

**RESULTADOS PRELIMINARES SOBRE O ESTUDO DA FASE DE ENRAIZAMENTO,
EM NOGUEIRA (*Juglans nigra* L.) PROPAGADA *in vitro*.**

A. P. JACOB¹; A. PEIXE²; J. GREGO¹ E J. BOHM³

¹Escola Superior Agrária de Santarém, S. Pedro
2000 Santarém

² Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal, Universidade de Évora,
7001 Évora Codex

³ Viveiros Jorge Bohm Lda. Ap.4,
7050 Montemor-o-Novo

RESUMO

Foram efectuados ensaios para o estudo da indução da formação de raízes adventícias em estacas de noqueira (*Juglans nigra* L.) micropropagadas. Foi utilizado o protocolo de enraizamento proposto por Ripetti *et al.*, (1994) tendo sido estudada a duração do período de indução da rizogénese (entre três a sete dias) para uma concentração de 3 mg l⁻¹ de IBA; o efeito de várias concentrações de fluoroglucinol (PG) (0,5; 1; 1,5 e 2 mg l⁻¹) como co-factor da acção do IBA e ainda o efeito da administração líquida (contacto por imersão com a base da estaca) de diferentes concentrações de IBA (de 8 a 140 mg l⁻¹).

Os resultados obtidos mostram que a adição de 3 mg l⁻¹ de IBA ao meio de cultura, conduziu à obtenção de taxas de enraizamento na ordem dos 40% para 3 e 4 dias de indução; a administração líquida de IBA não induziu rizogénese para qualquer das concentrações utilizadas. Obtiveram-se taxas de enraizamento de 100% para cinco dias de indução, na presença de 3 mg l⁻¹ de IBA e 2 mg l⁻¹ de PG incorporados no meio de indução.

Palavras-chave: noqueira; micropropagação; rizogénese; cultura *in vitro*.

ABSTRACT

Experimentation was made to induce adventitious root formation in micropropagated walnut (*Juglans nigra* L.). The protocol used was proposed by Ripetti *et al.*, (1994) and it was studied the

duration of the rooting induction period (between 3 to 7 days) to a single concentration of IBA (3 mg l^{-1}); the effect of several concentrations of phluoroglucinol (PG) as a co-factor of the rooting effect of the IBA; and the effect of the liquid administration of several concentrations of IBA (from 8 to 140 mg l^{-1}).

The obtained results showed the best rooting rate (100%) for 5 days of induction in the presence of 3 mg l^{-1} IBA and 2 mg l^{-1} of PG when added to the culture medium. The presence of 3 mg l^{-1} of IBA induce only 40% rooting for 3 and 4 days of induction. Liquid administration of hormones and co-factors didn't give positive results in adventitious root formation.

Key Words: walnut; micropropagation; root formation; *in vitro* culture.

1 - INTRODUÇÃO

A micropropagação da noqueira continua a ser objecto de investigação (Kevers *et al.*, 1997; Sanchez-Olate *et al.*, 1997; Chenevard *et al.*, 1997), sobretudo nos aspectos ligados à indução do desenvolvimento de raízes adventícias (Navatel & Bourrain, 1994; Ripetti *et al.*, 1994; Kevers *et al.*, 1997). A utilização de compostos fenólicos inibidores da oxidação de auxinas exógenas está documentado como co-factor indutor da proliferação e da rizogénese para inúmeras espécies (James & Thurbon, 1981; Zimmerman & Broome, 1981; Berardi *et al.*, 1991; Ponchia & Tonon, 1993; Hammatt, 1994; Nandi *et al.*, 1996). Na noqueira, a sua utilização no enraizamento tem dado origem a resultados contraditórios, uma vez que Loewe (1990) refere uma marcada influência do PG no enraizamento de *J. regia* L., enquanto que Ponchia & Tonon, (1993) referem a sua não eficácia no enraizamento da mesma espécie.

Neste trabalho apresentam-se os resultados do estudo de enraizamento de *J. nigra* L. *in vitro*. Averiguou-se a eficácia da administração líquida de várias concentrações de auxinas, a influência da variação do período de indução e a acção de diferentes concentrações de fluoroglucinol como co-factor da acção do IBA.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas estacas uninodais de *J. nigra* L. provenientes da rebentação de sementes. O material vegetal foi desinfectado por imersão numa solução com HgCl_2 a 0,1% (p/v) durante 15 minutos, 1% PVP (p/v) e 0,01% de Tween 20 (v/v). O estabelecimento das culturas foi efectuado

em DKW sem reguladores de crescimento e modificado (DKWJ) pela adição de 200 mg l⁻¹ de FeEDDHA, contra a redução da composição inicial de ferro para metade. O material foi mantido em proliferação *in vitro* em DKWJ, suplementado com 4,5 µM de BAP e 5 nM de IBA durante três anos, em câmara climatizada, com temperatura diurna de 26 °C e 50 mmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. Na última sub-cultura antes da passagem para o meio de enraizamento o meio de cultura foi suplementado com 1,25 µM de BAP e 1,25 nM de IBA.

Delinearam-se dois blocos experimentais, o primeiro para testar a influência do PG na actividade rizogénica do IBA, suplementando o meio de indução com várias concentrações de PG (0 a 2 mg l⁻¹) para uma concentração fixa de 3 mg l⁻¹ de IBA e o segundo para estudar a eficácia da aplicação líquida de IBA por contacto directo com a estaca, testando-se, em ambos os blocos, 10 plantas por modalidade.

No primeiro bloco experimental, as plantas foram introduzidas em DKWJ com redução a 1/4 dos macronutrientes, permanecendo a 26 °C em condições de obscuridade. As plantulas foram repicadas para o meio de expressão, segundo o protocolo proposto por Jay-Allemand, *et al.*, (1992), a 26 °C, com 16 horas de fotoperíodo e 50 mmol. m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. No segundo bloco experimental, após a indução por imersão basal numa solução de IBA, as estacas foram colocadas em meio de expressão (Jay-Allemand, *et al.*, 1993), em idênticas condições de crescimento. Contabilizaram-se o número de estacas enraizadas e o número de raízes produzidas.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da análise dos resultados apresentados na Quadro I, verifica-se que houve produção de raízes adventícias para todas as modalidades em que o meio de cultura foi suplementado com auxina, com e sem fluoroglucinol. A suplementação do meio de cultura apenas com IBA conduziu a melhores resultados de enraizamento, relativamente à modalidade com 0,5 mg l⁻¹ de PG. Para 1 e 1,5 mg l⁻¹ de PG, as percentagens de enraizamento foram idênticas (Fig.1), manifestando-se no entanto a indução da rizogénese num período indutivo mais alargado, entre 4 e sete dias. Nas nossas condições, a adição 2 mg l⁻¹ de fluoroglucinol ao DKWJ suplementado com 3 mg l⁻¹ de IBA conduziu a taxas máximas (100%) de enraizamento para 5 dias de indução (Quadro I).

Quadro I – Percentagem de enraizamento e número médio de raízes nas diferentes modalidades.

Período de indução (dias)	Reguladores de crescimento (mg l ⁻¹)									
	3 IBA 0 PG		3 IBA 0,5 PG		3 IBA 1,0 PG		3 IBA 1,5 PG		3 IBA 2,0 PG	
	% enraizamento	Nº médio raízes	% enraizamento	Nº médio raízes	% enraizamento	Nº médio raízes	% enraizamento	Nº médio raízes	% enraizamento	Nº médio raízes
3	40	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	40	1	0	0	40	1,5	40	1,5	80	2,3
5	20	3	40	3	40	1,5	50	5,6	100	1,6
6	20	1	20	1	40	5	60	3	60	1
7	0	0	0	0	20	1	20	1	0	0

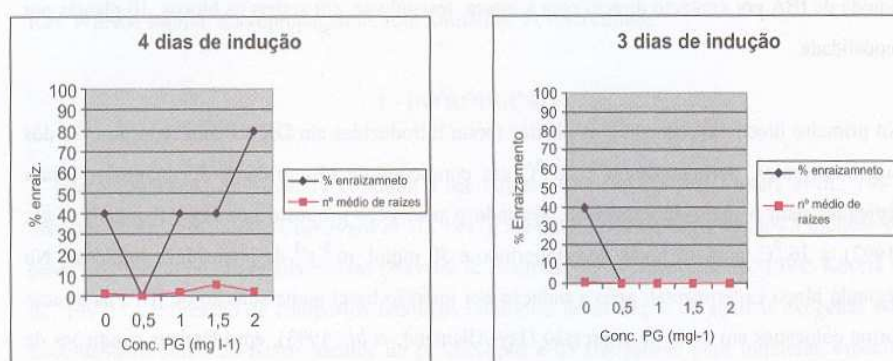


Fig. 1 – Percentagem de enraizamento e número médio de raízes produzidas para um período de 4 e 3 dias de indução, respectivamente, em meio de cultura suplementado com várias concentrações de PG e 3 mg l⁻¹ de IBA.

Nos registos de utilização do fluoroglucinol como co-factor da acção no IBA na noqueira (Ponchia & Tonon, 1993; Loewe, 1990), as metodologias de enraizamento são distintas, uma vez que se utilizam 30 e 14 dias respectivamente para a indução com resultados de 0% de enraizamento para 30 dias e 13% para 14 dias.

Quanto à duração do período de indução, 3 dias são insuficientes para a indução à rizogénese para qualquer das modalidades, enquanto que o período de 7 dias, pelas baixas percentagens de enraizamento induzidas, parece ser excessivo.

Um período de indução entre os 4 e os 6 dias é assim o que apresenta os melhores resultados, quer em número de estacas enraizadas, quer na qualidade das raízes produzidas (Fig. 2; 3 e 4).



Fig. 2 - Enraizamento em meio suplementado com 0,5 mg l⁻¹ de PG e 3 mg l⁻¹ de IBA, para 4 dias de indução.



Fig. 3 - Enraizamento em meio suplementado com 1,5 mg l⁻¹ de PG e 3 mg l⁻¹ de IBA, para 5 dias de indução.



Fig. 4 - Enraizamento em meio suplementado com 3 mg l⁻¹ de IBA, para 5, 6 e 7 dias de indução respectivamente.

A qualidade das estacas parece não ser factor decisivo para o sucesso da indução ao enraizamento, dado que foi possível obter a formação de raízes nas modalidades com 1, 1,5 e 2 mg l⁻¹ de PG, em estacas pequenas e desprovidas de folhas (Fig. 3).

As raízes produzidas em meios suplementados com 0,5 mg l⁻¹ de PG são de baixa qualidade (Fig. 2), enquanto que nas outras modalidades o sistema radical se apresenta bem formado, não existindo aparentemente qualquer diferença qualitativa entre as diferentes modalidades testadas. De referir no entanto que na modalidade suplementada com 2 mg l⁻¹ de PG, para 7 dias de indução, existe excessiva formação de *calli* na base da estaca (Fig. 4).

A metodologia de indução por imersão da base da estaca mostrou ser ineficiente na produção de raízes adventícias, para qualquer dos períodos e das concentrações hormonais estudados, à semelhança do referido por outros autores.

BIBLIOGRAFIA

BERARDI, G. *et al.*, 1991. *In vitro* rooting of *Pyrus calleryana*. *Acta Horticulturae* **300**:181-188.

CHENEVARD, D.; FROSSARD, J. S. & JAY-ALLEMAND, C., 1997. Development of photosynthetic ability of hybrid walnut plantlets during acclimatization. *Acta Horticulturae* **442**:163-168.

- DRIVER J. & KUNIYUKI, A. H., 1988. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *HortScience*. **19**:507-509.
- HAMMATT, N., 1994. Promotion by phloroglucinol of adventitious root formation in micropropagated shoots of adult wild cherry (*Prunus avium* L.). Plant growth regulators. *Kluwer Academic Publishers*. **14**(2):127-132.
- JAMES, D. J. & THURBON, I. J., 1981. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9 and the promotive effects of phloroglucinol. *Journal of Horticultural Science*. **56**:15-20.
- JAY-ALLEMAND, C.; CAPELLI, P. & CORNU D., 1992. Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite – containing gelrite medium. *Scientia Horticulturae*. **51**:335-342.
- JAY-ALLEMAND, C.; PENG, S.; CAPELLI, P. & CORNU, D., 1993. Micropropagation of walnut hibrid trees: some factors involved in rooting. *Acta Horticulturae*. **311**:117-124.
- KEVERS, *et al.*, 1997. Involvement of putrescine and of its catabolic pathway in the induction of rooting of walnut shoots *in vitro*. Biology of root formation and development. *Arie Altman and Yoav Waisel Edit.*. 161-162.
- NANDI, S. K., *et al.*, 1996. Chemical induction of adventitious root formation in *Taxus baccata* cuttings. Plant growth regul. *Kluwerd Academic Publishers*. **19** (2):117-122.
- NAVATEL J. C. & BOURRAIN L., 1994. Influence of the physical structure of the medium on *in vitro* rooting. *Adv. Hort. Sci*. **8**:57-59.
- PONCHIA G. & TONON G., 1993. Risultati preliminari di ricerche sulla micropropagazione del noce. *Rivista di Frutticoltura*. **1**: 91-94.
- RIPETTI, V., *et al.*, 1994. Two successive media for the rooting of walnut shoots *in vitro*. Changes in peroxidase activity and in ethylene production. *Adv. Hort. Sci*. **8**:29-32.

SANCHEZ-OLATE, *et al.*, 1997. Parameters affecting the *in vitro* growth and rooting of *Juglans regia* L. *Acta Hort.* **442**:235-240.

ZIMMERMAN, R. H.& BROOME, O. C., 1981. Phoroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **106**(5):648-652.