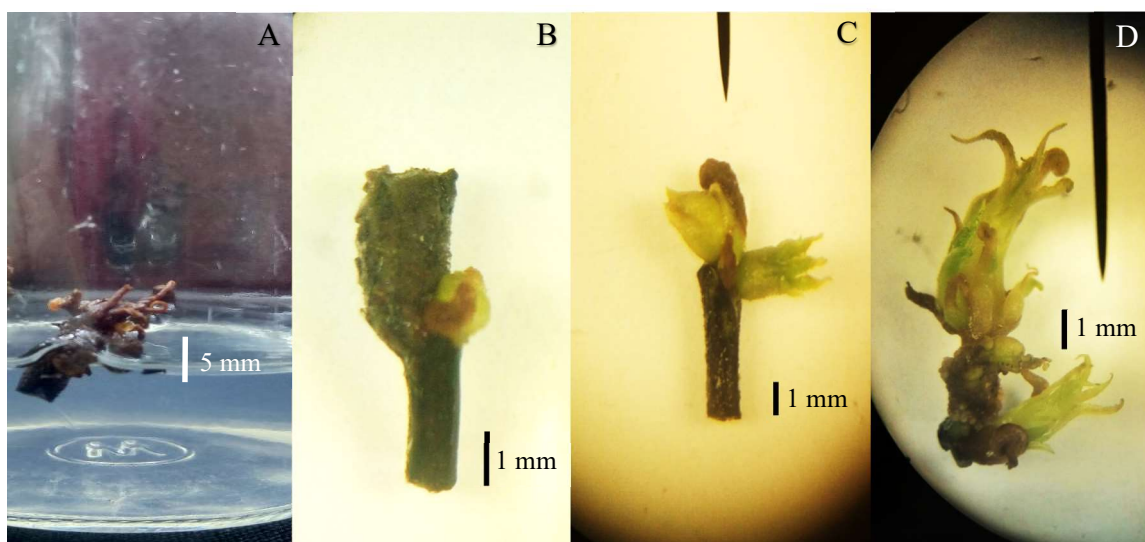


FIGURA 5. Resposta dos explantes caulinares estiolados de *seedlings* de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch 30 dias após incubação em meio de cultura BDS (A) e a retomada da regeneração em diferentes fases 30 após subcultivo para o meio de cultura WPM (90 dias após a incubação).

Na literatura, não há menção de grandes problemas por oxidação fenólica em explantes caulinares de noqueira-pecan, provavelmente pela impossibilidade de avaliação dessa variável devido à rápida e alta incidência de contaminação por fungos, relatada nos estudos. Uma das explicações poderia ser baseada em informações quanto ao estímulo de enzimas relacionadas à síntese de compostos fenólicos, provocada por injúrias nos explantes quando expostas aos agentes desinfestantes (Taiz *et al.*, 2017). No entanto,

esses resultados podem ser atribuídos a uma reação dos tecidos do explante aos componentes do meio de cultura, uma vez que, em um estudo preliminar semelhante, utilizando segmentos apicais estiolados fornecidos pelas mesmas plantas doadoras e o mesmo protocolo de desinfestação, diferindo quanto à utilização do meio de cultura WPM desde a incubação, não foi observada a ocorrência desse problema (Dados não publicados). Essa hipótese é sustentada, pois, ao estiolamento também é atribuída a redução de compostos fenólicos (Grattapaglia; Machado, 1998), constatado nos estudos com *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) que, além desses compostos, a técnica também proporcionou uma redução significativa de peroxidase e polifenol oxidase, entre outras enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo (Krishna *et al.*, 2008).

A maior eficiência do meio WPM sobre a micropropagação de espécies lenhosas é atribuída a sua composição salina, além de uma maior disponibilidade de vitaminas (Grattapaglia; Machado 1998). O meio BDS é caracterizado por apresentar cerca de 1,4 vezes mais sais em relação ao meio WPM, sobretudo potássio e nitrato. Oliveira *et al.*, (2010) salientam quanto à necessidade da adoção de um meio de cultura de acordo a presença de reguladores de crescimento e a composição mineral dos próprios tecidos dos explantes. Além disso, demonstraram em seu estudos que a presença e o tipo de citocinina no meio de cultura afeta a absorção de vários elementos pelo explante. Nesse sentido, diante da falta de informações sobre as condições fisiológicas dos explantes oriundos de brotações estioladas, as hipóteses para a oxidação e necrose dos brotos após a incubação são a elevada concentração de citocinina, já que foi baseado em um protocolo onde adotou-se material não estiolado, e o acúmulo de elementos no explante fornecidos pelo meio de cultura mais salino, alguns deles podendo estar até mesmo em níveis tóxicos. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), para a fase de estabelecimento, é recomendado um meio com menor concentração de sais e citocinina.

Em relação a regeneração de brotos, o tipo de explante influenciou o início da resposta morfogênica no Estudo I, provavelmente em função do nível endógeno de auxina nos segmentos apicais, sendo responsável pela maior velocidade em relação aos segmentos nodais. Em ambos os estudos, foi obtida uma média de um broto por explante a partir do terceiro subcultivo (90 dias). Esse resultado provavelmente foi afetado devido ao processo oxidativo observado anteriormente, o que representa um atraso para a fase de multiplicação, justificando a necessidade de adequações.

A maior taxa de multiplicação foi observada a partir do quinto e último subcultivo, ou seja, aos 150 dias após a incubação, 90 dias após a substituição para o meio WPM e 30 dias após o subcultivo. Obteve-se uma proporção média de 4,1 brotos por segmento apical e 2,5 brotos por segmento nodal no Estudo I. Já no Estudo II, a média foi de 1,4 e 1,1, respectivamente. No entanto, não houve diferença significativa para essa variável entre segmentos apicais e nodais em ambos os estudos (Tabela 4). Hansen e Lazarte (1984), a partir de segmentos nodais extraídos de *seedlings* com dois meses de idade, obtiveram uma média de 1,5 broto por explante em um único subcultivo, utilizando o meio WPM líquido suplementado com 13,32  $\mu\text{M}$  de BAP. Já Renukdas, Manoharan e Garner (2010), utilizando o mesmo meio de cultura, obtiveram uma média de 9,66 brotos (cultivar ‘Cape Fear’) e 9,33 brotos (cultivar ‘Desirable’) após três semanas de cultivo de segmentos nodais de plântulas originadas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos.

TABELA 4. Resultados obtidos após 150 dias de estabelecimento de segmentos apicais (T1) e segmentos nodais (1º logo abaixo aos segmentos apicais) (T2) isolados de brotações de *seedlings* de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch submetidas à manejo fisiológico e sanitário.

Estudo I					
Tratamentos	Contaminação		Oxidação (%)	Regeneração (%)	Proporção média de brotos:explante
	Fúngica (%)	Bacteriana (%)			
T1	3,87	4,17	37,14	62,86	4,10
T2	21,19	5,82	52,24	47,76	2,50
Qui-quadrado	8,233	8,533	1,752	0,435	1,028
Valor P	0,004	0,003	0,186	0,510	0,560
Estudo II					
T1	12,50	0	33,20	66,80	1,14
T2	0,00	2,50	64,50	35,50	1,12
Qui-quadrado	10,565	4,644	1,834	0,350	1,028
Valor P	0,001	0,031	0,176	0,554	0,560

Embora não tenham sido comparados estatisticamente, visualmente os explantes estabelecidos do Estudo 2 apresentaram uma melhor aparência em relação aos do Estudo 1 (Figura 6). Ainda assim, nesse último, alguns genótipos se destacaram em relação a proporção de brotos por explante, havendo casos onde foi possível a repicagem de 18 brotos de um único segmento apical e 15 de um único segmento nodal. Esse fato deve ser avaliado com maior precisão em trabalhos posteriores, por meio da identificação dos genótipos, ou seja, a marcação das plantas doadoras de explantes, e o acompanhamento do seu padrão de multiplicação *in vitro*, a fim de identificar os genótipos superiores que possibilitem maiores taxas de multiplicação e, conseqüentemente, um maior número de mudas clonais em menos tempo. Outra recomendação é a condução de estudos com clones, ou seja, plantas doadoras de explantes geneticamente idênticas, a fim de isolar a variabilidade entre plantas como o fator responsável pelas diferenças observadas.

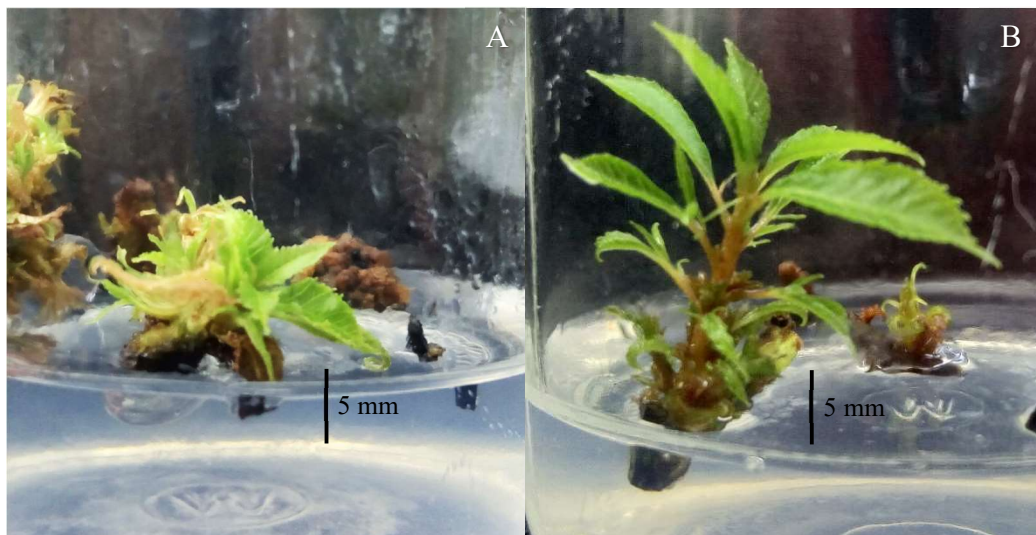


FIGURA 6. Regeneração de brotos após 120 dias de incubação de segmentos nodais isolados de brotações estioladas de *seedlings* de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch, submetidos a dois diferentes métodos de desinfestação superficial, consistindo em  $\text{ClO}_2$  a 0,007% (i.a.) por 30 min, seguido de NaClO 1,5% (i. a.) por 10 min (A) e  $\text{ClO}_2$  a 0,007% (i. a.) por 30 min, seguido de NaClO 1,0% (i. a.) por 10 min (B).

Os resultados que merecem destaque se referem à contaminação, sobretudo a bacteriana. Os índices apresentados aos 150 dias para a contaminação fúngica em ambos os estudos, estabilizaram-se aos 15 dias, ou seja, não houve a contabilização de novos explantes contaminados por fungos a partir de então. O mesmo não ocorreu para a contaminação bacteriana dos segmentos nodais no Estudo II, onde a manifestação de bactérias ocorreu até os 60 dias, atribuídos a sua latência. De acordo com Van den Houwe e Swennen (2000), microrganismos associados aos espaços intercelulares dos tecidos vegetais (endofíticos) não são expostos à desinfestação superficial e podem permanecer sem se expressarem por longos períodos devido à latência. Ainda assim, os resultados chamam a atenção quanto ao baixo percentual e até mesmo à ausência de contaminação por bactérias no caso dos segmentos apicais do Estudo II (Tabela 4), diferentemente do que é comumente relatado na literatura com estudos *in vitro* de espécies lenhosas.

De acordo com George e Sherrington (1984), o nível de contaminação aceitável na fase de estabelecimento *in vitro* é 10%. Para bananeira (Musaceae), uma das culturas



mais propagadas comercialmente por cultura de tecidos, os índices aceitos são de 15 a 20%, independente da cultivar (Embrapa, 2012). No caso de espécies lenhosas, a redução dos índices de contaminação para o estabelecimento *in vitro* de florestais de grande importância econômica, a nível experimental, foi possível mediante o uso de agentes que merecem cautela, como o  $\text{HgCl}_2$  na desinfestação superficial de *Pinus tecunumanii* (Pinaceae), reduzindo a contaminação fúngica à 16,7% (Zanella *et al.*, 2018) e a inclusão do antibiótico Cefotaxima ao meio de cultura durante quatro subcultivos para constatar a eliminação da contaminação bacteriana em explantes de genótipos adultos de um híbrido do gênero *Juglans* (Juglandaceae) (Licea-Moreno, 2016).

Na micropropagação de noqueira-pecan, há relatos de contaminação fúngica na ordem de 20% após três semanas da incubação de segmentos nodais isolados de plântulas obtidas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos (Renukdas; Manoharan; Garner, 2010). Em outro estudo, o menor índice de contaminação em segmentos nodais isolados de *seedlings* foi 30%, atribuídos à desinfestação superficial com etanol e  $\text{HgCl}_2$  (Yang *et al.*, 2017). Wood (1982) relata o controle parcial da contaminação por microrganismos endofíticos no estabelecimento de segmentos nodais de *seedlings*, mas foi necessário adicionar ao meio de cultura o antibiótico estreptomina (antes da autoclavagem) e o fungicida pimaricina (após a autoclavagem). Diante dessas informações, os altos índices de contaminação no estabelecimento *in vitro* da espécie acabam inviabilizando a micropropagação comercial ou são possíveis mediante a protocolos onerosos e trabalhosos.

Em relação a fase de multiplicação, o nível máximo admitido por subcultivo é de 2% (Costa; Scherwinski-Pereira; Otoni, 2010). Nos estudos que compõem este trabalho, como não houve a expressão de microrganismos em ambos os tratamentos durante os subcultivos do Estudo I, bem como nos ápices e após os 60 dias para os segmentos nodais

do Estudo II, infere-se que o percentual de contaminação nos subcultivos seguintes foi zero, estando de acordo com o preconizado por esses autores. Nos trabalhos com noqueira-pecan disponíveis na literatura, conforme anteriormente relatados, os índices de contaminação durante os subcultivos não foram abordados, o que dificulta uma comparação. Além disso, em ambos os estudos, as diferenças significativas entre os segmentos apicais e nodais para as variáveis de contaminação refletem os percentuais obtidos logo após a incubação, justificando a viabilidade de adoção de ambos os explantes.

Ainda que esse material tenha apresentado baixa ou nenhuma manifestação de contaminação bacteriana, uma detecção de bactérias latentes através da indexagem é recomendada. Essa técnica permite, através da transferência de segmentos dos explantes para meios bacteriológicos específicos, a manifestação de diferentes contaminantes mesmo quando em pouca quantidade (Costa; Scherwinski-pereira; Otoni, 2010). Desta forma, é possível garantir se o estiolamento de brotações fornece explantes axênicos ou não.

Pasqual *et al.* (2010) relata que a contaminação por microrganismos tem prejudicado a pesquisa científica devido a redução do número de explantes viáveis para a condução de experimentos. Este mesmo autor sugere, como uma forma de estratégia para contornar essas perdas, a geração de informações importantes através da condução de experimentos com *seedlings* e, posteriormente, replicá-las em material adulto. Sendo assim, os resultados aqui apresentados constituem a primeira menção sobre a utilização do estiolamento de brotações como parte de um manejo fisiológico e sanitário para a obtenção de baixos índices de contaminação por microrganismos no estabelecimento de noqueira-pecan *in vitro*, servindo de suporte para futuros trabalhos, como por exemplo, a adequação na fase de multiplicação e o estabelecimento de material adulto.

Ainda que a clonagem *in vitro* de genótipos adultos, ou seja, em fase de produção de frutos, não ocorra com a brevidade esperada, este método apresentado para a obtenção de um material propagativo livre de contaminação por microrganismos, aliado às adequações necessárias, sobretudo a redução do período de estabelecimento até a multiplicação e aclimatização, torna viável a micropropagação a partir de exemplares jovens. Desta forma, laboratórios comerciais serão capazes de produzir grande quantidade de porta-enxertos geneticamente uniformes e com sanidade garantida.

### 3.4 Conclusões

É possível obter explantes caulinares com baixos níveis e, até mesmo, livres de contaminação por fungos e bactérias na fase de estabelecimento *in vitro*, utilizando-se como fonte as brotações de *seedlings* de *C. illinoensis*, submetidas a um manejo fisiológico e sanitário. No entanto, o protocolo precisa ser adequado para minimizar os efeitos da oxidação e promover uma maior regeneração de brotos nos explantes.

### 3.5 Referências

- ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 5, p. 467–470, 2005.
- BIASI, L. A. Emprego do estiolamento na propagação de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p.309-314, 1996.
- CASALES, F. G.; VAN DER WALLT, E.; COETZER, G. M. Propagation of Pecan (*Carya illinoensis*): A review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 17, n. 18, p. 586–605, 2018.
- CAVINS, T. J. *et al.* **Monitoring and managing pH and EC using the PourThru extraction method**. Raleigh: North Caroline State University/College of Agriculture & Life Sciences, 2000. 17 p. (Horticulture Information Leaflet, 590).
- COSTA, M. G. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. *In*: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (ed.). **Contaminações microbianas**

**na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas.** Brasília, DF: Embrapa, 2010. cap. 1. p. 17-59.

CORTE-OLIVARES, J.; PHILLIPS, G. C.; BUTLER-NANCE, S. A. Micropropagation of pecan. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 25, n. 10, p. 1308, 1990.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal:** Parte 1 - células e tecidos. 2. ed. São Paulo: Roca, 1986. 304 p.

DOMÍNGUEZ-AVILA, J. A. *et al.* The pecan nut (*Carya illinoensis*) and its oil and polyphenolic fractions differentially modulate lipid metabolism and the antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diets. **Food Chemistry**, London, v. 168, p. 529–537, 2015.

DUNSTAN, D. I.; SHORT, K. C. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 41, n. 1, p. 70–72, 1977.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Produção de mudas micropropagadas de bananeira.** Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical, 2012. 14 p. (Circular Técnica, 37).

FACHINELLO, J. C. *et al.* **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado.** 2. ed. Pelotas: UFPEL - Ed. Universitária, 1995. 179 p.

FERREIRA, M. G. R. *et al.* Desinfestação de explantes radiculares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Saber Científico**, Porto Velho, v. 2, n. 2, p. 56-62, dez. 2009.

FRONZA, D.; POLETTO, T.; HAMANN, J. J. **O cultivo da noqueira-pecã.** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2015. 301 p.

FRONZA, D.; HAMANN, J. J. **Técnicas para o cultivo da noqueira-pecã.** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2016. 424 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture:** handbook and directory of commercial laboratories. Basingstoke: Exegetics, 1984.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In:* TORRES, A. C. *et al.* **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** (ed.) Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.

HANSEN, K. C.; LAZARTE, J. E. In vitro propagation of pecan seedlings. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 19, p. 237-239, 1984

HAROON, A. **Propagation of pecan (*Carya illinoensis*) using *in vitro* techniques.** 2010. 222 f. Thesis (Doctorate Degree of Philosophy) - Department of Botany, University of the Punjab, Lahore, 2010.

KNOX, C. A. P.; SMITH, R. H. A scanning electron microscope study of healthy pecan tissues showing the presence or absence of internal fungal contamination. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Cambridge, v. 16, n. 8, p. 651–654, 1980.

KRISHNA, H. *et al.* Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 118, n. 2, p. 132–138, 2008.

LICEA-MORENO, R. J. **Application of forest biotechnology for Walnut wood production**. 2016. 207 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 2016.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, Carlisle, v. 30, p. 421–427, 1980.

OLIVEIRA, L. M. de *et al.* Effects of cytokinins on *in vitro* mineral accumulation and bud development in *Annona glabra* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1439–1445, 2010.

PASQUAL, M. *et al.* Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHRWINSKI-PEREIRA, J. E. (ed.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2010. cap. 2, p. 61-161.

PEREIRA, G. A. *et al.* Desinfestação *in vitro* da bananeira “farta velhaco (sub grupo aab)” em diferentes concentrações de cloro ativo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 4, p. 64–69, 2015.

POLETTO, T. *et al.* Métodos de superação de dormência da semente de noqueira-pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 39, n. 6, p.1111-1118, 2015.

RENUKDAS, N. N.; MANOHARAN, M.; GARNER, J. O. Jr. *In vitro* propagation of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch]. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 211–215, 2010.

RESTREPO OSORIO, C. *et al.* *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass) through morphogenesis. **Acta Agronómica**, Palmira, v. 67, n. 1, p. 162–169, 2018.

SIGRIST, J. M. M. Tecnologia soluciona limitações enfrentadas por PMPs. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 7, p. 103–105, 2007.

SREBERNICH, S. M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 744–750, 2007.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S; BUSO, J.

A. (ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p. 133-145.

VAN DEN HOUWE, I.; SWENNEN, R. Characterization and control of bacterial contaminants *in vitro* cultures of banana (*Musa* spp.). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 530, n. 1, p. 69–79, 2000.

WARREN, C. J. **Evaluation of different propagation methods (budding, grafting and cuttings) for pecan**. 2015. 48 f. Thesis (Master of Science) Texas A&M University, [College Station, Texas], 2015.

WOOD, B. W. In vitro proliferation of pecan shoots. **HortScience**, Alexandria, VA, n. 17, p. 890-891, 1982.

YANG, H. *et al.* Preliminary study on tissue culture of stem segments in *Carya illinoensis*. **Nonwood Forest Research**, Zhuzhou, v. 2, p. 226–230, 2017.

ZANELLA, L. B. *et al.* Micropropagation of *Pinus tecunumanii*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 651–660, 2018.

## **4 CAPÍTULO 2**

**Ensaio para o estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares isolados de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch submetidos a manejo fisiológico e sanitário**

## RESUMO

O interesse em produzir os frutos da noqueira-pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] é crescente em diversas regiões do mundo. No entanto, a implantação de pomares requer mudas de excelente qualidade, como uniformidade genética e padrão morfológico. Para isso, a produção comercial de mudas precisa sofrer adequações e a micropropagação pode oferecer subsídios para isso, por meio da multiplicação de genótipos com características superiores. No entanto, a técnica é dificultada por problemas comuns ao estabelecimento de espécies lenhosas, principalmente a contaminação por microrganismos. Desta forma, o objetivo foi avaliar a viabilidade do manejo fisiológico e sanitário por meio do emprego de tratamentos preventivos, sobretudo o estiolamento, em plantas doadoras de explantes de genótipos adultos de *C. illinoensis* e sua eficácia sobre o desempenho desse material *in vitro*. Para isso, utilizaram-se mudas enxertadas que foram mantidas em casa de vegetação e fertirrigadas, inicialmente, a cada 15 dias. Após uma poda drástica, essas mudas foram submetidas a um período de vernalização e, a fim de estimular brotações estioladas, foram mantidas no escuro sob temperatura constante ( $30 \pm 2$  °C). Diferentes protocolos de desinfestação superficial, bem como de meio de cultura encontrados na literatura para a espécie foram adotados, constituindo os estudos desse capítulo. Além do número de brotos, foram contabilizados o seu comprimento e número de gemas e, após a incubação dos explantes *in vitro*, a presença de micélio de fungos, colônias bacterianas, oxidação e regeneração de brotos nos explantes. Os dados foram apresentados em números absolutos, percentuais e, quando possível, analisados estatisticamente por regressão logística. Após uma avaliação preliminar, constatou-se a viabilidade do estiolamento sobre as plantas doadoras e o fornecimento de explantes, bem como sua adoção como um tratamento preventivo, possibilitando a incubação de explantes com baixíssimos índices de contaminação fúngica. Contudo, a contaminação bacteriana não foi controlada totalmente. Além disso, foi possível constatar que a oxidação fenólica pode ser contornada associando a técnica de estiolamento a um meio de cultura específico na fase do estabelecimento dos explantes. Concluiu-se que é possível obter o estabelecimento *in vitro* de explantes de genótipos adultos, submetidos ao manejo fisiológico e sanitário, com baixos índices de contaminação por fungos, mas a técnica necessita de adequações para a obtenção de menores índices de contaminação bacteriana e uma maior proporção de brotos por explante.



## 4.1 Introdução

O interesse em produzir frutos da noqueira-pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] é crescente em diversas regiões do mundo. Nos últimos anos, houve um considerável aumento do seu cultivo no Brasil, principalmente no estado do Rio Grande do Sul (Bilharva *et al.*, 2018), onde a espécie é favorecida, principalmente, pela adaptação edafoclimática (Fronza; Hamann, 2016). Ainda assim, a produção é inferior ao necessário para o atendimento da demanda de consumo do mercado brasileiro (Bilharva *et al.*, 2018), denotando que o aumento de áreas e/ou de produtividade dos pomares é imprescindível.

Diante da qualidade das mudas ofertadas atualmente, há uma demanda por maior uniformidade genética e padrão morfológico das mesmas (Fronza; Hamann, 2016). Por se tratar de um investimento de longo prazo, a implantação de um pomar da espécie requer um alto rigor, o que justifica a necessidade de oferta de mudas de qualidade. No entanto, algumas deficiências no processo de produção comercial de mudas precisam ser superadas, visto que há muitas dificuldades na propagação sexuada, especialmente quanto à produção de porta-enxertos homogêneos (Poletto *et al.*, 2015; Warren, 2015).

As características de interesse nas plantas de noqueira-pecan são mantidas por clonagem que, atualmente, é realizada por enxertia, sendo o único método viável de propagação comercial de mudas da espécie (Nesbitt; Goff; Stein, 2002). Os porta-enxertos, por sua vez, são propagados por sementes e, conseqüentemente, são heterogêneos em função da segregação. Com isto, podem ocorrer variações no crescimento e no desempenho geral da árvore (Warren, 2015), havendo indicações de que os porta-enxertos exercem algum controle sobre a dormência das gemas e rendimento dos frutos (Knox; Smith, 1981). Desta forma, desde o início do século XX busca-se a adequação dos métodos de produção de porta-enxertos clonais, por estaquia, e de mudas

clonais pela enxertia (Warren, 2015), e mais recentemente através da cultura de tecidos (Knox; Smith, 1981; Wood, 1982), de forma a garantir uma grande quantidade de plantas geneticamente uniformes.

De acordo com Thompson e Grauke (2012), há um grande potencial para a multiplicação clonal de genótipos elites de noqueira-pecan pelas técnicas de cultivo *in vitro*. Nos estudos com a espécie, houve um avanço nos protocolos por organogênese direta, sobretudo nas fases de estabelecimento e multiplicação (Knox; Smith, 1981; Wood, 1982; Hanzen; Lazarte, 1984; Renukdas; Manoharan; Garner, 2010). No entanto, não há garantia da manutenção do genótipo da planta doadora de propágulos, já que os resultados mais promissores nas diferentes fases que compõem a micropropagação foram obtidos a partir de explantes de exemplares jovens (plântulas obtidas da germinação de sementes *in vivo* e de embriões zigóticos *in vitro*).

A ampla variabilidade genética pode ser superada através da micropropagação a partir de explantes retirados de indivíduos elite fenotipados a campo, visto que as características genéticas são conhecidas, diferentemente da clonagem a partir de embriões zigóticos ou mudas com seus aspectos vegetativos e produtivos ainda a serem avaliados (Bonga, 1987). Entre as vantagens, estão a uniformização de características entre plantas e a fixação de atributos desejáveis, como a resistência a doenças, tolerância a salinidade ou nanismo. Além disso, este método também pode abreviar o tempo de produção comercial de mudas, através da obtenção de indivíduos sem a necessidade de enxertia.

No entanto, de acordo com Ballester, Sanchez e Vieitez (1989), os explantes isolados de indivíduos adultos diferem consideravelmente quanto à capacidade de micropropagação em comparação a *seedlings*. Além disso, há um grande desafio a ser superado quanto aos níveis elevados de contaminação do meio de cultura ocasionado por microrganismos endofíticos de explantes isolados de indivíduos adultos (Mantovani;

Franco, 1998). Em função disso, para a viabilidade da micropropagação, torna-se imprescindível a realização de diversos testes preliminares e adequações nos protocolos, a começar pelas fases que antecedem a seleção e o estabelecimento dos explantes.

Na literatura, vários pré-tratamentos são propostos para superar as limitações no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas. Entre eles, a manutenção das plantas doadoras de explantes em ambiente protegido; a aplicação periódica de fungicidas, bactericidas e inseticidas; o acondicionamento em substrato esterilizado; o acompanhamento do estado nutricional das plantas; a aplicação de um tratamento de vernalização no caso de espécies de clima temperado e o estiolamento de brotações (Grattapaglia; Machado, 1998). Esses três últimos baseiam-se em um princípio básico bem conhecido da micropropagação, a saber, que o estado fisiológico da planta matriz exerce grande influência na capacidade de seus propágulos se estabelecerem *in vitro* (Grattapaglia; Machado, 1998).

A micropropagação de noqueira-pecan a partir de explantes de exemplares adultos já foi explorada, indicando que há potencial, apesar dos problemas por contaminação (Corte-olivares; Phillips; Butler-nance, 1990). No entanto, independentemente da fonte dos explantes, os estudos de micropropagação por organogênese direta não mencionam a adoção do manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras de explantes. Aqueles envolvendo explantes coletados de *seedlings* relatam apenas a manutenção das plantas em casa de vegetação (Wood, 1982; Hansen; Lazarte, 1984) e, além disso, a aplicação de uma solução fungicida (Ávila-Treviño *et al.*, 2013), sem tratamentos preventivos adicionais. Nos estudos com genótipos adultos, Corte-olivares, Phillips e Butler-nance (1990) realizaram a coleta dos explantes diretamente a campo.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade do manejo fisiológico e sanitário, sobretudo o estiolamento, em genótipos adultos de *C. illinoensis*

e seus efeitos sobre a oxidação e contaminação por microrganismos no estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares.

## **4.2 Material e métodos**

Foram executados ensaios com a incubação de segmentos apicais e nodais *in vitro*, isolados de mudas enxertadas por meio de um estudo preliminar e após serem submetidas a um manejo fisiológico e sanitário, a saber: o estabelecimento de explantes caulinares isolados de brotações jovens de plantas mantidas em casa de vegetação; a inclusão do estiolamento e o seu efeito sobre a emissão de brotações e os níveis de contaminação em quatro cultivares; o efeito de duas condições de luz sobre a emissão de brotações e os níveis de contaminação em uma cultivar; o estabelecimento e os níveis de contaminação de diferentes tamanhos de explantes caulinares estiolados.

### **4.2.1 Plantas doadoras de explantes**

Como fonte de explantes, em três dos quatro estudos realizados, foram utilizadas 40 plantas doadoras da cultivar ‘Barton’ com aproximadamente 2 anos de idade. Em outro estudo, onde buscou-se observar as diferentes respostas entre as cultivares sob estiolamento, foram utilizadas 10 plantas doadoras por cultivar com aproximadamente dois anos de idade, sendo elas: ‘Stuart’, ‘Barton’, ‘Choctaw’ e ‘Shawnee’. Em ambos os casos, as mudas foram obtidas por meio da enxertia de propágulos de indivíduos adultos sobre porta-enxertos das cultivares ‘Elliot’ e ‘Barton’, respectivamente, obtidos por sementes oriundas de polinização aberta.

As plantas estavam acondicionadas em sacos de polietileno pretos, com 50 cm de altura (5,6 L), contendo como substrato uma mistura de material orgânico e solo mineral

e foram irrigadas a cada dois dias, 100 mL por planta. As sementes para a produção dos porta-enxertos, bem como os propágulos para a enxertia, foram obtidas de exemplares selecionados em um pomar comercial localizado no município de Cachoeira do Sul, RS.

#### **4.2.2 Manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras de explantes**

As plantas matrizes foram mantidas em casa de vegetação e fertirrigadas com uma solução nutritiva contendo  $2,3 \text{ g L}^{-1}$  de uma fórmula NPK 16-5-16 na dose de 100 mL por planta e tratadas preventivamente com uma solução contendo um fungicida sistêmico e de contato a base dos ingredientes ativos Metalaxil + Mancozeb ( $0,12$  e  $1,92 \text{ g L}^{-1}$ ), aplicada com pulverizador manual (500 mL). As frequências desses tratamentos diferiram e outras etapas foram incluídas, consistindo nas metodologias dos estudos que estão descritos ao longo deste capítulo.

A cada início de um novo estudo, essas plantas foram submetidas a uma poda drástica cerca de 15 cm acima do ponto de enxertia, a fim de estimular a emissão de novas brotações do enxerto para o fornecimento dos explantes.

Exceto na avaliação preliminar realizada no Estudo I, nos demais estudos adotou-se como etapas do manejo fisiológico e sanitário um período de vernalização e o estiolamento das brotações após a poda drástica. A vernalização consistiu na exposição das plantas por um período de 15 dias a uma temperatura de  $6 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , na ausência de luz em uma câmara fria, totalizando 408 horas de frio. A fim de obter brotações apicais estioladas (Apêndice 1A), essas plantas foram transferidas para uma câmara escura sob temperatura constante de  $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  (Apêndice 1B).

Em todos os estudos, as brotações coletadas foram imediatamente submersas em uma solução de água deionizada com  $1 \text{ g L}^{-1}$  de ácido ascórbico, para prevenir a desidratação e a oxidação do material vegetal, até serem levadas ao laboratório.

### **4.2.3 Desinfestação superficial, incubação e acondicionamento dos explantes**

A desinfestação superficial foi constituída por um protocolo específico em cada estudo que compõe este capítulo. Independentemente do protocolo adotado, ao final da desinfestação superficial, as brotações foram submetidas a uma tríplice lavagem com água deionizada e autoclavada em câmara de fluxo laminar.

No processo de produção dos meios de cultura, o pH foi ajustado antes da autoclavagem a 121 °C, 1,2 atm. de pressão, durante 15 minutos.

Após o procedimento de incubação, os recipientes com os explantes foram acondicionados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 24 a 29 °C e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Em função da baixa disponibilidade de material propagativo para o fornecimento de explantes e a impossibilidade de avaliar diferentes combinações, em cada estudo adotou-se um protocolo específico de incubação, independentemente dos resultados e da possibilidade de adequação do protocolo adotado no estudo anterior. Essa foi a forma encontrada de explorar alguns protocolos abordados na literatura para espécie, a fim de facilitar a discussão e gerar um maior número de informações preliminares para adequações em futuros trabalhos. Para facilitar a compreensão, esses protocolos, as metodologias de manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras e as etapas de desinfestação superficial e incubação dos explantes estão compiladas de acordo com cada estudo no Apêndice 2.

**Estudo I – Avaliação preliminar do fornecimento de explantes de genótipos adultos a partir de mudas enxertadas de *Carya illinoensis*, cv. ‘Barton’, e seu estabelecimento *in vitro***

Devido à ausência de informações básicas da micropropagação de indivíduos adultos, realizou-se uma avaliação preliminar quanto à possibilidade de utilização de mudas enxertadas como fornecedoras de explantes e seu estabelecimento *in vitro*. Para isto, utilizou-se como fonte de explantes as mudas da cultivar ‘Barton’ enxertadas sobre a cultivar ‘Elliott’, mantidas em casa de vegetação. A frequência de adubação com a fórmula descrita anteriormente foi quinzenal e, após a poda drástica, as brotações que se desenvolveram foram tratadas com a solução de fungicida, 10 dias antes da sua coleta, em uma única aplicação. Neste caso, não foi adotado um padrão de tamanho das brotações para a sua coleta e a subsequente incubação *in vitro*.

Após a coleta, essas brotações foram higienizadas através de uma desfolha e lavadas em água corrente por cerca de 10 min. Posteriormente, foram submetidas a uma desinfestação superficial que consistiu em etanol a 70% (v/v) por 1 min e hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% (i.a.) contendo 0,35% de Tween 20<sup>®</sup> por 10 min, ambas sob agitação.

Foram utilizados como explantes os segmentos apicais e nodais, consistindo nos tratamentos. Quanto a posição do segmento nodal, apenas o primeiro logo abaixo ao segmento apical foi adotado. Os explantes foram isolados com aproximadamente 5 mm de comprimento, contendo uma gema no terço superior.

A incubação desses explantes foi realizada em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) a 70% da concentração de sais, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 4,4 µM de benzilaminopurina (BAP), 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup> (Sigma) e pH ajustado para 5,8. Esse meio de cultura foi adotado por ser usual na micropropagação de diversas espécies e pouco explorado em trabalhos com nogueira-pecan.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições contendo seis explantes cada, um explante por tubo. Após transcorridos 7, 15 e 30 dias, foram contabilizados os explantes com a presença de micélio de fungos ou sinais de colônias bacterianas. A variável analisada foi a contaminação fúngica, uma vez que, em função da velocidade do desenvolvimento do micélio de fungos, não foi possível a avaliação de outras variáveis. Os dados estão apresentados em percentuais.

Ao final deste período, para identificação visual dos fungos a nível de gênero, foram preparadas lâminas com o corante azul de lactofenol a partir de fragmentos das hifas fúngicas que se desenvolveram sobre os explantes de ambos os tratamentos. A morfologia dos esporos foi comparada com as descrições na literatura especializada (Barnett; Hunter, 1972).

### **Estudo II – Fornecimento de explantes de genótipos adultos a partir de mudas enxertadas de quatro cultivares de *Carya illinoensis* submetidas à manejo fisiológico e sanitário e seu estabelecimento *in vitro***

A partir deste estudo, foram incluídas as etapas de vernalização e o estiolamento das brotações como manejo fisiológico e sanitário. O objetivo foi avaliar o efeito do estiolamento sobre a emissão de brotações e os níveis de contaminação e oxidação desse material *in vitro*, utilizando indivíduos de quatro cultivares de noqueira-pecan como plantas doadoras de explantes. Em função do período do ano da condução deste estudo, realizou-se uma vernalização para suplementar as horas de frio necessárias à superação do período de dormência dessas plantas e posteriormente estimular suas brotações. Para isso, o segundo grupo de plantas foi utilizado, constituído pelas cultivares ‘Stuart’, ‘Barton’, ‘Choctaw’ e ‘Shawnee’. Diferentemente do estudo anterior, as brotações foram tratadas regularmente com a solução fungicida, por meio de aplicações semanais.



A coleta das brotações estioladas ocorreu quando estas apresentavam cerca de 10 cm de comprimento. Em função da desuniformidade das brotações, foram realizadas coletas subsequentes com intervalo de 7 dias e interrompidas quando, durante o período em que permaneceram na câmara escura, algumas mudas apresentaram aspectos de injúrias e senescência pela ausência de luz.

A desinfestação superficial das brotações consistiu em 30 segundos sob agitação em solução de água deionizada contendo 0,5% de Tween 20<sup>®</sup>, seguida de 1 min em etanol a 50% (v/v) e 10 min em NaClO a 1,5% (i.a.). A etapa inicial utilizando uma solução com Tween isoladamente e não em conjunto com o NaClO como é comumente empregado, foi adotado com base no protocolo de Wood (1982).

Foram utilizados como explantes os segmentos apicais e todos os segmentos nodais ao longo da brotação estiolada de acordo com o seu comprimento, como uma forma de mensurar se haveria diferença nos níveis de contaminação dos explantes desde a base da brotação até o ápice. Todos os explantes foram excisados com aproximadamente 5,0 mm de comprimento, contendo uma gema no terço superior. A fim de minimizar os efeitos da oxidação fenólica nas regiões excisadas que foram constatadas no estudo anterior, esse procedimento foi realizado sobre uma placa de Petri com a brotação submersa em uma solução com água deionizada e carvão ativado a 3 g L<sup>-1</sup>, uma excisão por placa, para evitar a transferência de microrganismos entre explantes. Somente para fins de ilustração, este procedimento foi realizado ao longo da brotação em uma mesma placa (Figura 1). Tanto a solução com carvão ativado, quanto as placas de Petri utilizadas, foram previamente autoclavadas.

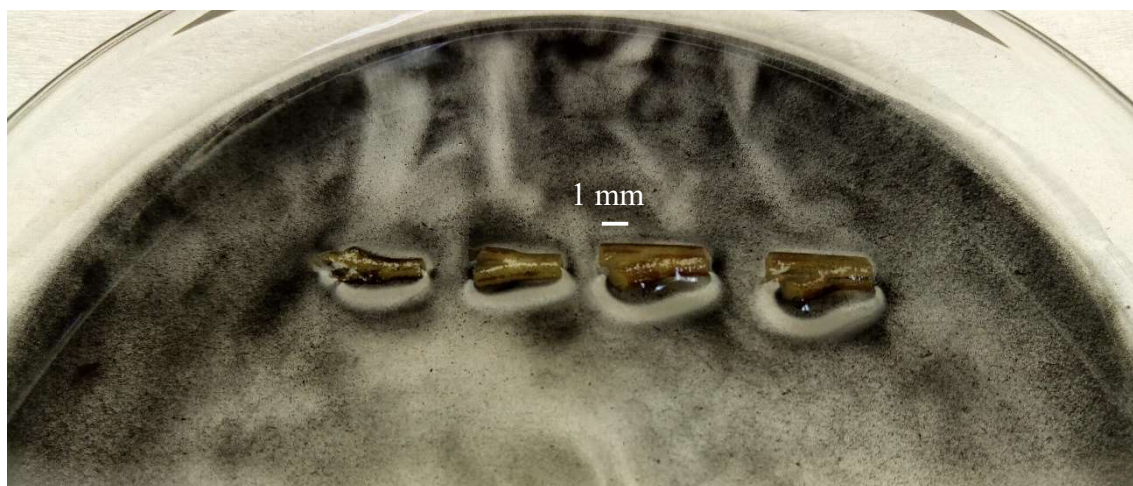


FIGURA 1. Ilustração da excisão do segmento apical e segmentos nodais de uma brotação estiolada de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch sobre uma solução autoclavada contendo carvão ativado a  $3 \text{ g L}^{-1}$  de água deionizada.

A incubação desses explantes foi realizada em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS a 70% da concentração de sais, acrescido de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $17,76 \text{ }\mu\text{M}$  de benzilaminopurina (BAP),  $4,92 \text{ }\mu\text{M}$  de ácido indolbutírico (AIB),  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel<sup>®</sup> e pH ajustado para 5,8. Foi adotado o mesmo meio de cultura utilizado no estudo anterior, com a inclusão de uma auxina. A concentração de citocinina foi baseada na maior proliferação de brotos obtido nos estudos de Wood (1982).

Referente à técnica de estiolamento, seus efeitos foram estimados por cultivar através da contabilização de brotações estioladas a cada coleta e apresentados em números absolutos. Quanto aos estudos *in vitro*, após transcorridos 7, 15 e 30 dias, bem como durante os subcultivos para o mesmo meio de cultura aos 60 e 90 dias após a incubação, foram avaliadas a presença de micélio de fungos ou sinais de colônias bacterianas sob ou sobre os explantes e os resultados foram apresentados em percentuais.

**Estudo III – Fornecimento de explantes de genótipos adultos a partir de mudas enxertadas de *Carya illinoensis*, cv. ‘Barton’, sob manejo fisiológico, sanitário, condições de luz e seu estabelecimento *in vitro***

Diferentemente do estudo anterior, onde a adubação foi realizada a cada 15 dias, neste estudo, esta foi realizada semanalmente. Essa prática foi adotada após a constatação da baixa condutividade elétrica (CE) do lixiviado (de 1,0 a 1,4 mS), obtido por meio do método *Pour Thru* (Cavins *et al.*, 2000), em cinco mudas selecionadas aleatoriamente, indicando um nível de nutrientes insuficiente para sustentar um rápido crescimento das plantas.

Para este estudo, foram utilizadas as plantas da cultivar ‘Barton’ enxertadas sobre a cultivar ‘Elliot’. Após a poda drástica, essas plantas foram divididas em dois grupos de 20 plantas cada e submetidas a dois ambientes com diferentes condições de luz, onde permaneceram por 32 dias. Essa prática foi adotada a fim de avaliar o desempenho dessas plantas quanto às variáveis das brotações, bem como o estabelecimento *in vitro* dos explantes isolados, após a submissão das mudas ao escuro em comparação com mudas mantidas em condições de luminosidade de uma casa de vegetação.

Para isso, o escuro do qual parte das plantas foi submetido, ocorreu em uma câmara de crescimento sem iluminação sob temperatura intermitente, sendo constante a  $30 \pm 2$  °C por 16 horas (das 8 às 24h). O outro grupo de 20 plantas permaneceu em casa de vegetação sob fotoperíodo natural e com temperatura média diurna de 30,4 °C durante o mesmo período. A temperatura média noturna em ambas as situações foi de 19 °C. Essa metodologia foi adotada para manter os dois ambientes sob condições semelhantes de temperatura, isolando o fator de interesse (luminosidade).

Após 15 dias nestes ambientes, procedeu-se a primeira coleta e avaliação de variáveis das brotações e que foram repetidas a cada 8 dias, totalizando três períodos de

coletas e incubações *in vitro*. As variáveis avaliadas foram: o número de brotações; o comprimento médio das brotações e proporção de gemas por brotação.

Em relação aos estudos *in vitro*, a cada coleta, as brotações foram submetidas a uma desfolha e a desinfestação superficial consistiu por 3 min em uma solução de água deionizada, acrescido de 0,5% de Tween e por 20 min em NaClO a 1% (i.a.), ambas sob agitação.

Os segmentos apicais e segmentos nodais foram excisados com aproximadamente 5,0 mm de comprimento, contendo uma gema no terço superior. Esse procedimento foi realizado sobre diferentes pontos de folhas de papel toalha autoclavado, uma brotação por folha.

Os explantes foram incubados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio BDS (Dunstan; Short, 1977) a 100% da concentração de sais, acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 4,44 µM de benzilaminopurina (BAP), 0,02 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, pH ajustado para 5,8. Esse meio de cultura foi adotado com base no protocolo desenvolvido por Corte-Olivares, Phillips e Butler-Nance (1990).

Após transcorridos 30 dias e nos subcultivos realizados em intervalos de mesmo período, foram avaliadas a presença de micélio de fungos ou sinais de colônias bacterianas sob ou sobre os explantes, bem como a oxidação, avaliada por meio do escurecimento da região dos cortes, comprometendo 50% ou mais da área do explante. Os resultados estão apresentados em números absolutos e percentuais.

**Estudo IV – Tamanho de segmentos apicais e nodais isolados de plantas doadoras de genótipos adultos de *Carya illinoensis* submetidas à manejo fisiológico e sanitário e seus efeitos no estabelecimento *in vitro***

A fim de obter um maior número de explantes livres de contaminação por microrganismos, o objetivo desse estudo foi testar dois diferentes tamanhos de segmentos apicais isolados de brotações estioladas. Visto que nos estudos mencionados anteriormente foi demonstrado que a contaminação se manifesta em diferentes níveis ao longo da brotação, os segmentos nodais foram excisados seguindo a mesma metodologia, objetivando avaliar sua capacidade regenerativa em função do seu tamanho e acompanhar os níveis de contaminação ao longo da brotação estiolada.

Diferentemente dos estudos anteriores, a coleta das brotações estioladas foi precedida em 48h pela aplicação do fungicida sobre as mesmas. Após a coleta, a desinfestação superficial das brotações estioladas consistiu em 10 min em solução de água deionizada contendo 0,5% de Tween, seguida de 10 min em NaClO a 1,5% (i.a.), ambas sob agitação.

Em uma câmara de fluxo laminar, foi realizada a excisão dos segmentos apicais e dos segmentos nodais com o auxílio de um bisturi, contendo uma gema no terço superior com diferentes comprimentos, sendo de aproximadamente 2 a 4 mm e de 4 a 6 mm. Cada explante foi excisado sobre diferentes pontos de folhas de papel toalha autoclavado.

Os explantes foram incubados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio WPM (Lloyd; Mccown, 1980) a 100% da concentração de sais, acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de glicose, 3,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, 13,32 µM de benzilaminopurina (BAP), pH ajustado para 5,7. O meio de cultura foi adotado com base no protocolo desenvolvido por Renukdas, Manoharan e Garner (2010).

Os explantes foram subcultivados a cada 30 dias de forma coletiva em frascos com volume de 200 mL, contendo 30 mL do mesmo meio de cultura, quatro explantes por frasco.

A avaliação ocorreu ao final de 90 dias, sendo contabilizadas a presença de micélio de fungos e colônias bacterianas. A oxidação foi contabilizada com base no escurecimento iniciado nas regiões dos cortes, comprometendo 50% ou mais da área do explante. A regeneração foi contabilizada com base naqueles explantes que, mesmo com aspecto de oxidação, apresentaram a protrusão de brotos. Esses explantes não foram contabilizados como oxidados.

Uma análise de regressão logística foi aplicada devido às características binárias (presença/ausência) das variáveis dependentes como uma forma de testar a probabilidade de ocorrência das mesmas sob a influência das características dos explantes e do período de coleta das brotações estioladas (blocos). O grau de significância foi aferido seguindo uma distribuição Qui-quadrado.

Todas as manipulações e análise de dados foram realizadas usando o software XLSTAT, versão 2019.4.1. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) adotado foi McFadden (1974).

#### **4.3 Resultados e discussão**

##### **Estudo I – Avaliação preliminar do fornecimento de explantes de genótipos adultos a partir de mudas enxertadas de *Carya illinoensis*, cv. ‘Barton’, e seu estabelecimento *in vitro***

Em ambos os tratamentos, aos sete dias, observou-se que possivelmente 16,7% dos explantes foram acometidos por colônias bacterianas ou de leveduras, não sendo possível a sua correta identificação e estimação ao longo das avaliações em função do rápido crescimento de hifas de fungos sobre os mesmos. Ao final de 30 dias de avaliações, 95,8% dos segmentos apicais e 100% dos segmentos nodais apresentaram contaminação

fúngica. Sendo assim, a contaminação bacteriana não foi considerada, pois ao final das avaliações, esse índice provavelmente estaria subestimado.

A estimativa da oxidação fenólica foi prejudicada devido aos altos índices de contaminação fúngica. Já aos sete dias após a incubação dos explantes, 83% dos segmentos apicais e 79% dos segmentos nodais estavam contaminados. Neste mesmo período, apenas a região da excisão dos explantes não contaminados foram passíveis de visualização de escurecimento, não sendo possível acompanhar a sua evolução ao longo do tecido do explante, independentemente do tratamento. Sendo assim, essa variável não foi mensurada.

Por meio da metodologia empregada para a identificação dos gêneros dos fungos, constatou-se a ocorrência do gênero *Fusarium* em 33% e *Penicillium* em 8,3% dos explantes de ambos os tratamentos. Não foi possível identificar com precisão o gênero de fungos predominantes, uma vez que, a identificação foi prejudicada devido à ausência de esporulação a partir do material coletado. Ambos os gêneros identificados têm sua ocorrência considerada comum no cultivo *in vitro* de plantas (Pasqual *et al.*, 2010). O gênero *Penicillium* é associado ao apodrecimento de sementes de algumas espécies florestais (Santos; Parisi, 2011). Quanto ao gênero *Fusarium*, este é considerado um agente etiológico de doenças em diversas espécies de plantas (Kimati *et al.*, 2005). Esse gênero é reconhecidamente um agente patogênico à noqueira-pecan, causando o tombamento de plântulas (Poletto *et al.*, 2014), sendo as espécies *F. oxysporum* e *F. solani* consideradas altamente patogênicos para a espécie (Alvidrez-Villarreal *et al.*, 2012). De acordo com esses mesmos autores, os gêneros *Fusarium* e *Penicillium*, entre outros, têm sua ocorrência associada a um inseto broqueador de troncos e galhos de noqueira-pecan em pomares mexicanos. Essa informação nos remete sobre a importância da manutenção das plantas doadoras de explantes em ambiente protegido para um maior controle

fitossanitário. Esses mesmos gêneros foram considerados comuns nos tecidos de flores femininas da espécie nos estudos realizados em pomares brasileiros por Poletto *et al.* (2014), sendo o gênero *Alternaria* o predominante. Esse último foi o único gênero constatado de forma endofítica em tecidos coletados em período de dormência da noqueira-pecan nos estudos de Knox e Smith (1980).

Uma das causas da elevada ocorrência de contaminação por fungos pode estar relacionada ao método de tratamento fitossanitário adotado nesse estudo. No momento da aplicação do fungicida, as plantas matrizes de noqueira-pecan apresentavam diferentes estágios de emissão das brotações nos ramos. A maior parte das mudas continham ramos com gemas inchadas e, em menor proporção, ramos com brotações de até 10 cm de comprimento. Como foi realizada uma única aplicação, esta metodologia provavelmente influenciou a efetividade de ação do fungicida, uma vez que havia grandes diferenças na superfície de contato para a absorção dos ingredientes ativos em cada planta matriz.

A não adoção de um tamanho padrão para a coleta ocorreu em função da heterogeneidade de emissão das brotações pelas plantas. Esse fator foi adequado nos estudos seguintes e deve ser considerado em futuros trabalhos, uma vez que, ao longo da brotação, pode haver diferenças dos níveis endógenos de fitormônios e de compostos fenólicos, bem como da população microbiana. Na ausência de um padrão, esses fatores podem ocasionar diferenças nas variáveis respostas. Nesse sentido, na busca pela definição de um protocolo replicável, os estudos devem atentar para um padrão e pela porção do propágulo que forneça explantes com os melhores índices para o seu estabelecimento e multiplicação.



**Estudo II – Fornecimento de explantes de genótipos adultos a partir de mudas enxertadas de quatro cultivares de *Carya illinoensis* sob manejo fisiológico e sanitário e seu estabelecimento *in vitro***

Referente ao número de brotações estioladas, as cultivares ‘Shawnee’ e ‘Barton’ emitiram uma média de cinco brotações a cada coleta ao longo de quatro e cinco coletas, respectivamente. A cultivar ‘Stuart’ emitiu uma média de quatro brotações a cada coleta ao longo de cinco coletas. Já a cultivar ‘Choctaw’, possibilitou apenas duas coletas, no entanto, uma maior média no número de brotos, onde todas as plantas forneceram um broto cada na primeira e oito na segunda coleta. Independentemente da cultivar, cada brotação, apresentando o comprimento adotado como padrão para as coletas, possibilitou o isolamento de uma média de cinco explantes, de acordo com a distribuição das gemas, consistindo em um segmento apical e quatro segmentos nodais.

Essas cultivares são consideradas as mais representativas nos pomares comerciais brasileiros (Mokochinski, 2015), sendo a ‘Barton’ a principal, justificada pela sua tolerância a sarna (*Venturia effusa*). No entanto, apesar do melhor desempenho dessa cultivar sobre a emissão de brotações estioladas, os resultados observados provavelmente refletem a variabilidade existente entre as plantas, desde aspectos relacionados à condição fisiológica de cada matriz, à influência do porta-enxerto e até mesmo entre as cultivares, não sendo beneficiados pelo estiolamento. Essas observações vão de encontro aos estudos de Wood (1996), onde as cultivares de noqueira-pecan diferiram em todas os parâmetros morfológicos avaliados, revelando uma diversidade substancial de características estruturais.

Quanto aos resultados obtidos após a incubação *in vitro*, a contaminação fúngica não foi constatada nos segmentos apicais e afetou menos de 10% dos demais segmentos das diferentes cultivares ao longo de todas as avaliações. Em relação à contaminação

bacteriana, os segmentos apicais das cultivares ‘Shawnee’ e ‘Barton’ permaneceram livres desse problema até a terceira e quarta coletas de brotações estioladas, respectivamente. Na cultivar ‘Choctaw’, este fato foi observado somente na primeira coleta e 17% na cultivar ‘Stuart’ neste mesmo período.

Nos segmentos nodais, observou-se que a contaminação bacteriana evoluiu ao longo das brotações, demonstrado pelo aumento do percentual desde o ápice até o último segmento nodal utilizado, bem como nos períodos mais tardios de coletas, e neste caso, possivelmente pela adaptação dos microrganismos às barreiras fisiológicas impostas pelo estiolamento, fato que ainda precisa ser esclarecido (Tabela 1). Um aumento na incidência de contaminação de acordo com a posição dos segmentos nodais não estiolados, isolados de mudas enxertadas, também foi observado no estabelecimento de avelã (*Corylus avellana* L.) (Betulaceae), não diferindo significativamente quanto ao período de coleta (Hand *et al.*, 2016).

TABELA 1. Percentual de contaminação bacteriana em função da posição dos segmentos nodais (PSgN), não apicais, e do período de coleta das brotações estioladas em ambiente sem luz a  $30\pm 2$  °C de genótipos adultos das cultivares ‘Choctaw’, ‘Shawnee’, ‘Stuart’ e ‘Barton’ de *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch.

Período de coleta (dias)	Cultivares															
	Choctaw				Shawnee				Stuart				Barton			
	PSgN (%)				PSgN (%)				PSgN (%)				PSgN (%)			
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
7	0	28	100	100	0	0	0	40	100	100	100	100	0	0	17	17
14	22	29	100	100	0	0	50	100	50	100	100	100	0	0	0	40
21	*	*	*	*	33	67	50	50	100	100	100	100	0	0	16	50
28	*	*	*	*	50	100	100	100	50	83	66	100	0	0	40	50
35	*	*	*	*	*	*	*	*	66	100	100	100	67	100	100	100

\* período em que não houve a emissão de brotações que possibilitassem a coleta.

Durante o período avaliado, a cultivar ‘Barton’ apresentou os resultados mais promissores, tanto em número de coletas de brotações estioladas com menores índices de

contaminação, quanto em menor percentual de explantes contaminados. No entanto, esses explantes, juntamente com todos os demais das outras cultivares que estavam isentos de contaminação até os 30 dias, apresentaram contaminação bacteriana ao longo dos três subcultivos posteriores. Esse fato pode ser atribuído a microrganismos que estavam latentes, uma vez que, de acordo com Grattapaglia e Machado (1998), é possível que os microrganismos endofíticos se expressem durante os subcultivos, em decorrência de adaptação ao meio de cultivo ou quando expostos a condições estressantes.

A manifestação tardia de bactérias endofíticas ao longo dos subcultivos nos explantes mais apicais em comparação aos mais basais, ou seja, a maior latência conferida a esses microrganismos em função da sua posição na brotação estiolada, nos levam a crer que o estiolamento proporciona barreiras físicas e/ou fisiológicas para a manifestação dos mesmos em uma velocidade diferente ao longo da brotação. Além disso, o estiolamento deve proporcionar uma menor população microbiana nos ápices, exigindo maior tempo para sua multiplicação e expressão.

A oxidação ficou limitada à região dos cortes, não evoluindo ao longo do tecido dos explantes (Figura 2). De acordo com Cid (2014), a oxidação é um problema com ocorrência frequente no cultivo *in vitro* de plantas perenes, desencadeado pela liberação de exsudados fenólicos e enzimas no meio em função da excisão do explante. Esse mesmo autor afirma que o carvão ativado tem a capacidade de adsorver esses fenóis. Sendo assim, a excisão dos explantes em uma solução contendo carvão ativado, pode ter contribuído para os baixos níveis de oxidação observados. Além disso, de acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o estiolamento tem sido associado com a redução das substâncias fenólicas. Esse fato poderá ser comprovado em trabalhos futuros, através da aplicação de protocolos de mensuração de polifenóis totais de brotações estioladas e não estioladas e a comparação dos resultados.

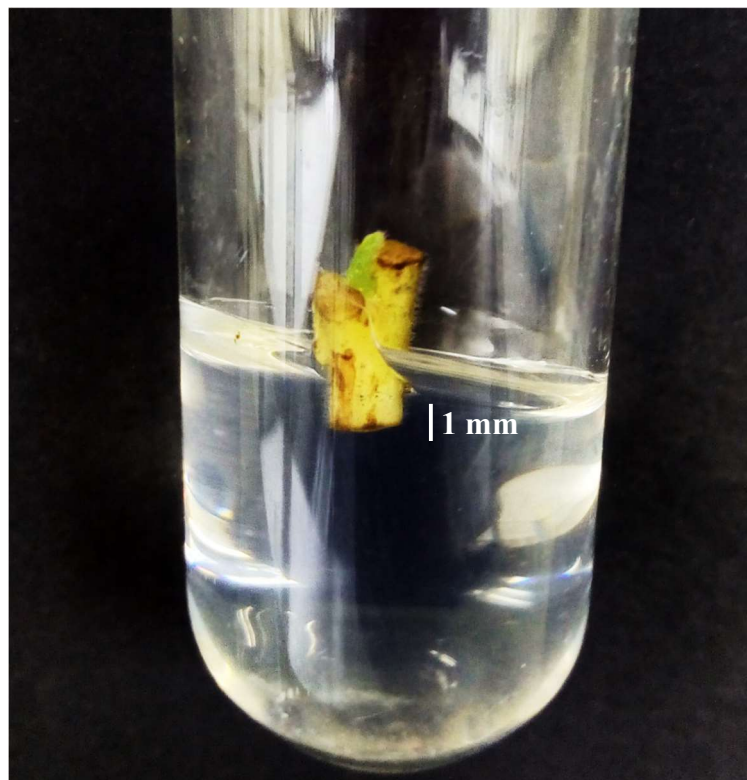


FIGURA 2. Segmento nodal estiolado de genótipo adulto de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch com aspectos de oxidação fenólica limitadas às regiões excisadas após 30 dias de incubação *in vitro*.

Nos estudos com *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae), o estiolamento proporcionou uma redução significativa nos precursores da oxidação fenólica (Krishna *et al.*, 2008). Essa redução foi mais expressiva quando os brotos estiolados foram submersos em uma solução antioxidante sob agitação, ou seja, por um maior tempo de exposição se comparado à metodologia adotada nesse estudo. Sendo assim, nos casos em que a oxidação fenólica persista nos estudos com cultivares de noqueira-pecan mesmo após o estiolamento, em função da influência genotípica e/ou ontogenética, a adoção de tratamentos semelhantes pode ser interessante.

Diante dos resultados obtidos no estudo anterior (Estudo I), infere-se que a inclusão da etapa de estiolamento das brotações, bem como uma maior frequência de aplicação de fungicida foram capazes de reduzir consideravelmente os índices de contaminação fúngica, a ponto de ser possível a realização de subcultivos sem a

manifestação dessa classe de microrganismos. No entanto, visto que nas condições desse estudo não foi possível conter a contaminação bacteriana, manifestada ao longo dos subcultivos, espera-se que adequações na metodologia, sobretudo nas etapas de tratamentos preventivos, proporcionem resultados promissores.

**Estudo III – Fornecimento de explantes de genótipos adultos a partir de mudas enxertadas de *Carya illinoensis*, cv. ‘Barton’, sob manejo fisiológico, sanitário, condições de luz e seu estabelecimento *in vitro***

Neste estudo, esperava-se que fosse possível a obtenção de um maior número de explantes caulinares por brotação estiolada em relação às brotações não estioladas, contendo uma gema cada. Entretanto, o que se observou foi uma proporção semelhante, comparada pela média de gemas por brotação (Tabela 2).

TABELA 2. Número médio de gemas em brotações estioladas e não estioladas, obtidas a cada coleta ao longo de 32 dias de manutenção de mudas de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch em uma câmara escura e em casa de vegetação, respectivamente.

Tipo de brotação	Comprimento médio (cm)	Nº de gemas por brotação (média)		
		1º coleta	2º coleta	3º coleta
Estiolado	15,8	7,1	7	7
Não estiolado	6,8	*	8	8,3

\* período em que não houve a emissão de brotações que possibilitassem a coleta.

Quanto aos resultados do comprimento médio das brotações, nas condições deste estudo, observa-se que as brotações estioladas tiveram um crescimento cerca de 2,5 vezes maior em relação as não estioladas (Tabela 3). Esses resultados corroboram com a informação de Torres, Teixeira e Pozzer (1998), de que o estiolamento promove o alongamento dos entrenós, não havendo um incremento no número de gemas. Concordam

também com os estudos de Husen (2007), em que o estiolamento promoveu um aumento significativo das brotações por meio do alongamento dos entrenós em mudas de *Tectona grandis* L. f. (Verbenaceae). No entanto, diferentemente de noqueira-pecan, houve aumento no número de gemas por brotação.

TABELA 3. Comprimento médio de brotações estioladas e não estioladas, obtidas a cada coleta ao longo de 32 dias de manutenção de mudas de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch em uma câmara escura e em casa de vegetação, respectivamente.

Tipo de brotação	Comprimento médio (cm)		
	1° coleta	2° coleta	3° coleta
Estiolado	13,96	16,49	17,00
Não estiolado	*	7,13	6,47

\* período em que não houve a emissão de brotações que possibilitassem a coleta.

Desta forma, a técnica não possibilitou um maior rendimento de explantes contendo uma gema cada. Entretanto, através de outras vias de regeneração baseadas na desdiferenciação celular, como no caso da calogênese, esse método pode propiciar uma maior quantidade de pequenos fragmentos retirados dos entrenós alongados. Ainda assim, obteve-se uma maior quantidade de explantes das plantas mantidas no escuro (115 explantes) em comparação com as plantas mantidas em casa de vegetação sob condições normais de iluminação (36 explantes). Esse fato é explicado pois, ao longo do período de manutenção dessas plantas, foi possível três coletas de brotações estioladas, totalizando 20 brotações, enquanto as não estioladas propiciaram apenas duas coletas em um total de sete brotações. Essa diferença fisiológica é atribuída à necessidade da planta em emitir maior número de órgãos vegetativos visando atender à alta demanda por captação de luz, mesmo que isso acarrete no rápido esgotamento das reservas da planta, o que sugere a

necessidade de cuidado para não perder a planta doadora de explantes quando submetida a condições de ausência de luz por tempo prolongado.

Em relação aos resultados obtidos ao final de 30 dias de avaliações no cultivo *in vitro* desse material, o maior percentual de contaminação fúngica e bacteriana ocorreu nos explantes isolados de brotações não estioladas. Os explantes não contaminados foram subcultivados e destes, ao final de 60 dias, foi observado um maior percentual de ocorrência de oxidação fenólica nos explantes excisados de brotações estiolados (Tabela 4).

TABELA 4. Resultados obtidos após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* de explantes isolados de brotações estioladas e não estioladas, retirados de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. Contaminados: com presença de micélio de fungos e sinais de bactérias sob ou sobre os explantes; Oxidados: 50% ou mais de escurecimento do tecido do explante.

Tipo de explante	Nº explantes incubados	30 dias		60 dias	
		Contaminados (%)	Nº explantes subcultivados	Oxidados (%)	
Estiolados	115	72,2	32	37,5	
Não estiolados	36	88,9	4	25	

Durante os subcultivos, todos os explantes não estiolados apresentaram contaminação fúngica, totalizando 100% em 90 dias de cultivo *in vitro*. É possível inferir que a origem dessa contaminação é endofítica, uma vez que não houve manifestação de fungos nos subcultivos dos explantes estiolados e ambos foram submetidos ao mesmo protocolo de desinfestação superficial. Nos explantes estiolados remanescentes, houve a manifestação de bactérias latentes em 25% dos 30 aos 60 dias e 12,5% dos 60 aos 90 dias.

Após o subcultivo realizado aos 90 dias dos explantes remanescentes, esses não responderam aos estímulos *in vitro* e não apresentaram aspectos de regeneração, sendo então considerados mortos em função de um escurecimento superficial em 100% do tecido do explante até os 150 dias de cultivo. Esse fato pode ser atribuído à algum

componente do meio de cultura, uma vez que continha 1,2 vezes mais sais quando comparado ao protocolo do estudo anterior. Além disso, neste estudo não foi adotada a etapa de excisão dos explantes sobre uma solução antioxidante.

Essa ausência de resposta também nos fornece informações de que a adoção do mesmo meio de cultura, tanto na incubação, quanto nos subcultivos seguintes, pode não ter oferecido o necessário ao atendimento da demanda dos explantes e o desenvolvimento da regeneração, uma vez que os componentes do meio de cultura devem suprir as necessidades de diferenciação do tecido vegetal e, muitas vezes, precisam ser adequados em cada fase da micropropagação.

**Estudo IV – Tamanho de segmentos apicais e nodais isolados de plantas doadoras de genótipos adultos de *Carya illinoensis* submetidas à manejo fisiológico e sanitário e seus efeitos no estabelecimento *in vitro***

A redução do comprimento adotado como padrão para as coletas de brotações estioladas de 10 cm no Estudo II para 2 cm neste estudo, se deve ao fato de que, de acordo com observações feitas, o alongamento inicial das brotações estioladas, ou seja, logo após a sua protrusão, se dá em maior velocidade, estabilizando e alongando de forma mais lenta nos dias posteriores (Figura 3). Uma das hipóteses é que a mobilidade dos microrganismos não acompanha o pleno alongamento inicial dos entrenós das brotações estioladas, proporcionando ápices axênicos ou com baixa população microbiana, mas é capaz de acompanhar o alongamento mais lento, e neste último caso, possivelmente favorecido também por uma maior vascularização, fato que precisa ser esclarecido.



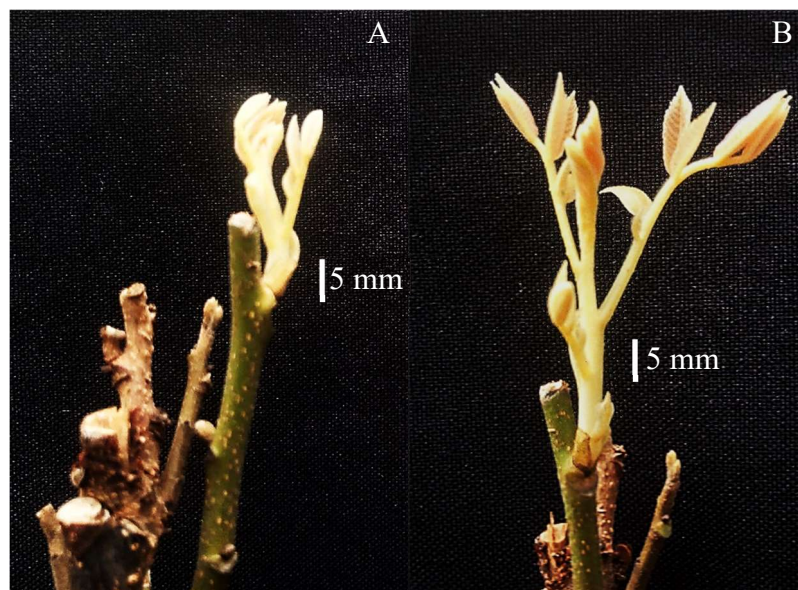


FIGURA 3. Crescimento inicial (A) e com intervalo de um dia (B) de uma brotação estiolada em mudas enxertadas de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch submetidas ao escuro e a uma temperatura constante de  $30 \pm 2$  °C.

Quando a análise estatística das variáveis após a incubação dos explantes *in vitro*, ao final de 90 dias de avaliações, o modelo de regressão logística apontou que a ocorrência de contaminação fúngica apresentou dependência dos fatores avaliados ( $R^2 = 0.426$ , GL = 8,  $X^2 = 28.048$ , p-valor =  $<0,001$ ), indicando influência tanto do período de coleta (blocos), quanto das características dos explantes (Apêndice 3). Já para a variável contaminação bacteriana, o modelo apresentou dependência apenas em relação ao período de coleta (blocos) e tipo de explante, não sendo influenciada pelo tamanho do explante ( $R^2 = 0.160$ , GL = 8,  $X^2 = 55,247$ , p-valor =  $<0,0001$ ) (Apêndice 4). Esse mesmo fator também não foi representativo para a variável oxidação ( $R^2 = 0.172$ , GL = 8,  $X^2 = 67,856$ , p-valor =  $<0,0001$ ) (Apêndice 5). Em relação a variável regeneração, o modelo apresentou dependência da ocorrência de brotos para as características do explante, mas não foi representativo para o fator bloco ( $R^2 = 0.330$ , GL = 8,  $X^2 = 58,407$ , p-valor =  $0,010$ ) (Apêndice 6).

Os resultados obtidos para a contaminação fúngica confirmam a efetividade da desinfestação superficial sobre o controle exógeno desses microrganismos, bem como o

controle endógeno por meio dos tratamentos preventivos aplicados no manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras dos explantes, sobretudo o estiolamento de brotações. Além disso, corroboram com os resultados obtidos nos estudos de Knox e Smith (1980), onde foi constatado, através de microscopia eletrônica, que brotações novas de noqueira-pecan que se desenvolveram rapidamente estavam isentas de fungos endofíticos desde o ápice até cinco centímetros abaixo.

Quanto aos resultados obtidos para a contaminação bacteriana, em relação ao explante utilizado, a análise estatística apontou que os explantes mais apicais (segmento apical e o segmento logo abaixo ao apical), não interferem no modelo de regressão logística, devido a sua baixa incidência. Em contrapartida, o modelo apontou que há tendência de maior incidência de contaminação bacteriana nos explantes mais basais (Apêndice 8). Esse fato pode ser observado com o aumento do percentual de contaminação bacteriana ao longo dos explantes (Figura 4).

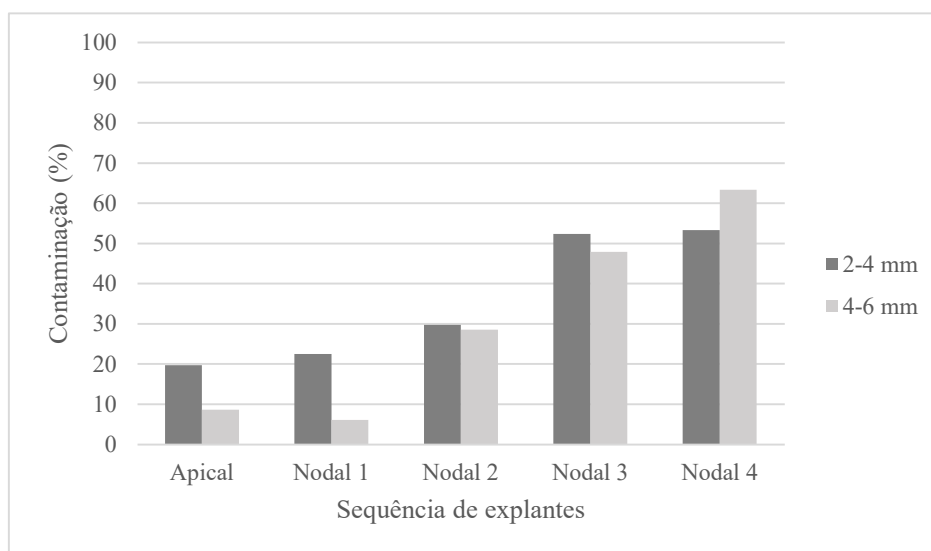


FIGURA 4. Contaminação bacteriana em explantes isolados de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch após 90 dias *in vitro* de acordo com o seu tamanho e sua posição nas brotações estioladas.

Diante dessa informação, é possível inferir que o estiolamento representa uma certa resistência ao avanço das bactérias de forma geral ou de alguns gêneros que possuem

como característica uma maior latência e, deste modo, podem se manifestar em fases subsequentes da micropropagação nos explantes mais apicais. De acordo com Leifert e Cassells (2001), bactérias comuns ao ambiente manifestam-se rapidamente, já determinados gêneros são de difícil visualização e/ou não produzem sintomas *in vitro*.

Outro fator que pode ser considerado é, provavelmente, uma maior liberação de exsudatos antibacterianos pelos tecidos dos explantes mais apicais em relação aos mais basais, pois, de acordo com Leifert *et al.*, 1994, a supressão do crescimento bacteriano e a sua persistência latente são favorecidos pela liberação de compostos antibacterianos pelas células vegetais e pela acidificação do meio de cultura. De outro modo, os maiores índices de crescimento bacteriano observados nos explantes mais basais podem ser atribuídos a alguns exsudatos vegetais com compostos que favoreçam o seu crescimento. Leifert *et al.* (1994) acreditam que o crescimento de contaminantes bacterianos são completamente dependentes dos explantes em função de fatores adicionais fornecidos por esses exsudatos produzidos pelas células.

Quanto às diferenças observadas em relação aos blocos, o modelo de regressão logística não foi interferido pelo Bloco 1, mas foi interferido negativamente pelo Bloco 3, apontando que há diferença na tendência de ocorrência de contaminação bacteriana ao longo das coletas de brotações estioladas (Figura 5). Considerando que a época de coleta pode ser determinante na resposta dos explantes *in vitro*, em função das condições fisiológicas da planta doadora, esses resultados exprimem que, apesar do curto intervalo de tempo entre as coletas (3 dias), a condição das plantas manejadas no escuro em cada período pode ter influenciado na sua população microbiana endofítica e, conseqüentemente, a manifestação *in vitro*.

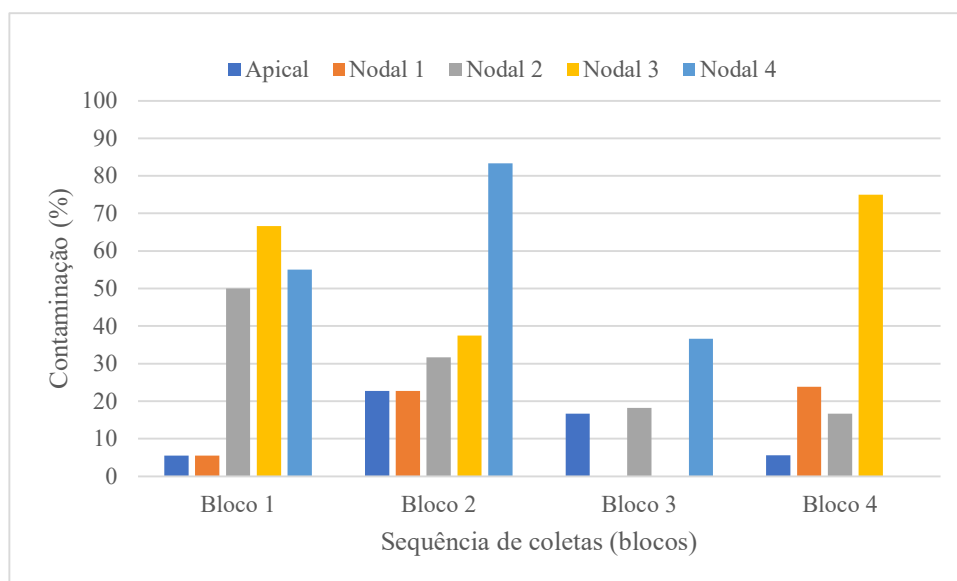


FIGURA 5. Contaminação bacteriana em explantes isolados de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch após 90 dias *in vitro* de acordo com sua posição nas brotações estioladas, coletadas a cada três dias (blocos).

Além da identificação dos gêneros bacterianos para a elaboração de uma estratégia de erradicação, sugere-se que sejam feitos testes simples de forma a mensurar se há variação no pH do meio de cultura na presença dos explantes em diferentes estágios de desenvolvimento, a fim de constatar se há relação entre a contaminação por essa classe de microrganismos e as fases da micropropagação.

Em relação aos tamanhos dos explantes adotados, sobretudo os segmentos apicais, não houve diferença de ocorrência de contaminação bacteriana (Apêndice 9). Provavelmente, o menor tamanho adotado (2-4 mm) não foi capaz de isolar a região com uma menor vascularização a ponto de oferecer melhores resultados. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o tamanho do explante determina sua capacidade de sobrevivência e crescimento, sendo recomendável o uso de explantes muito pequenos apenas em casos onde se quer eliminar os microrganismos, isolando os tecidos com menor vascularização. De acordo com os mesmos autores, o tamanho de explante ideal deve ser testado, avaliando-se aquele que apresente menores índices de contaminação e, ao mesmo

tempo, consiga se estabelecer e crescer. Nos estudos para a micropropagação de *Acacia mearnsii* (Fabaceae), os baixos índices de contaminação bacteriana foram atribuídos ao tamanho reduzido do explante, bem como a sobrevivência quando comparados a explantes de maior tamanho (Salles *et al.*, 2017).

Essas informações vão de encontro aos resultados obtidos para a variável regeneração, uma vez que, em função do tamanho do explante adotado, houve diferença significativa, ou seja, o tamanho influenciou a capacidade de regeneração (Apêndice 9). Além disso, ainda que em baixa proporção, também houve diferença significativa em relação ao tipo de explante, sendo os segmentos apicais os mais responsivos (Apêndice 8). Geralmente, explantes apicais e maiores apresentam maior capacidade de regeneração e sobrevivência do que gemas axilares que estão sob o efeito da dominância apical (Grattapaglia; Machado, 1998), fato constatado neste estudo com noqueira-pecan (Figura 6).

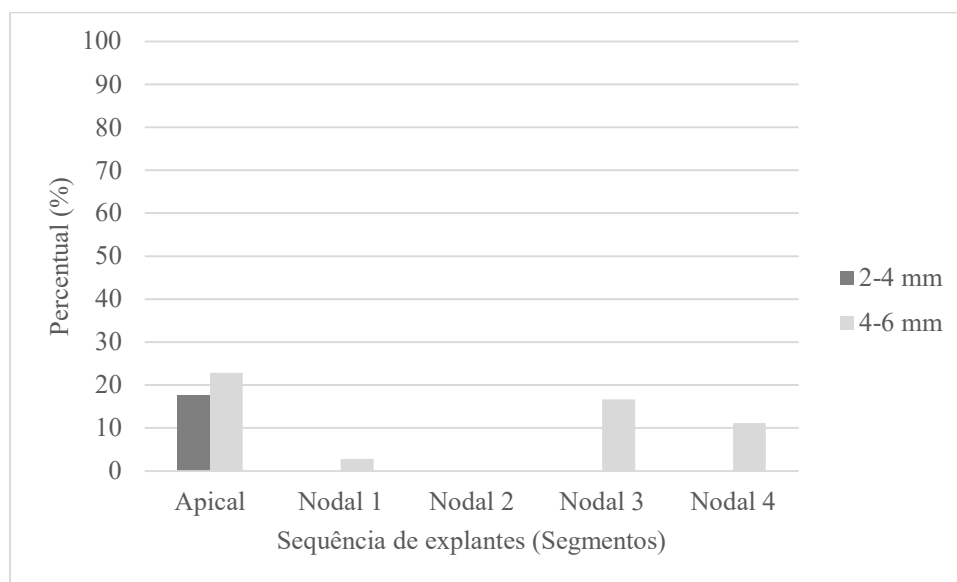


FIGURA 6. Regeneração de brotos em explantes isolados de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch após 90 dias *in vitro* de acordo com o seu tamanho e sua posição nas brotações estioladas.

A formação e alongamento dos brotos provavelmente foram interferidos pelos altos índices de oxidação, novamente atribuídos neste estudo a algum componente do

meio de cultura. A diferença significativa apontada pela análise estatística para a oxidação em relação ao tipo de explante utilizado pode ser atribuída a maior capacidade de regeneração dos ápices (Apêndice 8). Mais uma vez, assim como no Capítulo 1, destaca-se que os explantes apresentaram capacidade de regeneração mesmo com aspectos de oxidação aos 60 dias e foi possível isolar alguns brotos, porém em proporções muito baixas, aos 90 dias (Figura 7).

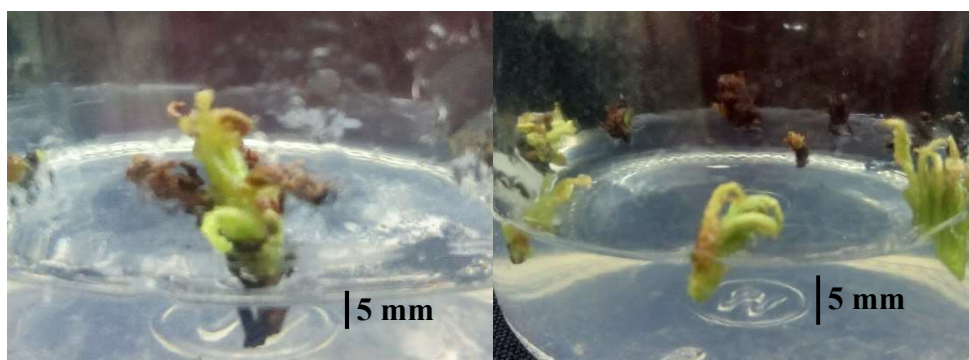


FIGURA 7. Regeneração e repicagem de brotos de um segmento apical estabelecido *in vitro*, isolado de genótipo adulto de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch submetido à manejo fisiológico e sanitário. Formação de múltiplos brotos aos 60 dias (Esquerda) e isolamento desses brotos aos 90 dias (Direita).

Diante dos resultados apresentados ao longo dos estudos neste trabalho, observou-se que a utilização de matrizes enxertadas e a inclusão de tratamentos preventivos no manejo fisiológico e sanitário não foram impeditivos para o fornecimento de explantes, além de minimizarem os problemas recorrentes no estabelecimento *in vitro* de noqueira-pecan, como no caso da contaminação fúngica, necessitando adequações. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), os níveis de contaminação *in vitro* tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. Corte-olivares, Phillips e Butler-nance (1990), utilizando explantes de indivíduos adultos de noqueira-pecan coletados a campo, relataram grandes perdas por contaminação, mesmo com a utilização de um fungicida durante a desinfestação superficial. No entanto, esse tipo de tratamento, na maioria das vezes, não atinge os microrganismos endofíticos.

Essas informações justificam a adoção de mudas enxertadas de noqueira-pecan como fonte de explantes, pois, além de possibilitar o fornecimento de propágulos com as características de interesse de um indivíduo adulto, simplificam a adoção de tratamentos preventivos que minimizem os problemas *in vitro*.

Uma outra justificativa para a adoção de mudas enxertadas de noqueira-pecan para o fornecimento dos explantes diz respeito a informação de Andrade (2010) de que a eficiência dos métodos de propagação vegetativa de espécies lenhosas está associada a juvenilidade e um dos métodos para resgatá-la é a enxertia. De acordo com Oliveira, Dias e Brondani (2013), plantas matrizes adultas de espécies lenhosas devem ser submetidas a técnicas de indução de rejuvenescimento para o fornecimento de explantes com características juvenis. O rejuvenescimento de genótipos com características superiores através da enxertia e, posteriormente, o fornecimento de explantes, também foi adotada com outro gênero de nozes nos ensaios desenvolvidos por Meier-dinkel e Wenzlitschke (2017). Nesse estudo, brotações de um exemplar de 60 anos de idade de *Juglans nigra* (Juglandaceae) foram enxertados sobre mudas de *J. regia* e mantidos em casa de vegetação para o seu desenvolvimento até o uso em ensaios clonais *in vitro*. No entanto, ainda assim foram relatados grandes problemas por contaminação e oxidação dos explantes na fase de estabelecimento, além da baixa proporção de brotos por explante na fase de multiplicação.

Quanto aos resultados obtidos de contaminação por microrganismos ao longo dos estudos, de acordo com Pasqual *et al.* (2010), esse problema na fase de estabelecimento dos explantes *in vitro* pode ser reduzido ao máximo através da manutenção das plantas matrizes em um ambiente mais limpo. No entanto, os resultados do estudo preliminar (Estudo I) indicaram que, apesar de um maior controle fitossanitário das plantas doadoras de explantes mantidas em casa de vegetação, havia a necessidade de inclusão de etapas

de tratamentos preventivos, principalmente, para o combate aos microrganismos endofíticos, justificando a inclusão da manutenção das plantas doadoras de explantes em ambiente escuro para o fornecimento de brotações estioladas.

O estiolamento consiste em submeter a planta matriz ao alongamento dos entrenós através do seu cultivo em um ambiente desprovido de luz, promovendo ápices com menores chances de não estarem contaminados, uma vez que a taxa de replicação do microrganismo não acompanha o rápido alongamento (Torres; Teixeira; Pozzer, 1998). Hansen e Lazarte (1984) utilizaram o estiolamento de brotações em noqueira-pecan, a fim de melhorar a eficiência do enraizamento e proliferação de explantes *in vitro*, no entanto, a técnica não proporcionou resultados satisfatórios quando comparados aos não estiolados e os aspectos sobre a proporção de brotos por explantes, bem como a contaminação por microrganismos não foram explorados. Sendo assim, esses estudos podem ser considerados como a primeira menção da adoção da técnica de estiolamento em plantas de noqueira-pecan em um manejo fisiológico e sanitário a fim de minimizar os problemas por contaminação.

Aliado ao estiolamento, a vernalização foi adotada com o objetivo de suplementar as horas de frio necessárias à superação da dormência das mudas de noqueira-pecan, como uma forma de garantir o estímulo de brotações vigorosas. De acordo com Wells (2013), quando o número de horas de frio em um ano for inferior a 100 horas, pode haver distúrbios fisiológicos, irregularidade das brotações, entre outros sintomas. Esse fato foi observado por Grageda *et al.* (2013), onde a falta de frio com temperaturas inferiores a 7,2 °C no período de dormência das plantas resultou em brotações deficientes com folhas raquíticas e poucas ramificações, floração irregular e o rendimento muito abaixo do potencial. Em trabalhos futuros, deve-se atentar para a exigência de horas de frio de cada



cultivar como uma forma de atender a demanda para a superação da dormência das plantas.

Quanto à fertilização, apesar do aumento das frequências, a CE do lixiviado permaneceu inferior ao recomendado e visualmente não forneceu um aporte aos parâmetros das brotações. Os valores obtidos pelo método *Pour Thru* e que são preconizados para a maioria das plantas em desenvolvimento varia de 2,6 a 4,6 mS (Cavins *et al.*, 2000). Ainda assim, sabe-se que as mudas de noqueira-pecan crescem lentamente, não sendo significativamente beneficiadas no desenvolvimento da parte aérea com o incremento de nutrientes (Keever; Cobb; McDaniel, 1986). Embora não tenha havido uma resposta na emissão de brotos, isso não significa que a maior disponibilidade de nutrientes não tenha sido benéfica.

Em relação à oxidação, apesar de não haver uma comparação estatística entre os Estudos, esse fato pode ser atribuído à algum componente dos meios de cultura, sendo os menores índices observados no estudo onde utilizou-se o meio MS a 70% da concentração de sais. No estabelecimento *in vitro* de explantes de espécies lenhosas, recomenda-se a utilização de meios de cultura com baixas concentrações de nutrientes (Dutra; Wendling; Brondani, 2009). No entanto, de acordo com uma revisão de Payghamzadeh e Kazemitabar (2011), os meios de cultura comumente utilizados para espécies lenhosas não foram adequados para a micropropagação de *Juglans* spp. (Juglandaceae), causando uma deterioração gradual dos explantes. Com isso, juntamente com a indicação da necessidade de altos teores de sais para a micropropagação das espécies de *Juglans*, o meio DKW foi desenvolvido e mostrou-se superior aos demais. Até o momento, são poucos os estudos para a micropropagação de noqueira-pecan com esse meio de cultura e precisa ser melhor explorado, sobretudo em explantes caulinares estiolados.

De acordo com os resultados obtidos, os próximos estudos devem se concentrar na elaboração de um meio de cultura específico para as fases iniciais. A adequação do protocolo desenvolvido por Renukdas, Manoharan e Garner (2010), utilizando o meio WPM gelificado para o estabelecimento de explantes caulinares isolados de brotações estioladas de genótipos adultos não foi eficiente. Provavelmente, esses explantes tenham necessidades fisiológicas distintas e as concentrações de determinados elementos do meio de cultura podem ser tóxicos ou deficitários. Em muitos casos, a incubação inicialmente em meio de cultura sem reguladores de crescimento pode ser interessante, bem como diferentes concentrações de citocinina para os segmentos apicais em relação aos demais segmentos (Grattapaglia; Machado, 1998).

#### 4.4 Conclusões

Genótipos adultos de *C. illinoensis*, representados por matrizes enxertadas, respondem positivamente ao estiolamento de brotações e, conseqüentemente, ao fornecimento de explantes. No entanto, apesar da redução de problemas por contaminação fúngica, o método precisa ser adequado para a redução da contaminação bacteriana, bem como um meio de cultura que minimize a oxidação na fase inicial e outro que seja mais responsivo na fase de multiplicação.

#### 4.5 Referências

ALVIDREZ-VILLARREAL, R. *et al.* Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. **Agricultural Sciences**, Irvine, v. 3, n. 3, p. 405–416, 2012.

ANDRADE, W. F. **Indução de rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia seriada e micropropagação**. 2010. 76 f. Tese (Doutorado) - Curso de Recursos Florestais, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

- ÁVILA-TREVIÑO, J. A. *et al.* Morphogenic responses in the *in vitro* propagation of pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch). **Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, Chapingo, v. 14, n. 3, p. 469-481, Dec. 2013.
- BALLESTER, A.; SANCHEZ, M. C.; VIEITEZ, A. M. Etiolation as a pretreatment for *in vitro* establishment and multiplication of mature chestnut. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 77, n. 3, p. 395–400, 1989.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3rd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1972. 241 p.
- BILHARVA, M. *et al.* Pecan: from research to the brazilian reality. **Journal of Experimental Agriculture International**, Hooghly, v. 23, n. 6, p. 1–16, 2018.
- BONGA, J. M. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. *In*: BONGA J. M.; DURZAN D. J. (ed.) **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. v. 1, p. 249-271.
- CAVINS, T. J. *et al.* **Monitoring and managing pH and EC using the PourThru extraction method**. Raleigh: North Caroline State University/College of Agriculture & Life Sciences, 2000. 17 p. (Horticulture Information Leaflet, 590).
- CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2014. 325 p.
- CORTE-OLIVARES, J.; PHILLIPS, G. C.; BUTLER-NANCE, S. A. Micropropagation of pecan. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 25, n. 10, p. 1308, 1990.
- DUNSTAN, D. I.; SHORT, K. C. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 41, n. 1, p. 70–72, 1977.
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A Micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, PR, n. 58, p. 49-59, 2009.
- FRONZA, D.; HAMANN, J. J. **Técnicas para o cultivo da noqueira-pecã**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2016. 424 p.
- GRAGEDA, J. G. *et al.* El clima y la producción de nogal pecanero. *In*: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE NOGAL PECANERO, 14., 2013, Hermosillo, México. **Anais [...]**. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2013. p. 55- 66.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In*: TORRES, A. C. *et al.* **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. (ed.) Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.
- HAND, C. R. *et al.* Node position influences viability and contamination in hazelnut shoot explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Cambridge, v. 52, n. 6, p. 580–589, 2016.

- HANSEN, K. C.; LAZARTE, J. E. In vitro propagation of pecan seedlings. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 19, p. 237-239, 1984.
- HUSEN, A. Stock-plant etiolation causes drifts in total soluble sugars and anthraquinones, and promotes adventitious root formation in teak (*Tectona grandis* L. f.) coppice shoots. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 13–21, 2007.
- KEEVER, G. J.; COBB, G. S.; MCDANIEL, R. Effects of container size, root pruning, and fertilization on growth of seedling Pecans. **Journal of Environmental Horticulture**, Washington, DC, v. 4, n.1, p. 11-13, 1986.
- KIMATI, H. *et al.* (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 663 p.
- KNOX, C. A. P.; SMITH, R. H. A scanning electron microscope study of healthy pecan tissues showing the presence or absence of internal fungal contamination. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Cambridge, v. 16, n. 8, p. 651–654, 1980.
- KNOX, C. A.; SMITH, H. Progress in tissue culture methods for production of “Riverside” stocks. **The Pecan Quarterly**, Bryan, v. 15, n. 1, p. 27-34, 1981.
- KRISHNA, H. *et al.* Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 118, n. 2, p. 132–138, 2008.
- LEIFERT, C. *et al.* Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in *Delphinium* tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, n. 36, p. 149-155, 1994.
- LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Cambridge, v. 37, n. 2, p. 133–138, 2001.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, Carlisle, v. 30, p. 421–427, 1980.
- MOKOCHINSKI, F. M. **Estimativa de produção, caracterização física e perfil químico de amêndoas de nogueira-pecã**. 2015. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2015.
- MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM, CEPEF: FATEC, 1998. 21 p. (Centro de Pesquisas Florestais. Série técnica, 12).
- MCFADDEN, D. Conditional logit analysis of qualitative choice behavior. *In*: ZAREMBKA, P. (ed.). **Frontiers in econometric**. New York: Academic Press, 1974. p. 105-142.

- MEIER-DINKEL, A.; WENZLITSCHKE, I. Micropropagation of mature *Juglans* hybrids. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 1155, p. 85–92, 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.
- NESBITT, M. L.; GOFF, W. D.; STEIN, L. A. Effect of scionwood packing moisture and cut-end sealing on Pecan graft success. **HortTechnology**, Alexandria, VA, v. 12, n. 2, p. 257–260, 2002.
- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, PR, v. 33, n. 76, p. 439–453, 2013.
- PAYGHAMZADEH, K.; KAZEMITABAR, S. K. *In vitro* propagation of walnut - A review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n.3, p. 290–311, 2011.
- PASQUAL, M. *et al.* Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. *In*: SCHRWINSKI-PEREIRA, J. E. (ed.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2010. cap. 2, p. 61-161.
- POLETTI, T. *et al.* Fungos associados às flores e frutos da noqueira-pecã (*Carya illinoensis*). **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 8, n. 1, p. 5-13, maio 2014.
- POLETTI, T. *et al.* Métodos de superação de dormência da semente de noqueira-pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 39, n. 6, p.1111-1118, 2015.
- RENUKDAS, N. N.; MANOHARAN, M.; GARNER, J. O. Jr. *In vitro* propagation of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch]. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 211–215, 2010.
- SALLES, E. A. P. B. *et al.* Desinfestação e introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, PR, v. 37, n. 92, p. 485–491, 2017.
- SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D. Características dos fungos associados às sementes florestais. *In*: SANTOS, A. F., PARISI, J. J. D.; MENTEM, J. O. M. (org.). **Patologia de sementes florestais**. Colombo. PR: EMBRAPA Florestais, 2011. p. 69 – 86.
- THOMPSON, T. E.; GRAUKE, L. J. ‘Lipan’ Pecan. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 47, p. 121-123, 2012.
- TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. (ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 133-145.

WARREN, C. J. **Evaluation of different propagation methods (budding, grafting and cuttings) for pecan.** 2015. 48 f. Thesis (Master of Science) - Texas A&M University, [College Station, Texas], 2015.

WELLS, L. **Southeastern pecan growers' handbook.** Athens, GA: University of Georgia, 2013. 236 p. (Buletin, 1327).

WOOD, B. W. In vitro proliferation of pecan shoots. **HortScience**, Alexandria, VA, n. 17, p. 890-891, 1982.

WOOD, B. W. Canopy morphology of pecan cultivars. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 31, n. 1, p. 139–142, 1996.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Em vista de todos esses resultados, é possível inferir que a inclusão de etapas de tratamentos preventivos no manejo fisiológico e sanitário das plantas doadoras de explantes foi determinante para a redução de problemas comuns na micropropagação de espécies lenhosas, como a oxidação e, principalmente, a contaminação por microrganismos. No entanto, ainda é necessário determinar as condições ótimas *in vitro* para o estabelecimento, como o meio de cultura e a concentração de reguladores de crescimento. Isso deverá ser determinado a cada estudo, sendo dependente da cultivar e das condições de cultivo da planta doadora de explantes.

Os explantes isolados de plantas com idades fisiológicas distintas (jovens e adultas) submetidos a protocolos semelhantes, apresentaram diferentes respostas, onde o material adulto apresentou menor reação aos estímulos *in vitro* ao longo dos subcultivos quando comparado ao material extraído de *seedlings*, entre elas a dificuldades de alongar a parte aérea. Além disso, a contaminação bacteriana foi mais evidente no material adulto, fato esperado visto que os propágulos utilizados na enxertia inicialmente tiveram origem do campo.

São necessários estudos de protocolos que, além de possibilitarem maiores proporções de brotos por explantes, sejam responsivos no alongamento e aclimatização dessas plantas, bem como a viabilidade das mudas originadas *in vitro* em condições de

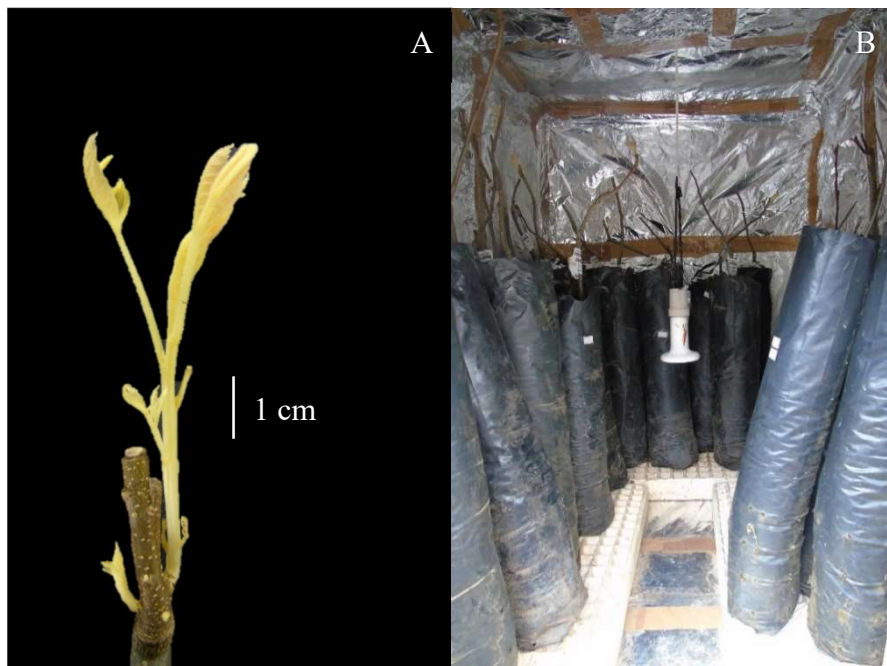
campo. Para isso, visto que umas das dificuldades na elaboração desses estudos foi a escassez de material propagativo, sugere-se a adoção de uma maior quantidade de plantas matrizes para o fornecimento de explantes que sejam suficientes na elaboração de experimentos em diferentes combinações e a definição de um protocolo mais efetivo.

Ainda assim, os resultados aqui apresentados são promissores para a sequência de estudos, com a possibilidade de produção a curto prazo de porta-enxertos clonais a partir de material juvenil e a médio prazo para a produção de mudas clonais inteiras a partir de genótipos adultos, ou seja, sem necessidade da enxertia, seguidas pela avaliação a campo, atendendo a alta demanda por mudas para a ampliação de pomares em diversas regiões do mundo.



## 6 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Aspectos de uma brotação estiolada de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch (A) obtidas por meio da submissão de mudas ao escuro em uma câmara sob temperatura constante de  $30 \pm 2$  °C (B).



APÊNDICE 2. Sequência de estudos e metodologias adotadas sobre as plantas e propágulos de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch e os protocolos para a incubação *in vitro* de seus explantes.

Estudos	Manejo fisiológico e sanitário		Desinfestação superficial		Incubação	
	Procedimento	Período	Agente	Tempo de exposição	Meio de cultura	Suplementação
Estudo I	Fertirrigação	Quinzenal	Etanol a 70% (v/v)	1 min	MS (Murashige; Skoog, 1962) a 70%	30 g L <sup>-1</sup> de sacarose 17,76 µM de BAP 2,5 g L <sup>-1</sup> de Phytigel
	Aplicação de fungicida	10 dias antes da coleta de brotações	NaClO a 1,5% (i.a.) + Tween 20® (0,35%)	10 min		
	Fertirrigação	Quinzenal	H2O deionizada + Tween 20® (0,5%)	30 s	MS (Murashige; Skoog, 1962) a 70%	30 g L <sup>-1</sup> de sacarose 17,76 µM de BAP 4,92 µM de AIB 2,5 g L <sup>-1</sup> de Phytigel
	Aplicação de fungicida	Semanal	Etanol a 50% (v/v)	1 min		
	Vernalização	408 h a 6 ± 2 °C	NaClO a 1,5% (i.a.)	10 min		
		Estiolamento				
Estudo III	Fertirrigação	Semanal	H2O deionizada + Tween 20® (0,5%)	3 min	BDS (Dunstan; Short, 1977) a 100%	20 g L <sup>-1</sup> de sacarose 4,44 µM de BAP 0,02 µM de 2,4-D 2,5 g L <sup>-1</sup> de Phytigel
	Aplicação de fungicida	Semanal	NaClO a 1% (i.a.)	20 min		
	Vernalização	408 h a 6 ± 2 °C				
		Estiolamento				
Estudo IV	Fertirrigação	Semanal	H2O deionizada + Tween 20® (0,5%)	10 min	WPM (Lloyd; Mccown, 1980) a 100%	20 g L <sup>-1</sup> de glicose 13,32 µM de BAP 3,5 L <sup>-1</sup> de Phytigel
	Aplicação de fungicida	48h antes da coleta das brotações	NaClO a 1,5% (i.a.)	10 min		
	Vernalização	408 h a 6 ± 2 °C				
		Estiolamento				

APÊNDICE 3. Regressão logística para a ocorrência da variável contaminação fúngica em função dos blocos, explantes e tamanho do explante ( $p < 0,05$ ) no estabelecimento *in vitro* de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch.

Fatores	GL	Var	Coefficiente	p-valor (coef)	Qui-quadrado (LR)	Pr > LR
Intercepto	8		-3,398	0,000	28,048	0,001
Blocos	3	1	0,000	*	23,721	< 0,0001
		2	0,210	0,767		
		3	-0,817	0,354		
		4	-1,029	0,457		
Explantes	4	Ápice	0,000	*	25,534	0,000
		Seg1	-1,061	0,473		
		Seg2	0,620	0,518		
		Seg3	1,017	0,298		
		Seg4	0,908	0,416		
Tamanho do explante	1	2-4	0,000	*	21,813	< 0,0001
		4-6	-0,024	0,968		

\* A ocorrência não foi representativa para o modelo de regressão logística.

APÊNDICE 4. Regressão logística para a ocorrência da variável contaminação bacteriana em função dos blocos, explantes e tamanho do explante ( $p < 0,05$ ) no estabelecimento *in vitro* de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch.

Fatores	GL	Var	Coefficiente	p-valor (coef)	Qui-quadrado (LR)	Pr > LR
Intercepto	8		-1,307	0,002	55,247	< 0,0001
Blocos	3	1	0,000	*	13,609	0,003
		2	0,119	0,744		
		3	-1,243	0,003		
		4	-0,336	0,457		
Explantes	4	Ápice	0,000	*	41,992	< 0,0001
		Seg1	0,146	0,752		
		Seg2	0,887	0,042		
		Seg3	1,588	0,001		
		Seg4	2,313	< 0,0001		
Tamanho do explante	1	2-4	0,000	*	1,645	0,200
		4-6	-0,375	0,202		

\* A ocorrência não foi representativa para o modelo de regressão logística.

APÊNDICE 5. Regressão logística para a ocorrência da variável oxidação em função dos blocos, explantes e tamanho do explante ( $p < 0,05$ ) no estabelecimento *in vitro* de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch.

Fatores	GL	Var	Coefficiente	p-valor (coef)	Qui-quadrado (LR)	Pr > LR
Intercepto	8		0,293	0,411	67,856	< 0,0001
Blocos	3	1	0,000	*	14,018	0,029
		2	-0,385	0,270		
		3	1,264	0,001		
		4	0,169	0,680		
Explantes	4	Ápice	0,000	*	39,334	< 0,0001
		Seg1	1,112	0,006		
		Seg2	0,280	0,452		
		Seg3	-0,762	0,072		
		Seg4	-1,410	0,007		
Tamanho do explante	1	2-4	0,000	*	1,255	0,534
		4-6	-0,063	0,818		

\* A ocorrência não foi representativa para o modelo de regressão logística.

APÊNDICE 6. Regressão logística para a ocorrência da variável regeneração em função dos blocos, explantes e tamanho do explante ( $p < 0,05$ ) no estabelecimento *in vitro* de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch.

Fatores	GL	Var	Coefficiente	p-valor (coef)	Qui-quadrado (LR)	Pr > LR
Intercepto	8		-2,662	0,000	58,407	0,010
Blocos	3	1	0,000	*	13,540	0,331
		2	0,548	0,462		
		3	-0,690	0,453		
		4	0,675	0,402		
Explantes	4	Ápice	0,000	*	61,314	< 0,0001
		Seg1	-2,759	0,010		
		Seg2	-18,844	0,995		
		Seg3	-1,271	0,121		
		Seg4	-1,466	0,187		
Tamanho do explante	1	2-4	0,000	*	-5,181	*
		4-6	1,459	0,021		

\* A ocorrência não foi representativa para o modelo de regressão logística.

APÊNDICE 7. Comparação múltipla das variáveis qualitativas de contaminação fúngica; contaminação bacteriana; oxidação e regeneração (teste de Qui-quadrado) em função dos blocos no estabelecimento *in vitro* de genótipos adultos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch.

Variáveis		Blocos				p-valor
		Bl.1 (n=78)	Bl.2 (n=74)	Bl.3 (n=76)	Bl.4 (n=48)	
<b>Contaminação fúngica</b>	Presença (n=6)	3,8% (n=3)	4,1% (n=3)	0,0% (n=0)	0,0% (n=0)	0,41
	Ausência (n=270)	96,2% (n = 75)	95,9% (n = 71)	100,0% (n=76)	100,0% (n=48)	
<b>Contaminação bacteriana</b>	Presença (n=73)	32,0% (n=24)	36,6% (n=26)	17,1% (n=13)	20,8% (n=10)	0,014
	Ausência (n=197)	68,0% (n=51)	63,4% (n=45)	82,9% (n=63)	79,2% (n=38)	
<b>Oxidação</b>	Presença (n=176)	90,2% (n=46)	82,2% (n=37)	95,2% (n=60)	86,8% (n=33)	0,002
	Ausência (n=21)	9,8% (n=5)	17,8% (n=8)	4,8% (n=3)	13,2% (n=5)	
<b>Regeneração</b>	Presença (n=21)	9,8% (n=5)	17,8% (n=8)	4,8% (n=3)	13,2% (n=5)	0,327
	Ausência (n=176)	90,2% (n=46)	82,2% (n=37)	95,2% (n=60)	86,8% (n=33)	

APÊNDICE 8. Comparação múltipla das variáveis qualitativas de contaminação fúngica; contaminação bacteriana; oxidação e regeneração (teste de Qui-quadrado) em função dos explantes.

Variáveis		Explantes					p-valor
		Ápice (n=73)	Seg.1 (n=72)	Seg.2 (n=64)	Seg.3 (n=41)	Seg.4 (n=26)	
Contaminação fúngica	Presença (n=6)	1,4% (n=1)	0,0% (n=0)	3,1% (n=2)	4,9% (n=2)	3,8% (n=1)	0,351
	Ausência (n=270)	98,6% (n = 72)	100,0% (n = 72)	96,9% (n = 62)	95,1% (n = 39)	96,2% (n = 25)	
Contaminação bacteriana	Presença (n=73)	15,3% (n=11)	15,3% (n=11)	30,6% (n=19)	48,7% (n=19)	52% (n=13)	< 0,0001
	Ausência (n=197)	84,7% (n=61)	84,7% (n=61)	69,3% (n=43)	51,3% (n=20)	48% (n=12)	
Oxidação	Presença (n=176)	73,8% (n=45)	96,7 % (n=59)	100,0% (n=43)	95,0% (n=19)	83,3% (n=10)	< 0,0001
	Ausência (n=21)	26,2% (n=16)	3,3% (n=2)	0,0% (n=0)	5,0% (n=2)	16,7% (n=1)	
Regeneração	Presença (n=19)	26,2% (n=16)	1,6% (n=1)	0,0% (n=0)	5,0% (n=2)	0,0% (n=0)	0,013
	Ausência (n=178)	73,8% (n=45)	98,3% (n=60)	100,0% (n=43)	95,0% (n=19)	100,00% (n=11)	

APÊNDICE 9. Comparação múltipla das variáveis qualitativas de contaminação fúngica; contaminação bacteriana; oxidação e regeneração (teste de Qui-quadrado) em função do tamanho dos explantes.

Variáveis		Tamanho dos explantes		p-valor
		2-4 mm (n=148)	4-6 mm (n=128)	
<b>Contaminação fúngica</b>	Presença (n=6)	2,0% (n=3)	2,3% (n=3)	0,866
	Ausência (n=270)	98,0% (n=145)	97,7% (n=125)	
<b>Contaminação bacteriana</b>	Presença (n=73)	31,7% (n=46)	21,6% (n=27)	0,142
	Ausência (n=197)	68,3% (n=99)	78,4% (n=98)	
<b>Oxidação</b>	Presença (n=176)	95,0% (n=94)	83,7% (n=82)	0,651
	Ausência (n=21)	5,0% (n=5)	16,3% (n=16)	
<b>Regeneração</b>	Presença (n=21)	5,0% (n=5)	15,3% (n=15)	0,027
	Ausência (n=176)	95,0% (n=94)	84,7% (n=83)	