

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

CLONAGEM DE NOGUEIRA-PECÃ: MICROPROPAGAÇÃO E MINISTAQUIA
COMO ALTERNATIVAS PARA PRODUÇÃO DE PORTA-ENXERTOS

Márcio Alberto Hilgert
Engenheiro Agrônomo/UFRGS
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2023

CIP - Catalogação na Publicação

Hilgert, Márcio Alberto

Clonagem de noqueira-pecã: micropropagação e
miniastaquia como alternativas para produção de
porta-enxertos / Márcio Alberto Hilgert. -- 2023.
195 f.

Orientador: Claudimar Sidnei Fior.

Coorientadora: Marília Lazarotto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2023.

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

MÁRCIO ALBERTO HILGERT
Engenheiro Agrônomo - UFRGS
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTOR EM FITOTECNIA

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

Aprovado em: 03/03/2023
Pela Banca Examinadora

CLAUDIMAR SIDNEI FIOR
Orientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

CARLA ANDRÉA DELATORRE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA
PPG Fitotecnia/UFRGS

ENÉAS RICARDO KONZEN
UFRGS

NILTON CÉSAR MANTOVANI
UFSM

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir a obtenção dessa conquista e pela realização de cada sonho.

Aos meus pais Mauri Alberto Hilgert (*in memoriam*) e Maria Bernadete Gewehr Hilgert, meu irmão Marcelo Alberto Hilgert, por todo apoio e carinho e agora juntos alcançarmos esta conquista. Aos demais familiares também agradeço pela torcida.

Ao professor Claudimar Sidnei Fior por toda orientação, apoio, confiança e atenção para a realização deste trabalho, além da contribuição para o meu crescimento profissional.

A professora Marília Lazarotto, pela ajuda e contribuição durante o trabalho, assim como orientação desde o período de iniciação científica até o início do Doutorado.

Ao professor Enéas Konzen pela atenção e apoio concedido nos trabalhos, e por estar sempre disponível para ajudar.

Aos professores do Departamento de Horticultura e Silvicultura pelos ótimos momentos de convivência, ensinamentos e cooperação.

Aos colegas da pós-graduação e aos alunos de iniciação científica por toda ajuda, convívio e contribuição durante o trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, ao Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia, e aos técnicos administrativos, pela oportunidade e todo suporte oferecido para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro e às empresas Paralelo 30 Ltda. e Tecnoplanta Ltda. pela doação de sementes para realização dos estudos.

E a todas as pessoas que de forma direta ou indireta também contribuíram para obtenção dessa conquista.

CLONAGEM DE NOGUEIRA-PECÃ: MICROPROPAGAÇÃO E MINIESTAQUIA COMO ALTERNATIVAS PARA PRODUÇÃO DE PORTA-ENXERTOS¹

Autor: Márcio Alberto Hilgert
Orientador: Claudimar Sidnei Fior
Coorientadora: Marília Lazarotto

RESUMO

Carya illinoensis (Wangenh) K. Koch, conhecida popularmente como noqueira-pecã, é uma espécie frutífera e florestal decídua, pertencente à família Juglandaceae. A produção comercial de mudas da espécie é realizada por meio da enxertia, porém, frequentemente utilizam-se sementes como via para produção dos porta-enxertos e, conseqüentemente, gera variabilidade entre plantas. Desta forma, um dos principais entraves da produção de mudas em viveiros está atrelado à dificuldade de uniformização e redução de variabilidade dos porta-enxertos. Portanto, objetivou-se neste estudo testar a micropropagação e a miniestaquia de noqueira-pecã, desenvolvendo protocolos para clonagem, visando a obtenção de plantas uniformes de porta-enxertos da espécie. Na micropropagação foi verificada a influência de agentes desinfestantes na assepsia do material propagativo em conjunto com o estiolamento do material, assim como adequação de composição de meio de cultura, concentração de citocinina na proliferação, e auxina no enraizamento *in vitro*, além do resgate de material de plantas adultas via brotações oriundas de segmentos de ramo sem e com suplementação de frio de 360 h a 4 ± 2 °C. Em relação à miniestaquia, foi testado o efeito de doses de adubação nitrogenada em minicepas, além da seleção precoce de genótipos, com origem seminal de quatro cultivares da espécie. Na micropropagação, o uso de estiolamento de matrizes de noqueira-pecã acarretou, em conjunto com agentes de assepsia, a redução de fungos e, em menor proporção, a contaminação bacteriana, sendo controlado com o uso de Plant Preservative Mixture. Em relação ao meio de cultura, a concentração de sais ocasionou diferenças em relação às variáveis avaliadas, no qual o meio de cultura DKW proporcionou resultados superiores, além de melhor desenvolvimento dos explantes. O uso de reguladores de crescimento também demonstrou ser essencial no cultivo *in vitro*. No resgate de material de plantas adultas, segmentos de ramo com menor diâmetro possuem baixa necessidade de suplementação de frio, ao contrário de segmentos com maior diâmetro, entretanto estes são mais indicados para o uso do cultivo *in vitro* da espécie devido à característica juvenil das brotações mais próximas a base. Também foi verificada a influência das diferentes épocas de coleta do material propagativo, assim como efeito positivo da adubação nitrogenada de minicepas. Genótipos de noqueira-pecã diferiram em relação à produção e enraizamento de miniestacas, assim como em relação à época de coleta. Por meio das épocas de coleta foi possível selecionar genótipos com resultados superiores, em relação à média geral, para as variáveis analisadas em quatro épocas de coleta, possibilitando o incremento posterior na taxa de multiplicação da espécie. Os resultados demonstraram a possibilidade de clonagem de *C. illinoensis*, via micropropagação e miniestaquia, sendo uma alternativa de propagação de porta-enxertos da espécie.

Palavras-chave: *Carya illinoensis*; estiolamento; propagação; variabilidade.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (195 f.) Março, 2023.

PECAN CLONING: MICROPROPAGATION AND MINI-CUTTING AS ALTERNATIVES FOR ROOTSTOCK PRODUCTION¹

Author: Márcio Alberto Hilgert

Adviser: Claudimar Sidnei Fior

Co adviser: Marília Lazarotto

ABSTRACT

Carya illinoensis (Wangenh) K. Koch, popularly known as pecan, is a deciduous fruit and forest species belonging to the Juglandaceae family. The commercial production of seedlings of the species is carried out through grafting, however seeds are used for the production of rootstocks and consequently generating variability between plants. Thus, one of the main barriers to production in nurseries is linked to the difficulty of standardizing and reducing the variability of rootstocks. Therefore, the objective of this study was to test the micropropagation and mini-cutting of pecan, developing protocols for cloning, aiming at obtaining uniform plants from rootstocks of the species. In micropropagation, the influence of disinfecting agents on the asepsis of the propagating material was verified in conjunction with the etiolation of the material, as well as the adequacy of the composition of the best culture medium, concentration of cytokinin in the proliferation, and auxin in the *in vitro* rooting, in addition to the rescue of material from adult plants through shoots from branch segments without and with cold supplementation of 360 h at 4 ± 2 °C. Regarding mini-cuttings, the effect of nitrogen fertilization doses on mini-stumps was tested, in addition to the early selection of genotypes, with seminal origin from four cultivars of the species. In micropropagation, the use of etiolation of pecan matrices, in conjunction with asepsis agents, result in the reduction of fungi and, to a lesser extent, bacterial contamination, however this contamination being controlled with the use of Plant Preservative Mixture. Regarding the culture medium, the concentration of salts caused differences in relation to the evaluated variables, in which the DKW culture medium presented superior results, in addition to better development of the explants. The use of growth regulators has also been shown to be essential *in vitro*. In the rescue of material from adult plants, stem segments with smaller diameters have less need for cold supplementation, however segments with larger diameters are more suitable for the use of *in vitro* cultivation of the species due to the juvenile characteristic of the shoots closer to the base. The influence of the different propagation material collection times was also verified, as well as the positive effect of nitrogen fertilization of mini-stumps. Pecan tree genotypes differed in relation to the production and rooting of mini-cuttings, as well as in relation to the time of collection. Pecan genotypes differed in terms of production and rooting of mini-cuttings, as well as in terms of collection time. Through the collection times, it was possible to select genotypes with superior results, in relation to the general average, for the variables analyzed in four collection times, allowing the subsequent increase in the species multiplication rate. The results demonstrated the possibility of cloning *C. illinoensis*, via micropropagation and mini-cutting, being an alternative for propagating rootstocks of the species.

Keywords: *Carya illinoensis*; etiolation; propagation; variability.

¹ Doctoral thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (195 p.) March, 2023.

SUMÁRIO

Página

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	A espécie <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) K. Koch	5
2.2	Características botânicas	6
2.3	Propagação da espécie <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) K. Koch.....	8
2.3.1	Propagação sexuada	8
2.3.2	Propagação assexuada.....	10
2.4	Estaquia de espécies lenhosas	12
2.5	Micropropagação.....	17
2.6	Referências	23
3	CAPÍTULO 1 - Controle fúngico e bacteriano na micropropagação de noqueira-pecã.....	31
3.1	Introdução.....	32
3.2	Material e métodos	34
3.3	Resultados e discussão	41
3.4	Conclusões	50
3.5	Referências	50
4	CAPÍTULO 2 - Meio de cultura para micropropagação de noqueira-pecã.....	54
4.1	Introdução.....	55
4.2	Material e métodos	56
4.3	Resultados e discussão	60
4.4	Conclusões	69
4.5	Referências	69
5	CAPÍTULO 3 – Multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> de noqueira-pecã.....	73
5.1	Introdução.....	74
5.2	Material e métodos	76
5.3	Resultados e discussão	80
5.4	Conclusões	90
5.5	Referências	90
6	CAPÍTULO 4 – Obtenção de explantes a partir de plantas adultas para micropropagação de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) K. Koch.....	94
6.1	Introdução.....	95
6.2	Material e métodos	97
6.3	Resultados e discussão	103
6.4	Conclusões	110
6.5	Referências	111

7	CAPÍTULO 5 - Adubação nitrogenada em minicepas de <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) K. Koch e sua influência na produtividade e no enraizamento de miniestacas ao longo das estações do ano	114
7.1	Introdução.....	115
7.2	Material e métodos	117
7.3	Resultados e discussão	122
7.4	Conclusões	139
7.5	Referências	140
8	CAPÍTULO 6 - Miniestaquia como ferramenta para seleção precoce de matrizes de porta-enxertos de noqueira-pecã	144
8.1	Introdução.....	145
8.2	Material e métodos	148
8.3	Resultados e discussão	153
8.4	Conclusões	166
8.5	Referências	167
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	171
10	APÊNDICES	174

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1	
1. Tratamentos de desinfestação de explantes de matrizes de noqueira-pecã sem estiolamento e com estiolamento. Porto Alegre, 2020.....	37
2. Épocas de incubação para produção de material propagativo, troca de meio de cultura e uso de tratamentos com PPM. Porto Alegre, 2020.....	38
3. Análise de variância para as variáveis oxidação (O), contaminação fúngica (CF), contaminação bacteriana (CB) e sobrevivência (S) de explantes de <i>C. illinoensis</i> em meio de cultura WPM (Llyod & McCown 1980) aos 90 dias após a incubação. Porto Alegre, 2020.....	41
4. Análise de variância para as variáveis oxidação (O), contaminação fúngica (CF), contaminação bacteriana sobre explantes (CBSO), contaminação bacteriana sob explantes (CBS), enraizamento (E) e sobrevivência (S) de explantes de <i>C. illinoensis</i> em meio de cultura WPM (Llyod & McCown 1980), acrescido com concentrações de PPM, aos 35 dias após a incubação. Porto Alegre, 2021.....	45
CAPÍTULO 2	
1. Análise de variância para as variáveis oxidação (O), contaminação fúngica (CF), contaminação bacteriana (CB), sobrevivência (S), número de brotações (NB), comprimento de brotações de explantes (CBE), número de folhas por explante (NF) e sua interação com três meios de cultura e seis concentrações de sais em explantes de <i>C. illinoensis</i> aos 60 dias após a incubação. Porto Alegre, 2021.....	61
2. Oxidação, contaminação bacteriana e sobrevivência de explantes de <i>C. illinoensis</i> submetidos aos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) e WPM (Llyod & McCown 1980) aos 60 dias após a incubação. Porto Alegre, 2021.....	64
CAPÍTULO 3	
1. Épocas de incubação para produção de material propagativo, troca de meio de cultura, uso de tratamentos com ácido indolbutírico e avaliação do estudo 2. Porto Alegre, 2022.....	79

2.	Análise de variância para as variáveis oxidação (O), contaminação fúngica (CF), contaminação bacteriana (CB), formação de calo (C), número de brotações por explante (NB), comprimento de brotações de explantes (CBE), número de folhas por explante (NF) e hiperidricidade (H) de explantes de <i>C. illinoensis</i> aos 60 dias após a incubação em meio de cultura DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) com seis concentrações de benzilaminopurina (BAP). Porto Alegre, 2022.....	81
3.	Análise de variância para as variáveis oxidação (O), contaminação fúngica (CF), contaminação bacteriana (CB), formação de calo (C) e enraizamento (E) de explantes de <i>C. illinoensis</i> aos 30 dias após a incubação em meio de cultura DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) com seis concentrações de ácido indolbutírico (AIB). Porto Alegre, 2022.....	87
 CAPÍTULO 4		
1.	Análise de variância para número de brotações por segmento de ramo (NBSR), número de explantes por segmento de ramo (NESR), oxidação (%) (O), contaminação fúngica (CF), contaminação bacteriana (CB), sobrevivência (S) e sua interação com três escalas de diâmetros de segmentos de ramo e três cultivares de <i>C. illinoensis</i> após 70 dias de coleta. Porto Alegre, 2021.....	103
2.	Média de número de brotações e de explantes por segmento de ramo de três cultivares de <i>C. illinoensis</i> e três intervalos de segmentos de ramo após 70 dias de coleta. Porto Alegre, 2021.....	104
3.	Análise de variância para número de brotações por segmento de ramo (NBSR), número de explantes por segmento de ramo (NESR), contaminação fúngica (CF), oxidação (O), contaminação bacteriana (CB), sobrevivência (S) e sua interação com segmentos de ramo de três escalas de diâmetros, e suplementação de frio, visando à obtenção de explantes para micropropagação de <i>C. illinoensis</i> , cultivar Barton, após 70 dias de coleta. Porto Alegre, 2022.	106
4.	Contaminação fúngica e contaminação bacteriana em explantes de nogueira-pecã, oriundos de segmentos de ramo com e sem suplementação de frio, após 30 dias da realização da incubação. Porto Alegre, 2022.....	107
5.	Média de número de brotações e de explantes por segmentos de ramo, oriundos de segmentos com e sem suplementação de frio da cultivar Barton, e três intervalos de diâmetro de ramo, após 70 dias de coleta. Porto Alegre, 2022.....	108
 CAPÍTULO 5		
1.	Datas de coleta de miniestacas de nogueira-pecã durante o período de 29/12/2020 até 17/05/2022, de acordo com a estação do ano em minicepas adubadas com diferentes doses de nitrogênio. Porto Alegre, 2022.....	120

	Página
2. Doses de fertilizantes utilizados em minicepas de <i>C. illinoensis</i> , com aplicação através de fertirrigação de 50 mL por minicepa, a cada sete dias. Porto Alegre, 2022.....	121
3. Análise de variância para as variáveis total miniestacas por época de coleta (MEC), miniestacas por minicepa (MM), formação de calo (FC), enraizamento (E), número de raízes por miniestaca (NR), comprimento da maior raiz (CMR), massa fresca de raízes (MFR), massa seca de raízes (MSR), sobrevivência miniestacas (S) e sua interação com cinco épocas de coleta e seis doses de adubação nitrogenada em minicepas de <i>C. illinoensis</i> . Porto Alegre, 2022.....	123
4. Sobrevivência (S), formação de calo (FC) e enraizamento (E) de miniestacas de <i>C. illinoensis</i> em cinco épocas de coletas aos 60 dias após a coleta. Porto Alegre, 2022.....	125
5 Análise de variância para as variáveis (MFR), massa seca de raízes (MSR) e volume de raízes (VR) de minicepas de <i>C. illinoensis</i> e nitrogênio acumulado (NA) ao final de cinco épocas de coleta com o uso de seis doses de adubação nitrogenada. Porto Alegre, 2022.....	133
 CAPÍTULO 6	
1. Datas de coleta de acordo com a estação do ano de miniestacas oriundas de minicepas de noqueira-pecã de origem seminal de quatro cultivares. Porto Alegre, 2022.....	150
2. Produção de miniestacas por matriz, enraizamento e sobrevivência de miniestacas de noqueira-pecã aos 60 dias após a coleta, coletadas em cinco épocas e agrupamento não hierárquico de k-médias. Porto Alegre, RS, 2022....	155
3. Produção de miniestacas por matriz, sobrevivência, porcentagem de sobrevivência (S%), enraizamento e porcentagem de enraizamento (E%) de miniestacas de noqueira-pecã aos 60 dias após a coleta de do grupo superior de cada época de coleta. Porto Alegre, RS, 2022.....	159
4. Miniestacas por matriz, sobrevivência e enraizamento nas épocas de coleta de verão/20-21, outono/21, primavera/21, verão/21-22, outono/22 e somatório de épocas para setes matrizes superiores selecionadas de noqueira-pecã. Porto Alegre, 2022.....	163
5 Média geral de matrizes (MGM), média de matrizes selecionadas, ganho genético indireto (GGI) e ganho genético indireto em porcentagem (GGI%) de matrizes de noqueira-pecã para produção de miniestacas, sobrevivência e enraizamento aos 60 dias após a coleta para cada época de coleta e total de coletas. Porto Alegre, RS, 2022.....	165

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

1. Plantas matrizes (A), estiolamento (B) e fitômero de 5 mm de comprimento com uma gema (C) de *C. illinoensis* após 14 dias em câmara de crescimento sem iluminação e temperatura constante de 30 ± 2 °C. Porto Alegre, 2020..... 36
2. Incubação explantes iniciais (A), material vegetativo em frascos coletivos (B) e individualizados (C) de *C. illinoensis* em meio de cultura WPM (Llyod & McCown 1980). Porto Alegre, 2020..... 39
3. Oxidação (A) e contaminação fúngica (B) de explantes de *C. illinoensis* submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação aos 90 dias após a incubação. Porto Alegre, 2020. T1 sem estiolamento, T2 sem estiolamento + álcool a 70% por 30 s, T3 sem estiolamento + álcool a 70% por 30 s + NaClO a 1,5% por 10 min, T4 sem estiolamento + NaClO a 1,5% por 10 min, T5 sem estiolamento + NaClO a 1,5% por 10 min + ClO₂ a 0,007% por 30 min T6 sem estiolamento + ClO₂ a 0,007% por 30 min, T7 estiolamento, T8 estiolamento + álcool a 70% por 30 s, T9 estiolamento + álcool a 70% por 30 s + NaClO a 1,5% por 10 min, T10 estiolamento + NaClO a 1,5% por 10 min, T11 estiolamento + NaClO a 1,5% por 10 min + ClO₂ a 0,007% por 30 min, T12 estiolamento + ClO₂ a 0,007% por 30 min..... 43
4. Contaminação bacteriana (A) e sobrevivência (B) de explantes de *C. illinoensis* submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação aos 90 dias após a incubação. Porto Alegre, 2020. T1 sem estiolamento, T2 sem estiolamento + álcool a 70% por 30 s, T3 sem estiolamento + álcool a 70% por 30 s + NaClO a 1,5% por 10 min, T4 sem estiolamento + NaClO a 1,5% por 10 min, T5 sem estiolamento + NaClO a 1,5% por 10 min + ClO₂ a 0,007% por 30 min T6 sem estiolamento + ClO₂ a 0,007% por 30 min, T7 estiolamento, T8 estiolamento + álcool a 70% por 30 s, T9 estiolamento + álcool a 70% por 30 s + NaClO a 1,5% por 10 min, T10 estiolamento + NaClO a 1,5% por 10 min, T11 estiolamento + NaClO a 1,5% por 10 min + ClO₂ a 0,007% por 30 min, T12 estiolamento + ClO₂ a 0,007% por 30 min..... 44
5. Contaminação bacteriana sobre explante (A) e sob explantes (B) de bactérias endofíticas em *C. illinoensis* submetidos a concentrações de PPM em meio de cultura WPM (Llyod & McCown 1980) aos 35 dias após a incubação. Porto Alegre, 2021..... 46
6. Sobrevivência (A) e enraizamento (B) de explantes de *C. illinoensis* submetidos a concentrações de PPM em meio de cultura WPM (Llyod & McCown 1980) aos 35 dias após a incubação. Porto Alegre, 2021..... 47

7. Enraizamento de explantes de *C. illinoensis* em meio de cultura WPM (Llyod & McCown 1980), com 1 mL L⁻¹ de PPM (A) e colônia bacteriana em meio de cultura oriunda de explantes, sem adição de PPM aos 35 dias após a incubação (B). Porto Alegre, 2021..... 48

CAPÍTULO 2

1. Oxidação (A) e contaminação bacteriana (B) em explantes de *C. illinoensis* submetidos a diferentes concentrações de sais dos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) e WPM (Llyod & McCown 1980) aos 60 dias após a incubação. Porto Alegre, 2021..... 65
2. Sobrevivência (A) e número de brotações por explante (B) de *C. illinoensis* submetidos a concentrações de sais dos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) e WPM (Llyod & McCown 1980) aos 60 dias após a incubação. Porto Alegre, 2021..... 66
3. Comprimento de brotações (A) e número folhas por explante (B) de *C. Illinoensis* submetidos a concentrações de sais dos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) e WPM (Llyod & McCown 1980) aos 60 dias após a incubação. Porto Alegre, 2021..... 67
4. Explantes de *C. illinoensis* em meio de cultura com (A) DKW (Driver & Kuniyuki, 1984), (B) WPM (Llyod & McCown 1980) e (C) MS (Murashige & Skoog, 1962), com concentração de sais de 100% aos 60 dias após a incubação. Porto Alegre, 2021..... 68

CAPÍTULO 3

1. Formação de calo (A) e número de brotações por explante (B) de *C. illinoensis* submetidos a seis concentrações de benzilaminopurina em meio de cultura DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) aos 60 dias após a incubação. Porto Alegre, 2022..... 83
2. Número de folhas por explante (A) e hiperidricidade (B) de explantes de *C. illinoensis* submetidos a seis concentrações de benzilaminopurina em meio de cultura DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) aos 60 dias após a incubação. Porto Alegre, 2022..... 84
3. Brotações *in vitro* de *C. illinoensis* com ocorrência de hiperidricidade (A) e sem ocorrência de hiperidricidade (B), em explantes submetidos à concentração de 5 mg L⁻¹ de benzilaminopurina em meio de cultura DKW (Driver & Kuniyuki, 1984), aos 60 dias após a incubação. Porto Alegre, 2022... 86
4. Formação de calo (A) e enraizamento (B) de explantes de *C. illinoensis* submetidos a seis concentrações de ácido indolbutírico em meio de cultura DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) aos 30 dias após a incubação. Porto Alegre, 2022..... 88

CAPÍTULO 4

1. Segmentação de ramo de *C. illinoensis* (A) e alocação (B) em substrato areia e mantidos em câmara de crescimento sem iluminação, com temperatura constante de 30 ± 2 °C e umidade relativa média de 85%. Porto Alegre, 2021... 99
2. Início da emissão de brotações após 25 dias da alocação dos segmentos de ramo (A) e brotações após 14 dias do início da emissão de brotações (B) de nogueira-pecã cultivar Barton, em câmara de crescimento sem iluminação, com temperatura constante de 30 ± 2 °C e umidade relativa média de 85%. Porto Alegre, 2021..... 102

CAPÍTULO 5

1. Estratificação de sementes de *C. illinoensis* (A), transplante para recipientes individuais preenchidos com areia média (B), desponte da planta para quebra da dominância apical e emissão de brotações (C); e alocação de miniestacas em casa de vegetação com nebulização intermitente (D). Porto Alegre, 2020.... 119
2. Formação de calo (A) emissão de raízes (B) de miniestacas oriundas de minicepas *C. illinoensis* submetidas à dose de 33,5 mg/minicepa de nitrogênio na época de coleta do outono/22 aos 60 dias após a coleta. Porto Alegre, 2022..... 126
3. Produção de miniestacas total (A) e produção por minicepa de *C. illinoensis*, submetidas a seis doses de nitrogênio e cinco épocas de coleta. Porto Alegre, 2022..... 128
4. Temperatura máxima, mínima e média no interior da estufa agrícola a cada 14 dias e mensal, durante o período de dezembro de 2020 a julho de 2022, com minicepas de *C. illinoensis* adubadas com diferentes doses de nitrogênio. Porto Alegre, 2022..... 130
5. Número de raízes (A) e comprimento da maior raiz (B) de miniestacas oriundas de minicepas *C. illinoensis*, submetidas a seis doses de nitrogênio e cinco épocas de coleta aos 60 dias após a coleta. Porto Alegre, 2022..... 132
6. Massa fresca (A) e massa seca (B) de raízes de miniestacas oriundas de minicepas *C. illinoensis*, submetidas a seis doses de nitrogênio e cinco épocas de coleta aos 60 dias após a coleta..... 133
7. Massa fresca (A), massa seca (B), volume (C) de raízes de minicepas de *C. illinoensis* e nitrogênio acumulado no substrato areia (D) ao final de cinco épocas de coleta com o uso de seis doses de adubação nitrogenada. Porto Alegre, 2022..... 134
8. Análise de pH de substrato areia em minicepas de *C. illinoensis* ao longo do experimento, com aplicação de seis doses de adubação nitrogenada. Porto Alegre, 2022..... 136

9. Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$) de substrato areia com desenvolvimento de minicepas de *C. illinoensis* ao longo do experimento com aplicação de doses de adubação nitrogenada. Porto Alegre, 2022..... 138

CAPÍTULO 6

1. Estrutura (A), forração plástica (B), brita para infiltração de água (C) e espaçamento entre minicepas (D) na construção do minijardim clonal de *C. illinoensis*. Porto Alegre, 2020..... 149
2. Miniestaca (A) e minicepa após a coleta (B) de *C. illinoensis* cultivadas em minijardim clonal durante o verão/20-21. Porto Alegre, 2021..... 151
3. Agrupamento não hierárquico de k-médias para as variáveis produção de miniestacas por matriz, sobrevivência e enraizamento nas épocas de coleta de verão/20-21 (A), verão/21-22 (B), outono/21 (C), outono/22 (D), primavera/21 (E) e somatório de épocas de coleta (F) para 240 matrizes de noqueira-pecã. Porto Alegre, 2022..... 154
4. Análise de correlação de Spearman para as variáveis miniestacas por matriz, sobrevivência e enraizamento nas épocas de coleta de verão/20-21 (A), verão/21-22 (B), outono/21 (C), outono/22 (D), primavera/21 (E) e somatório épocas (F) para 240 matrizes de noqueira-pecã. Porto Alegre, 2022..... 157
5. Emissão de brotações (A) e enraizamento (B) de miniestacas oriundas de minicepas de *C. illinoensis* cultivadas em minijardim clonal no período de coleta do verão/22. Porto Alegre, 2022..... 158
6. Temperatura máxima, mínima e média no interior da estufa agrícola a cada 14 dias e mensal, durante o período de dezembro de 2020 a julho de 2022, com 240 matrizes de *C. illinoensis*. Porto Alegre, 2022..... 161
7. Umidade relativa do ar máxima, mínima e média no interior da estufa agrícola a cada 14 dias e mensal, durante o período de dezembro de 2020 a julho de 2022, com 240 matrizes de *C. illinoensis*. Porto Alegre, 2022..... 162

RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Scripts análise de variância pacote expdes.pt.....	174
2. Scripts agrupamento k-médias, representação gráfica e correlação de Spearman pacote factoextra.....	174
3. Temperatura máxima, mínima e média no interior da casa de vegetação com nebulização intermitente a cada 14 dias e mensal, durante o período de dezembro de 2020 a julho de 2022. Porto Alegre, 2022.....	177
4. Umidade relativa do ar máxima, mínima e média no interior da casa de vegetação com nebulização intermitente a cada 14 dias e mensal, durante o período de dezembro de 2020 a julho de 2022. Porto Alegre, 2022.....	177
5. Análise de correlação de Spearman para as variáveis miniestacas sobreviventes, formação de calo e enraizamento nas épocas de coleta de verão/2021 (A), verão/2022 (B), outono/2021 (C), outono/2022 (D), primavera/2021 (E) e somatório épocas (F) para minicepas de noqueira-pecã adubadas com doses concentrações de nitrogênio. Porto Alegre, 2022.....	178
6. Análise de variância para as variáveis produção de miniestacas por matriz, enraizamento e sobrevivência de miniestacas de noqueira-pecã aos 60 dias após a coleta, coletadas em cinco épocas e agrupamento não hierárquico de k-médias. Porto Alegre, RS, 2022.....	179
7. Análise de variância para as variáveis produção de miniestacas por matriz, enraizamento e sobrevivência de miniestacas de noqueira-pecã aos 60 dias após a coleta, em cinco épocas de coleta e com agrupamento não hierárquico de k-médias. Porto Alegre, RS, 2022.....	179

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$	Microsiemens por centímetro
μM	Micromolar
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Micromol por metro quadrado por segundo
ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftaleno acético
ANOVA	Análise de variância
atm	Atmosfera
BAP	Benzilaminopurina
$^{\circ}\text{C}$	Grau Centígrado
Ca	Cálcio
CE	Condutividade elétrica
CIN	Cinetina
cm	Centímetro
DKW	Driver & Kuniyuki Walnut medium (1984)
ClO_2	Dióxido de cloro
h	Horas
i.a	Ingrediente ativo
K_2O	Óxido de potássio
KCl	Cloreto de potássio
K	Potássio
Kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mg L^{-1}	Miligrama por litro
min	Minutos
mL	Mililitro
mL L^{-1}	Mililitro por litro
mm	Milímetro
MS	Murashige & Skoog basal medium (1962)
N	Nitrogênio
NaClO	Hipoclorito de sódio
P_2O_5	Pentóxido de fósforo
pH	Potencial de hidrogênio
ppm	Partes por milhão
PPM [®]	Plant preservative mixture
s	Segundos
TDZ	Thidiazuron
ZEA	Zeatina
WPM	Woody Plant Medium of Llyod & McCown (1980)

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta ótimas condições edafoclimáticas para o cultivo de uma grande diversidade de espécies frutíferas de norte a sul do país, possuindo uma das maiores produções de frutas do mundo, no qual ocupa a terceira posição como maior produtor (Abrafrutas, 2022). Destaca-se também na pesquisa com espécies frutíferas e florestais, entretanto, estas se restringem a culturas com mercado estabelecido e com maior área de cultivo. Deste modo, outras espécies exóticas e nativas ainda possuem lacunas de conhecimento relacionadas à produção de mudas e ao sistema de cultivo, os quais poderiam favorecer ainda mais o cenário do agronegócio e diversificar a produção.

A espécie *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch é nativa da América do Norte, sendo o cultivo difundido para outros países como o Brasil. A principal finalidade de seu cultivo consiste na produção de nozes para consumo *in natura* e processado, mas existem também amplas possibilidades da utilização de sua madeira, devido a sua alta qualidade para produção de móveis, além da produção de trufas oriundas da simbiose de fungos com as raízes da espécie (Ferrara *et al.*, 2023). Nos Estados Unidos, devido ao grande valor econômico das nozes, são realizados estudos com a espécie visando o desenvolvimento de cultivares resistentes às principais doenças e melhoramento para aumento de rendimento por fruto (Vendrame & Wetzstein, 2005; Grauke *et al.*, 2015; Lovell *et al.*, 2021). Assim como nos Estados Unidos, a China vem desenvolvendo programas de melhoramento com a espécie, principalmente relacionados ao aumento da produção e rendimento de nozes por planta (Zhang *et al.*, 2015). No entanto, no Brasil, os estudos com a espécie ainda são recentes e necessitam de maiores recursos para contemplar todas as condições de seu

cultivo em nosso território, embora a mesma não tenha sido introduzida tão recentemente. Essa introdução ocorreu por volta de 1870, porém o aumento significativo da área de cultivo aconteceu a partir de criação de viveiros, com a importação de propágulos de cultivares oriundas dos Estados Unidos e incentivos fiscais para o reflorestamento a partir de meados da década de 1960 (Ortiz & Camargo, 2005).

A propagação de mudas de noqueira-pecã pode ser realizada de forma sexuada, com o uso de sementes, ou assexuada, com o uso da técnica da enxertia, utilizando porta-enxertos oriundos de sementes (Zhuangzhuang *et al.*, 2023). A enxertia consiste na formação de uma única planta a partir da união dos tecidos de duas plantas, na qual há a união do enxerto (cultivar copa) e do porta-enxerto, com necessidade de contato direto com o câmbio para que ocorra a formação de calo e cicatrização dos tecidos (Mo *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2021). Atualmente, no Brasil, os viveiros ainda não utilizam outros métodos de propagação vegetativa, como a micropropagação ou miniestaquia, nem mesmo do porta-enxerto, também não havendo seleção de materiais superiores para estas finalidades.

A miniestaquia consiste em uma técnica de propagação vegetativa pela qual são utilizadas miniestacas oriundas de plantas matrizes com origem seminal, estaquia ou da própria miniestaquia (Joaquini *et al.*, 2021). Assim como a miniestaquia, a micropropagação também é uma forma de propagação clonal, consistindo no uso pequenos fragmentos de material vegetativo, que por meio do princípio da totipotencialidade, possibilitam a regeneração completa de uma planta (Hartmann *et al.*, 2014; Runter, 2015). Entre as vantagens das técnicas estão a possibilidade de seleção de materiais superiores e posteriormente a sua propagação de forma clonal em grande escala.

A seleção de porta-enxertos compreende em uma etapa primordial para produção de mudas, já que este irá influenciar em diversas características da planta, como absorção de nutrientes, tolerância à deficiência hídrica, salinidade, características de frutos, distribuição de raízes, vigor das plantas e tolerância a pragas e doenças. A seleção e

clonagem de porta-enxertos são fundamentais para obtenção de resultados superiores, especialmente com o uso daqueles mais adaptados ao ambiente (Hartmann *et al.*, 2014). Mesmo considerando essa premissa básica de seleção e propagação que não é atendida, a comercialização das mudas ocorre com um valor muito alto, chegando a R\$ 57,00 por muda enxertada (Hilgert, 2019), o que pode ser excessivamente oneroso para alguns produtores, dificultando o incremento de área plantada.

É possível afirmar que há alternativas para aumentar a produtividade de pomares por meio de pesquisas sobre técnicas propagação, assim como a realização de seleção de porta-enxertos de *C. illinoensis* no Brasil. Resultados positivos com a clonagem e seleção de porta-enxertos da espécie proporcionariam maior uniformidade dos pomares, uma vez que o principal método de produção de mudas atualmente consiste na enxertia de cultivares comerciais, sem a utilização de porta-enxertos específicos e clonados. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi verificar a possibilidade desenvolvimento de protocolo de micropropagação da espécie e também propagação vegetativa por miniestaquia, visando proporcionar melhorias no sistema de produção de mudas e produção de pomares, beneficiando diversos setores da pecanicultura brasileira. Assim, os estudos realizados com a espécie objetivaram:

- Verificar a possibilidade de propagação vegetativa da espécie por meio da micropropagação e miniestaquia de materiais de origem seminal;
- Avaliar a influência do estiolamento e métodos de desinfestação de explantes de noqueira-pecã para o estabelecimento *in vitro*;
- Adequar meio de cultura e concentração de sais no estabelecimento e desenvolvimento de explantes de noqueira-pecã;
- Definir a concentração da citocinina benzilaminopurina para a fase de emissão de brotações em explantes de noqueira-pecã;

- Definir a concentração da auxina ácido indolbutírico na fase de enraizamento *in vitro*;
- Verificar a emissão de brotações, assim como estabelecimento *in vitro* de explantes oriundos de ramos com diferentes idades ontogenéticas de plantas adultas de noqueira-pecã;
- Verificar o efeito de doses de nitrogênio, na adubação de minicepas, assim como épocas de coletas na produtividade e no processo de rizogênese de miniestacas da espécie;
- Avaliar a influência da época de coleta de miniestacas, de minicepas de origem seminal de quatro cultivares de noqueira-pecã, na produtividade e enraizamento, assim como a seleção de genótipos superiores em relação às variáveis avaliadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A espécie *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch

Carya illinoensis (Wangenh) K. Koch é conhecida popularmente no Brasil como noqueira-pecã, sendo uma espécie caducifolia pertencente à família Juglandaceae (Fronza *et al.*, 2016; Fabrizio *et al.*, 2018). Sua distribuição natural ocorre em países da América do Norte, como Estados Unidos e México, sendo nativa do vale do Rio Mississippi, nos Estados Unidos, onde encontra as melhores condições de desenvolvimento às margens de rios e se estende para o leste e oeste do Kansas e Texas, também sendo encontrada na região do centro e nordeste do México (Willians, 2013).

O cultivo de noqueira-pecã é realizado, predominantemente, para a obtenção da noz, que possui alto valor agregado relacionado à suas propriedades nutracêuticas e baixa perecibilidade. De acordo com Vendrame & Wetzstein (2005), além do consumo *in natura*, há o uso da noz para extração de óleo com a finalidade de produção de remédios e alimentação, além disso, sua madeira possui uma ótima qualidade para a produção de móveis, caracterizando-se também como uma importante opção para exploração florestal.

Os países com maior produção de noz-pecã são Estados Unidos e México, no qual juntos corresponderam a 90% da produção mundial de 129.510 toneladas da safra de 2021/2022 (International Nut and Dried Fruit Council Foundation, 2022). No entanto, o cultivo está se difundindo significativamente para outros países, como Canadá, Austrália, África do Sul e Brasil (Wells, 2017), dentre os quais, este último já ocupa o quarto lugar na produção mundial de noz-pecã (International Nut and Dried Fruit Council Foundation, 2022). O consumo de noz-pecã vem crescendo mundialmente, principalmente devido à

procura por alimentos saudáveis, assim como estudos que demonstram suas propriedades na mitigação dos riscos de acidente vascular cerebral, doenças cardiovasculares e mortalidade por diabetes (Aune *et al.*, 2016).

No Brasil, a pecanicultura teve grande expansão principalmente na região sul do país, onde se encontra a maior parte das áreas de cultivo, com a finalidade de produção de nozes para consumo *in natura* ou processado (Tomazelli, 2013; Fronza *et al.*, 2018). A introdução da cultura da noqueira-pecã no país foi primeiramente realizada por imigrantes norte-americanos no município de Santa Barbara D' Oeste, localizado no estado de São Paulo (SP), em 1870, onde os imigrantes trouxeram em sua bagagem nozes que deram origem às primeiras plantas (Duarte & Ortiz, 2001). No entanto, o cultivo comercial teve início em 1929 no município de Limeira (SP), pelo viveiro Dierberger, por meio da importação de cultivares norte americanas e posterior propagação via enxertia (Fronza *et al.*, 2015). No estado do Rio Grande do Sul (RS), o início da produção de mudas ocorreu no município de Anta Gorda em 1943 (Fronza *et al.*, 2015).

Durante as décadas de 1960 e 1970 ocorreu uma rápida expansão da instalação de novos pomares no RS, principalmente devido à lei 5.106/66 (Brasil, 1966), que forneceu incentivos fiscais e possibilitou a utilização de espécies exóticas no reflorestamento. Entretanto, conforme Ortiz & Camargo (2005), o cultivo da espécie teve decréscimo logo após sua introdução por falta de informações sobre a cultura e problemas de doenças ocasionadas por patógenos, especialmente por fungos. Atualmente o Rio Grande do Sul possui a maior área de cultivo da espécie, correspondendo a 70% da área cultivada nacionalmente que é de 9.500 hectares (Rio Grande do Sul, 2020).

2.2 Características botânicas

A noqueira-pecã possui folhas compostas, formadas por 9 a 15 folíolos dispostos de forma imparipinada (Andersen & Shahid, 2012). O tronco possui a coloração acinzentada e lisa em plantas jovens, apresentando, posteriormente, o descascamento em lascas na idade

adulta. O sistema radicular da espécie é formado por uma raiz pivotante, composta por raízes laterais e com inúmeras radículas responsáveis pela absorção de água e nutrientes (Janick & Paull, 2008). A raiz pivotante da espécie pode alcançar até 10 m de profundidade e as raízes laterais até 2 m de profundidade, contudo em sua maioria estas se concentram entre os 30 a 60 cm (Fronza *et al.*, 2015).

A espécie possui inflorescências monoico-díclinas, com flores do tipo estaminadas, formadas no ciclo vegetativo do ano anterior, e pistiladas, formadas em ramos novos, dispostas separadamente na mesma planta (Janick & Paull, 2008). O florescimento ocorre a partir do início da primavera, após o período de dormência e com o aumento da temperatura. Segundo Fronza *et al.* (2018), as flores pistiladas são encontradas em brotações do ano, já as flores estaminadas encontram-se em longos pedúnculos com grande quantidade de pólen, denominados de amentos, sendo o pólen transportado principalmente pelo vento. Além disso, há a ocorrência de dicogamia, com períodos diferentes entre a receptividade do estigma da parte pistilada e a liberação do pólen dos estames na realização da polinização. Devido à existência de dicogamia, a noqueira-pecã pode ser classificada em protândrica, com a formação e a liberação do pólen antes do estigma estar receptivo, ou protogínica, quando o estigma apresenta receptividade antes da formação e liberação do pólen (De Marco *et al.*, 2021). Para aumentar a produtividade, é necessário o planejamento antecipado de pomares com o uso de plantas protândricas e protogínicas para realização da polinização cruzada, além de melhorar a qualidade e rendimento dos frutos (Janick & Paull, 2008).

O fruto da noqueira-pecã é considerado uma drupa seca, envolto por uma cápsula formada por seis secções de coloração verde, oriunda do epicarpo e mesocarpo, no qual, quando ocorre a maturação fisiológica, há a liberação de endocarpo com a semente (Lim, 2012). Segundo Janick & Paull, 2008, o eixo embrionário está localizado na extremidade da junção dos cotilédones, sendo esta a parte comestível. As nozes se formam agrupadas

em glomérulos localizados na extremidade dos ramos do ano de produção (Martins *et al.*, 2021), no qual cada glomérulo pode conter até seis nozes, sendo o início da colheita realizada no Brasil no mês de abril, estendendo-se até o final de maio.

2.3 Propagação da espécie *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch

A produção comercial de mudas é realizada com o uso de sementes ou por meio da propagação vegetativa pela técnica da enxertia. Atualmente, o cultivo da espécie *C. illinoensis* ocorre, principalmente, com a utilização de mudas propagadas vegetativamente por meio da técnica da enxertia e, assim, conservando as características da planta matriz na porção produtiva da árvore (Zhenghai *et al.*, 2018). Entretanto, o método de enxertia apenas mantém as características da planta matriz na parte aérea que haverá a produção de nozes, devido ao fato do porta-enxerto ser obtido de sementes oriundas de polinização cruzada, gerando variabilidade genética entre plantas (Warren, 2015). Mudas oriundas diretamente de sementes também são utilizadas na formação de pomares, porém, ocasionam problemas de falta de uniformidade e aumento do período de início de produção devido à juvenilidade das plantas. Além do método de propagação, as mudas diferenciam-se em relação ao sistema de produção em duas categorias, mudas de raiz descoberta ou em recipientes (Fronza *et al.*, 2015).

2.3.1 Propagação sexuada

O uso de sementes na propagação de plantas, também conhecida como propagação sexuada, está relacionado ao processo de meiose, no qual o maior benefício consiste na variabilidade genética por meio da união de gametas na fecundação, originando uma planta geneticamente diferente (Bai, 2015; Rinehart *et al.*, 2015). A propagação sexuada é um processo que ocorre desde vegetais primários até espécies mais evoluídas, diferenciando-se principalmente pelas estruturas do sistema reprodutivo modificado e atingindo a máxima diferenciação nas angiospermas (Marcos-Filho, 2015).

A reprodução sexual, além de ampliar a variabilidade genética, garantir a perpetuação da espécie e a continuidade das gerações futuras, possui a função, por meio da variabilidade gerada, de segregar alelos que poderão contribuir na adaptação quando houver alguma alteração do ambiente (Brzyski & Culley, 2014). No entanto, plantas obtidas de sementes não são adequadas para a implantação de pomares comerciais, devido à desuniformidade de plantas, contudo, apresentam potencial para serem utilizadas como porta-enxertos em diversas espécies frutíferas (Franzon *et al.*, 2010).

O uso de sementes de noqueira-pecã ocorre, principalmente, para produção de porta-enxertos da espécie (Vahdati *et al.*, 2020). No entanto, segundo Zhang *et al.* (2015), há dificuldades na produção de porta-enxertos, devido a problemas na germinação e elevada demanda de tempo até o desenvolvimento propício dos porta-enxertos para que ocorra enxertia.

A germinação de sementes compreende um evento complexo, no qual inúmeros fatores estão envolvidos até a formação de uma plântula. De acordo com Bewley *et al.* (2013), as sementes desidratadas e posteriormente submetidas ao processo de embebição apresentam respostas típicas de um padrão trifásico na absorção da água e hidratação, no qual ocorrem diferentes processos físicos e metabólicos devido ao movimento da água em cada fase. Além disso, sementes de algumas espécies vegetais não germinam ou apresentam desuniformidade na germinação, mesmo quando submetidas a condições ideais para que ocorra o processo. De acordo com Baskin & Baskin (2004), a dormência das sementes consiste em uma estratégia que traz benefícios às espécies por acarretar uma distribuição da germinação ao longo do tempo, garantindo a perpetuação da espécie, visualizado como um período de tempo em que inúmeros processos ocorrem na semente, tais como fisiológicos/bioquímicos, alterações morfológicas/anatômicas, desenvolvimento do embrião e ativação e desativação de genes. No entanto, em relação à produção de mudas, a dormência pode ser um problema devido à desuniformidade da germinação e

formação de plantas, o que ocorre na noqueira-pecã, caracterizando-se como um entrave na germinação de sementes da espécie (Mceachern, 2010; Shu-Fang *et al.*, 2011; Fronza *et al.*, 2015). De acordo com Poletto *et al.* (2015), a dormência de sementes de noqueira-pecã é embrionária, e pode ser superada pelo processo de estratificação a 4°C durante 90 dias. Todavia, Sparks *et al.* (1995), sugere que a dormência em sementes de *C. illinoensis* é adquirida com o passar da maturação e conseqüentemente desidratação, devido a espécie apresentar viviparidade e não entrando em dormência antes da deiscência, o que se contrapõe ao definido como dormência embrionária.

Outro fator que também está relacionado com a desuniformidade da germinação de sementes é o rígido endocarpo, o qual não ocasiona restrições para absorção de água, mas dificulta o processo de germinação e posteriormente o alongamento da raiz (Liu *et al.*, 2022). Porém, conforme Hilgert *et al.* (2021), a realização de escarificação em sementes de noqueira-pecã melhora a absorção de água e antecipa a emissão da radícula, fazendo com que a embebição, que consiste no primeiro passo da germinação, seja homogênea.

Além de tratamentos para a superação de dormência, a temperatura possui grande influência na germinação e no desenvolvimento inicial de plântulas. De acordo com Hilgert *et al.* (2021), a temperatura mais indicada para germinação de sementes de noqueira-pecã é de 25°C, sendo que temperatura igual ou superior a 30°C há formação de plântulas anormais e temperatura igual ou inferior a 20°C não há germinação.

Deste modo, além da variabilidade genética natural, oriunda da segregação, há dificuldades na obtenção de lotes de mudas homogêneas também pela desuniformidade da germinação dificultando a propagação comercial da espécie.

2.3.2 Propagação assexuada

A propagação assexuada consiste no processo no qual não há recombinação gênica, havendo formação de indivíduos a partir de estruturas vegetativas, por conseguinte, a

formação de plantas geneticamente idênticas à planta fornecedora de propágulo, sendo um processo importante na produção de espécies frutíferas e florestais (Hartmann *et al.*, 2014; Runter, 2015). Dentre as vantagens do processo de propagação assexuada em noqueira-pecã está a diminuição do período de juvenilidade para a produção de nozes, no qual há o início da produção a partir dos cinco anos, diferentemente de plantas oriundas de sementes, que iniciam a produção a partir de 10 anos (Zhenghai *et al.*, 2018).

Atualmente a forma mais utilizada para propagação assexuada de noqueira-pecã consiste na enxertia, na qual são utilizados porta-enxertos de sementes oriundos de polinização aberta (Zhuangzhuang *et al.*, 2020). No entanto, há possibilidade de incompatibilidade entre porta-enxerto e enxerto, devido a produção de compostos fenólicos e baixa circulação de seiva nos tecidos do xilema, podendo ocasionar, eventualmente, redução na taxa sucesso no processo de enxertia (Su *et al.*, 2021).

A estaquia consiste em outra técnica possível para propagação assexuada de noqueira-pecã, com a vantagem da obtenção de maior uniformidade das plantas geradas devido à ausência de variação genética, mas ainda não foram totalmente esclarecidos os entraves para o sucesso de sua utilização (Fabrizio *et al.*, 2018). De acordo com Hilgert *et al.* (2020), a espécie apresenta dificuldade para o enraizamento de estacas obtidas de plantas adultas, com baixos percentuais de enraizamento, provavelmente relacionada a idade ontogenética do material, além de haver grande influência da época de coleta do material propagativo.

Devido a problemas relacionados à propagação vegetativa, como custo, incompatibilidade de tecidos, baixa sobrevivência, outros métodos como a miniestaquia e cultivo *in vitro* apresentam potencial de propagação da espécie. A miniestaquia a partir de matrizes de plantas de origem seminal, apresenta elevado percentual de enraizamento da espécie, sendo uma alternativa de propagação vegetativa da espécie (Hilgert *et al.*, 2021), além da possibilidade de seleção de matrizes superiores. Outro método com potencial para

propagação clonal da espécie é o cultivo *in vitro* com a possibilidade de produção de um elevado número de clones em um curto espaço de tempo após a definição do protocolo de micropropagação da espécie (Fabrizio *et al.*, 2018).

2.4 Estaquia de espécies lenhosas

A estaquia é uma técnica de propagação assexuada, que possibilita a produção de plantas de forma massal, aliada à alta qualidade em um curto período de tempo, no entanto o sucesso está atrelado à competência no processo de enraizamento de cada espécie (Osburn *et al.*, 2015; Stuepp *et al.*, 2015). A técnica consiste na utilização de partes vegetativas da planta selecionada, que pode ser raiz, broto ou folha, que é submetida a um ambiente adequado onde haverá a regeneração, rizogênese, até a formação de uma nova planta completa (Ruter, 2015). As principais vantagens em se utilizar essa técnica de propagação vegetativa é a possibilidade de seleção e fixação de genótipos superiores selecionados, eliminando a variabilidade genética, acarretando em benefícios como produção clonal com maior uniformidade e produtividade (Xavier *et al.*, 2013). A técnica é operacionalizada em diferentes etapas, começando com a coleta do material propagativo, confecção das estacas, uso de substrato com baixa retenção de água e elevado espaço de aeração, alocação do material propagado em ambiente com elevada umidade do ar e temperatura, com sistema de irrigação por aspersão ou nebulização, finalizando com a aclimação (Hartmann *et al.* 2014). Em espécies que apresentam dificuldade de enraizamento de estacas, também é comumente realizado a aplicação de reguladores de crescimento do grupo da auxina, como o ácido indolbutírico (Taiz *et al.*, 2017).

A utilização da técnica é possível devido, principalmente, a capacidade das células diferenciadas da região do corte desdiferenciarem-se, retornando à capacidade meristemática necessária para o desenvolvimento de uma nova planta (Goulart *et al.*, 2014). Assim, as raízes de origem adventícia se formariam a partir do grupo de células próximas ao corte, que retornam às suas funções meristemáticas, convertendo-se em

primórdios radiciais, devido à totipotencialidade (Hartmann *et al.*, 2014). No entanto, segundo o mesmo autor, os primórdios radiciais podem ter início diretamente a partir de células do tecido vascular, ou em algumas espécies a partir da formação de calo, que consiste em uma massa de células desdiferenciadas ou com certo grau de diferenciação, formadas a partir da divisão de células deste tecido. Existem inúmeros fatores ambientais, condições do processo estaquia, características vegetais que isoladamente ou em conjunto interferem no sucesso do enraizamento. Dentre eles se destacam a época de coleta, condições fisiológicas da planta fornecedora de propágulos, condições do ambiente da estaquia, sanidade da planta matriz, característica do propágulo e nutrição da planta matriz (Xavier *et al.*, 2013).

Em relação à época de coleta, o sucesso na propagação pela técnica de estaquia está relacionado às variações na taxa de atividades meristemáticas e da lignificação dos tecidos do material propagativo (Fachinello *et al.*, 2005; Wendling *et al.*, 2014). Além da influência em plantas matrizes, diferentes épocas de coleta interferem no processo de enraizamento, relacionado à função regulatória do metabolismo dos propágulos e enraizamento.

Em temperaturas baixas, que ocorrem em decorrência da estação do ano, como outono e inverno, proporcionam condições desfavoráveis ao enraizamento adventício, tais como a redução no metabolismo dos tecidos da estaca, ocasionando uma maior demanda de tempo para o enraizamento, ou acarretando a inibição da indução, desenvolvimento e crescimento radicial (Xavier *et al.*, 2013). O efeito de baixas temperaturas varia em relação à espécie, em que espécies caducifólias tendem a entrar em repouso vegetativo, chamado de dormência, no qual há redução drástica das atividades do metabolismo, quando comparado às estações quentes. Efeito contrário ocorre em temperaturas excessivamente altas, podendo ocorrer a brotação da parte aérea de estacas antes do enraizamento, ocasionado o consumo da maior parte da reserva das estacas, devido a perda de água pelas folhas (Pereira, 2015).

A miniestaquia consiste em uma variação da estaquia, no qual são utilizados órgãos vegetativos menores, chamados de miniestacas, sendo oriundos de plantas matrizes com origem seminal, vegetativa (estaca, por exemplo) ou da própria miniestaquia (Alfenas *et al.*, 2009; Joaquina *et al.*, 2021). A técnica da miniestaquia é uma alternativa que pode suprir a necessidade do resgate da juvenilidade do material vegetativo, considerada como limitante na etapa de indução radicial, ocasionada pelo processo de maturação ontogenética dos órgãos das plantas fornecedoras de propágulos (Hartmann *et al.*, 2014). A miniestaquia possui vantagens em comparação à estaquia, na qual se destacam o uso de minijardins clonais, com necessidade de menor área em comparação aquelas necessárias para manter as plantas matrizes a campo, diminuição de custos para coleta e transporte de brotos, controle de fatores bióticos e abióticos, além de aumento da produtividade de material propagativo por matriz (Dias *et al.*, 2012; Naidu & Jones, 2016).

O minijardim clonal consiste em um matrizeiro, no qual cada matriz, que é componente do minijardim, é chamada de minicepa e os propágulos oriundos de cada minicepa são chamados de miniestacas. O cultivo das minicepas ocorre em estruturas formadas de vasos individualizados ou tubetes, canaletões de fibrocimento (Souza *et al.*, 2013) ou canaletões de fibra de vidro (Mantovani *et al.*, 2017), podendo ser construído dentro ou fora de ambiente protegido. O preenchimento das estruturas pode ser realizado com o uso de substratos como areia, substratos comerciais, combinações de materiais, os quais devem apresentar característica física e químicas adequadas, além de serem inertes e livres de patógenos (Higashi *et al.*, 2002). Além do preenchimento com substrato, a parte inferior dos recipientes é preenchido com materiais como cascalhos e brita para haver a drenagem da água da irrigação e fertirrigação.

A nutrição da minicepa também possui grande influência na propagação pela técnica da miniestaquia. Além de afetar o crescimento das minicepas e a produção de miniestacas, a quantidade de nutrientes presentes em miniestacas afeta diretamente a

rizogênese e o desenvolvimento radicial, devido a esses nutrientes estarem envolvidos em rotas metabólicas e processos fisiológicos (Araújo, 2020).

Devido ao maior controle neste sistema, há possibilidade do suprimento específico de irrigação e fertirrigação para atender às demandas hídricas e nutricionais das plantas. De acordo com Xavier *et al.* (2013), para aumentar taxa de sobrevivência e produtividade de minicepas é necessário o controle de fatores como a nutrição e o regime hídrico. A demanda nutricional, assim como a aplicação de doses de nutrientes na adubação de minicepas deve ser realizada de acordo com a exigência nutricional de cada espécie e a época do ano que é realizada, por meio do monitoramento nutricional da solução e substrato (Vargas, 2004). Não há solução nutritiva específica para todas as espécies, contudo uma solução nutritiva equilibrada deve apresentar pH entre 5,8 e 6,2, condutividade elétrica entre 1,5 a 4 mS/cm, temperatura da água com média de 16°C e conter os nutrientes essenciais para cultura. Porém, não deve conter substâncias químicas que podem ser prejudiciais ou ocasionar precipitações, havendo também necessidade de cuidados em relação a elevadas concentrações de sais, o que pode ocasionar a morte de matrizes devido a saída de água de um meio hipotônico para um hipertônico, deste modo causando a saída de água das células (Higashi *et al.*, 2002). A adubação em minijardins clonais é realizada por meio de fertirrigação, no qual ocorre principalmente o uso de sistema localizado de irrigação, com mangueiras de gotejamento que também são usadas para a irrigação das matrizes, com recomendações específicas para a cultura em cada região, considerando as demandas da espécie, diferentes condições climáticas locais ou do ambiente de instalação do minijardim (Fonseca *et al.*, 2019).

A formulação adequada dos nutrientes da solução nutritiva possui papel fundamental no desenvolvimento de minicepas e, posteriormente, no processo de rizogênese das miniestacas. Entre os nutrientes, cabe ressaltar a importância de alguns como o nitrogênio, fósforo, potássio, zinco e ferro. O nitrogênio está relacionado ao

crescimento vegetativo, fazer parte de diversas atividades metabólicas, fotossíntese e acúmulo de biomassa (Cunha *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2017), além de estar atrelado a produção e disponibilidade de hormônios vegetais como citocininas e auxinas (Duarte *et al.*, 2020). No entanto, deve-se ter cuidado em relação a dose deste nutriente, existindo um ponto máximo de sua aplicação, no qual acima deste ponto há diminuição na produção e enraizamento de miniestacas, podendo até levar a morte de minicepas (Freitas *et al.*, 2017). O potássio é um elemento vital para fotossíntese e potencial osmótico. A deficiência do nutriente conduz à diminuição da taxa fotossintética, ocasionado redução da produção de carboidratos e afetando diretamente o crescimento da matriz (Oliveira *et al.*, 2019). O fósforo é um nutriente necessário na produção de energia no metabolismo das plantas, por meio da síntese de adenosina. A falta de fósforo pode ocasionar distúrbios metabólicos relacionados à expansão e divisão celular, além da redução da atividade fotossintética (Andrejow, 2006).

O zinco está relacionado à adaptabilidade da espécie para produção no minijardim clonal, influenciando também na produção de brotos. Este nutriente está implicado na formação do aminoácido triptofano, que atua na produção do ácido indolacético (Brondani *et al.*, 2012), um hormônio fundamental para divisão celular. Outro micronutriente de importância na miniestaquia é o ferro, que atua principalmente na emissão e desenvolvimento de brotações, devido a estar relacionado à síntese de clorofila e estabilização de tilacoides (Andrejow, 2006).

De acordo com Higashi (2002), os nutrientes possuem papel fundamental no desenvolvimento de minicepas, sendo observado em estudos com eucalipto que a deficiência de macronutrientes e micronutrientes causam sintomas específicos no cultivo em minijardim clonal, como a clorose e queda de folhas mais velhas (N), podridão da base (Ca), pontos necróticos no limbo da folha (B), clorose intervenal nas folhas velhas (Fe) e clorose intervenal nas folhas novas (Mn). Estudos em relação à demanda nutricional são

necessários para cada espécie para uma formulação adequada do suprimento de nutrientes, como por exemplo, a solução recomendada por Brondani *et al.* (2012), com a aplicação semanal de 100 mL em *Eucalyptus benthamii*, da solução formada por doses de 60 mg L⁻¹ de N-NO₃, 30 mg L⁻¹ de N-NH⁴, 12 mg L⁻¹ de P, 40 mg L⁻¹ de Ca, 80 mg L⁻¹ de K, 10 mg L⁻¹ de S, 12 mg L⁻¹ de Mg, 0,10 mg L⁻¹ de Cu, 2 mg L⁻¹ Fe, 0,2 mg L⁻¹ de Mo, 1,6 mg L⁻¹ de Mn, 2 mg L⁻¹ de Zn e 2 mg L⁻¹ de B. Contudo, além da espécie e época de coleta, a formulação da solução nutritiva e reposição dos nutrientes também está relacionada com a frequência das coletas de miniestacas, a qual deve ser realizada em menores intervalos e menor quantidade por aplicação, devido ao melhor aproveitamento das minicepas (Wendling *et al.*, 2005).

2.5 Micropropagação

A micropropagação é uma técnica que permite a propagação e conservação de diversas espécies arbóreas. A técnica envolve vários processos, possibilitando a propagação em larga escala de indivíduos com características fenotípicas desejáveis, com o máximo controle de sanidade do ambiente e do material propagado (Bhojani & Dantu, 2013). A técnica consiste em cultivar pequenos fragmentos de material vegetativo, chamados de explantes, oriundos de matrizes, os quais, por meio do princípio da totipotencialidade, regeneram uma planta completa e geneticamente idêntica à matriz da qual explantes foram obtidos (Hartmann *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2015). Em relação ao explante utilizado e a finalidade no processo de micropropagação, há possibilidade de serem utilizados diferentes caminhos no processo de regeneração, por meio da organogênese direta, indireta e embriogênese somática (Hartmann *et al.*, 2014). Segundo o mesmo autor, a organogênese direta consiste na diferenciação diretamente das gemas dos explantes. Na organogênese também há formação de gemas adventícias, as quais consistem em gemas em locais do explante onde não existem naturalmente sendo de forma direta ou indireta. Na organogênese indireta, também há uma fase intermediária, no qual é formado

um calo, que consiste em uma massa de células desorganizadas, (Kane *et al.*, 2015; Mascarenhas *et al.*, 2019), na qual a partir dessas células haverá a formação do novo órgão na organogênese, além da embriogênese somática. O calo também consiste em uma resposta a uma injúria realizada na coleta do material propagativo, não sendo completamente indiferenciado, havendo certo grau de diferenciação e até rediferenciação (Rodrigues *et al.*, 2022).

As etapas de micropropagação de plantas pode ser dividida em três, sendo elas o estabelecimento em cultura asséptica, multiplicação de propágulos e preparação para o restabelecimento da cultura ao solo (Murashigue, 1974). Com a realização de estudos com diferentes espécies houve a inserção de novas etapas na elaboração de protocolos de micropropagação. De acordo Debergh & Maene (1981), a micropropagação pode ser didaticamente dividida em quatro etapas fundamentais, sendo elas: etapa 0, com a preparação das plantas matrizes fornecedoras do material vegetativo; etapa 1, na qual há o estabelecimento *in vitro* da cultura, com escolha dos explantes, sua desinfestação e manutenção do ambiente livre de microrganismos; etapa 2, ocorre a multiplicação de brotos, podendo ser formados diretamente no explante, a partir do crescimento de gemas vegetativas já existentes ou, de gemas formadas de forma adventícia, ou ainda, de forma indireta a partir de gemas formadas nos calos induzidos nos tecidos do explante. A etapa 3 é subdividida em duas sendo que a 3A consiste no alongamento e 3B no enraizamento do material vegetativo formado. Na micropropagação ainda há no final, após o enraizamento, a transferência do material vegetativo formado, saindo de um ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (Bhojwani & Dantu, 2013; Kane *et al.*, 2015).

A etapa de estabelecimento é considerada a mais crítica da micropropagação, principalmente em espécies lenhosas, devido às altas taxas de contaminação e oxidação (Xavier *et al.*, 2013). Entre as dificuldades no estabelecimento de explantes *in vitro* está a relação direta com a presença de microrganismos endógenos e exógenos que influenciam

na viabilidade da técnica e no desenvolvimento do material vegetativo (Lozano *et al.*, 2015). O controle, principalmente de microrganismos superficiais, é realizado com o uso de agentes desinfetantes, como o álcool etílico e hipoclorito de sódio. No entanto, alguns microrganismos endofíticos, principalmente em espécies lenhosas, permanecem viáveis e manifestam-se após alguns subcultivos, competindo por nutrientes do meio de cultura e liberando substâncias fitotóxicas, ocasionando a morte dos propágulos (Dunaeva & Osledkin, 2015).

A contaminação fúngica e bacteriana é um problema evidenciado, principalmente em materiais de plantas adultas de noqueira-pecã, localizadas em pomares, no qual há dificuldade de manter o controle sanitário (Fabrizio *et al.*, 2018). Conforme Grattapaglia & Machado (1998), um conjunto de técnicas são necessárias para diminuir ou evitar a ocorrência de microrganismos no cultivo *in vitro*, como à manutenção de condições ambientais favoráveis, nutrição adequada da planta matriz, aplicação de fungicidas e bactericidas, além de técnicas de estímulo de emissão de brotações vigorosas, como a vernalização e estiolamento. Esta última técnica consiste em manter plantas matrizes em ambiente sem luz e com temperatura que favoreça o desenvolvimento vegetativo, obtendo assim materiais com baixa pigmentação (coloração esbranquiçada) e parede celular fina (Duman *et al.*, 2020). Além disso, acredita-se que o estiolamento diminui a presença de agentes contaminantes, devido ao fato de o alongamento do ápice e entrenós próximos a ele terem crescimento rápido, não sendo acompanhado na mesma velocidade pelo agente contaminante (Torres *et al.*, 1998).

O meio de cultura utilizado na micropropagação é um dos principais fatores no sucesso do desenvolvimento de protocolos de cultivo *in vitro*, pois é responsável pelo fornecimento de substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento de explantes (Araruna *et al.*, 2017). Os compostos que constituem o meio de cultura consistem em sais orgânicos e inorgânicos, compostos inertes, além de algumas substâncias naturais, com ou

sem adição de reguladores de crescimento (Cid, 2014). Protocolos estabelecidos utilizam concentrações dessas substâncias definidas, sem muitas vezes atentar para a demanda da espécie estudada, deste modo podendo ser um fator limitante em relação às respostas morfogênicas almejadas e causando o insucesso no resultado esperado para a micropropagação (Almeida *et al.*, 2012).

Diferentes espécies de plantas apresentam especificidades distintas em relação à demanda por nutrientes, deste modo, houve o desenvolvimento de diferentes meios de cultura em relação a essas demandas, como por exemplo, o meio de cultura MS, inicialmente desenvolvido para *Nicotina tabacum* por Murashige & Skoog (1962), Woody Plant Medium (WPM), desenvolvido para a propagação de plantas lenhosas por Lloyd & McCown (1980) e DKW desenvolvido para *Juglans regia* por Driver & Kuniyuki (1984). A obtenção do equilíbrio dos elementos que compõem o meio de cultura, principalmente nutrientes, e sua interação com os propágulos oriundos da espécie a ser micropropagada, consiste em uma das relações que mais influência na obtenção de um protocolo de micropropagação (Almeida *et al.*, 2012).

Além do meio de cultura, outros fatores afetam o sucesso no desenvolvimento de protocolos específicos de micropropagação, tanto pelo processo de regeneração por organogênese direta ou indireta, nos quais cabe destaque à planta matriz, à temperatura, à luminosidade e, principalmente, aos reguladores de crescimento nas diferentes etapas (Bhojani & Dantu, 2013).

Reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que apresentam características e funções semelhantes aos hormônios produzidos pelas plantas (Hinojosa, 2000). Tais reguladores possuem função primordial na competência e na determinação, que consistem em vias específicas para o desenvolvimento, sendo condições determinantes para a formação dos meristemas radiculares e caulinares (Taiz *et al.*, 2017). Entre as

classes de reguladores de crescimento mais utilizados na micropropagação estão às citocininas e auxinas.

As citocininas pertencem a outro grupo de reguladores de crescimento, que promovem a divisão celular e estimulam a iniciação e o crescimento das brotações *in vitro*, porém inibem o enraizamento (Bhojani & Dantu, 2013). Geralmente, quando a concentração de auxina é baixa em relação à de citocinina, a iniciação radicular é desfavorecida e, quando a concentração é alta, há formação de calos, havendo a iniciação radicular diretamente do calo ou sem a sua formação (Kane *et al.*, 2015). As citocininas mais utilizadas no cultivo *in vitro* de espécies arbóreas são a benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) e zeatina (ZEA) (Oliveira *et al.*, 2013). O thidiazuron (TDZ), que consiste em um composto formado por ureia, o qual possui função como citocinina, também vem sendo utilizado no cultivo *in vitro*, atuando deste modo na indução de brotações na fase de proliferação.

As auxinas possuem função em muitos processos de desenvolvimento, incluindo alongamento celular, dominância apical e formação de raízes adventícias (Pallardy, 2008). Entre os reguladores de crescimento do grupo das auxinas mais utilizados no cultivo *in vitro* estão o ácido indolbutírico (AIB), ácido α -naftaleno acético (ANA), ácido indolacético (AIA) e ácido diclorofenóxiacético (2,4 D). De acordo com Taiz *et al.* (2017), o AIB é o composto usado rotineiramente na horticultura para promover o enraizamento, devido se transformar rapidamente em AIA por β -oxidação. A concentração e o tipo de auxina que serão utilizados promovem resultados variáveis em experimentos que avaliam rizogênese, relacionados principalmente ao tipo de material genético utilizado no cultivo *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2013).

Além dos fatores já mencionados, podem haver entraves na micropropagação devido a problemas com variação somaclonal, oxidação fenólica e a hiperidricidade, os quais podem estar relacionados ao uso de reguladores de crescimento que são adicionados

ao meio de cultura ou interação de fatores. A variação somaclonal pode ocorrer nas diferentes etapas do cultivo *in vitro* de forma induzida com o uso de reguladores de crescimento ou espontânea devido a algum erro na etapa de duplicação do DNA. Além disso, a variação somaclonal também pode ser induzida pelo ambiente do cultivo *in vitro*, gerando estresses ao material propagativo, devido à concentração de produtos, número de subcultivos, além do tipo de materiais utilizados no meio de cultura (Medrano *et al.*, 2018).

A oxidação de explantes ocorre por meio de compostos fenólicos presentes nos explantes, ou pelo excesso de sais no meio de cultura, sendo caracterizado pelo escurecimento do explante (Ahmad *et al.*, 2016; Taghizadeh *et al.*, 2016). A oxidação pode inibir e até ocasionar morte do material propagativo (Cid, 2014). Da mesma forma, pode haver a ocorrência da hiperidricidade do material vegetativo, que consiste em uma desordem fisiológica, a qual confere aspecto vitrificado ao material micropropagado, folhas com aparência translúcida e com característica de serem facilmente quebradas ao serem manuseadas. Entre os motivos para a ocorrência da hiperidricidade, além da espécie, estão a elevada umidade do ar no interior dos recipientes de cultivo (Gao *et al.*, 2018) e a concentração de citocininas utilizada no meio de cultura (Ivanova & Staden, 2014).

Em relação à noqueira-pecã, poucos estudos sobre a propagação *in vitro* foram desenvolvidos, e nestes os pesquisadores enfatizam, principalmente, problemas relacionados à contaminação por microrganismos (Wetzstein *et al.*, 1996; Renukadas *et al.*, 2010; Fabrizio *et al.*, 2018). Estudos quanto ao desenvolvimento de protocolo *in vitro* de noqueira-pecã ainda são incipientes, deste modo há necessidade da realização de pesquisas relacionadas, contribuindo, também, com o incremento de informações relativas à espécie para o setor da pecanicultura do Brasil.

A micropropagação pode ser realizada por meio do uso de material vegetal oriundo da seleção de genótipos em minijardim clonal, os quais apresentam maior juvenilidade. A partir da identificação de genótipos superiores há possibilidade de propagação massal,

deste modo mantendo a homogeneidade do material em um curto espaço de tempo (Sottile *et al.*, 2020). No entanto, de acordo com Beyl (2015), a micropropagação é mais comumente utilizada para produção de novos clones e de matrizes, com características juvenis, para formação de minijardins clonais, devido o rejuvenescimento obtido do material após a realização de subcultivos. Além disso, a miniestaquia possui menor custo de produção, principalmente devido a maior necessidade de mão de obra nas diversas etapas de micropropagação.

2.6 Referências

- ABRAFRUTAS lança estudo sobre produção e comercialização de frutas na Hortitec 2022. [S. l.]: Portal Campo Vivo, 28 jun. 2022. Disponível em: <https://campovivo.com.br/fruticultura/abrafrutas-lanca-estudo-sobre-producao-e-comercializacao-de-frutas-na-hortitec-2022/>. Acesso: 6 set. 2022.
- AHMAD, I. *et al.* Control of media browning in micropropagation of guava (*Psidium guajava*). **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 48, n. 2, p. 713-716, 2016.
- ALMEIDA, L. V. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. S. Johnson**. 2012. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- ANDERSEN, P. C.; SHAHID, M. A. **The pecan tree**. Gainesville: University of Florida. Horticultural Science Department, 2012. 16 p. Disponível em: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/HS/HS22900.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2018.
- ANDREJOW, G. M. P. **Minijardim clonal de *Pinus taeda* L.** 2006. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- ARARUNA, C. *et al.* Salt concentrations in culture media for the development of *Dipteryx alata in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 52, n. 12, p. 1295–1300, 2017.
- ARAÚJO, E. F. **Propagação de *Paratecoma peroba* por miniestaquia**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2020.
- AUNE, D. *et al.* Nut consumption and risk of cardiovascular disease, total cancer, all-cause and cause-specific mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **BMC Medicine**, London, v. 14, [art.] 207, [p. 1-14], 2016.

- BAI, S. N. The concept of the sexual reproduction cycle and its evolutionary significance. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, [art.] 11, [p. 1-9], 2015.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2004.
- BEYL, C. A. Juvenility and its effect on macropropagation and micropropagation. *In*: BEYL, C. A.; TRIGIANO, R. N. (ed.). **Plant propagation concepts and laboratory exercises**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2015. cap. 6, p. 85-94.
- BEWLEY, J. D. *et al.* **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013. 392 p.
- BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. Micropropagation. *In*: BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. (ed.). **Plant tissue culture: an introductory text**. New Delhi: Springer, 2013. cap. 17, p. 245-274.
- BRASIL. Lei nº 5.106, de 2 de setembro de 1966. Dispõe sobre os incentivos fiscais concedidos a empreendimentos florestais. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, p. 10204, 5 set. 1966.
- BRONDANI, G. E. *et al.* Avaliação morfológica e produção de minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* em relação a Zn e B. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, PR, v. 32, n. 70, p. 151-164, 2012.
- BRZYSKI, J.; CULLEY, T. M. Does sexual reproduction matter for a rare clonal species in frequently disturbed habitats? **Journal of the Torrey Botanical Society**, Lawrence, v. 141, n. 4, p. 294–301, 2014.
- CUNHA, A. C. M. *et al.* Relação do estado nutricional de minicepas com o número de miniestacas de eucalipto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 36, n. 79, p. 203-213, 2008.
- CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2014. 325 p.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, p. 335-345, 1981.
- DE MARCO, R. *et al.* Ciclo de desenvolvimento da noqueira-pecã – Escala fenológica. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 20, p. 260-270, 2021.
- DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 19, p. 507-509, 1984.
- DUARTE, M. M. *et al.* Adubação nitrogenada na miniestaquia de erva-mate. **Advances in Forestry Science**, Cuiabá, v. 7, n. 2, p. 981-988, 2020.
- DUARTE, V.; ORTIZ, E. R. N. Podridão de Phytophthora da amêndoa e casca da noqueira pecan. *In*: LUZ, E. D. *et al.* **Doenças causadas por Phytophthora no Brasil**. Campinas: Livraria Rural, 2001. p. 493-508.

- DUMAN, Z. *et al.* Short de-etiolation increases the rooting of VC801 avocado rootstock. **Plants**, Basel, v. 9, n. 11, [art.] 1481, [p. 1-20], 2020.
- DUNAEVA, S. E.; OSLEDKIN, Y. S. Bacterial microorganisms associated with the plant tissue culture. **Agricultural Biology**, Moscow, v. 50, n. 1, p. 3-15, 2015.
- FABRIZIO, G. C. *et al.* Propagation of pecan (*Carya illinoensis*): a review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 17, p. 586–605, 2018.
- FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.
- FERRARA, G. *et al.* Evaluation of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars for possible cultivation for both fruit and truffle production in the Puglia region, southeastern Italy. **Horticulturae**, Basel, v. 9, n. 2, [art.] 261, [p. 1-13], 2023.
- FONSECA, A. F. A *et al.* Clonal gardens, seed production and conilon coffee seedling. *In*: FERRÃO, R. G. *et al.* (ed.). **Conilon coffee**. 3rd ed. Vitória: Incaper, 2019. p. 289-325.
- FRANZON, R.C.; CARPENEDO, S.; SILVA, J.C.S. **Produção de mudas: principais técnicas utilizadas na propagação de frutíferas**. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2010. 54 p.
- FREITAS, A. F. *et al.* Produtividade de minicepas e enraizamento de miniestacas de híbridos de *Eucalyptus globulus* Labill. Em resposta a nitrogênio. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 193–202, 2017.
- FRONZA, D.; POLETTO, T.; HAMANN, J. J. **O cultivo da noqueira-pecã**. Santa Maria: UFSM, 2015. 301 p.
- FRONZA, D.; HAMANN, J. J. **O cultivo da noqueira-pecã**. Santa Maria: UFSM, 2016. 424 p.
- FRONZA, D. *et al.* Pecan cultivation: general aspects. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 48, n. 2, [art.] e20170179, [p. 1–9], 2018.
- GAO, H. *et al.* Hyperhydricity-induced ultrastructural and physiological changes in blueberry (*Vaccinium* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 133 p. 65–76, 2018.
- GOULART, P. B. *et al.* Morfoanatomia da rizogênese adventícia em miniestacas de *Eucalyptus gradis* x *Eucalyptus urophylla*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 145–155, 2014.
- GRATATAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In*: TORRES, A. C. *et al.* (ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1998, p. 182-260.
- GRAUKE, L. J. *et al.* The forest and the trees: applications for molecular markers in the repository and pecan breeding program. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 107, p. 109-126, 2015.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2014. 927 p.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. **Nutrição e adubação em minijardim hidroponico de *Eucalyptus***. Piracicaba: IPEF, 2002. 24 p. (Circular técnica, n. 194). Disponível em: <https://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr194.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2023.

HILGERT, M. A. **Propagação de *Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch**. 2019. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Produção Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

HILGERT, M. A. *et al.* Collection period and indolebutyric acid on the rooting of adult pecan plant cuttings. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 55, p. 1–9, 2020.

HILGERT, M. A. *et al.* Substrates and indole-3-Butyric acid in mini-cuttings rooting of *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 51, n. 3, p. 721–730, 2021.

HILGERT, M. A. *et al.* Luminosidade e temperatura na germinação de sementes de nogueira-pecã. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 74-89, 2021.

HINOJOSA, G. F. Auxina *In*: CID, L. P. B (ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2000. p. 15–53.

IVANOVA, M.; STADEN, J. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, n. 1, p. 13-21, 2011.

INTERNATIONAL NUT AND DRIED FRUIT COUNCIL FOUNDATION. **Nuts & dried fruits: statistical yearbook 2021/2022**. Tarragona: International Nut & Dried Fruit Council, 3 May 2022. Disponível em: https://www.nutfruit.org/files/tech/1651579968_Statistical_Yearbook_2021-2022.pdf. Acesso em: 29 ago. 2022.

JANICK, J.; PAULL, R. E. **The encyclopedia of fruit and nuts**. Cambridge: Cambridge University, 2008. 954 p.

JOAQUINI, F. A.; BIASI, L. A.; TOFANELLI, M. B. Propagação clonal rápida de amoreira preta ‘Xingu’ por miniestaquia. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2021.

KANE, M.E.; KAUTH, P.K.; STEWART, S.L. Micropropagation. *In*: BEYL, C.A.; TRIGIANO, R.N. (Eds). **Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2015. Cap. 30, p.359-370.

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

LIU, J. *et al.* Study on pecan seed germination influenced by seed endocarp. **Open Life Sciences**, Warsaw, v. 17, n. 1, p. 851-855, 2022.

LLOYD, E.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society**, Carlisle, v. 30, n. 1, p. 421-427, 1980.

LOVELL, J. T. *et al.* Four chromosome scale genomes and a pangenome annotation to accelerate pecan tree breeding. **Nature Communications**, London, v. 12, [art.] 4125, [p. 1-12], 2021.

LOZANO, G. D. L.; GUERRERO, M. L.; LÓPEZ, N. Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 17, p. 76-84, 2015.

MANTOVANI, N. *et al.* Cultivo de canafístula (*Peltophorum dubium*) em minijardim clonal e propagação por miniestacas. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 225-236, 2017.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARTINS, C. R. *et al.* **Práticas básicas do plantio à colheita de noz-pecã**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2021. 19 p. (Circular técnica, n. 225). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/228468/1/CIRCULAR-225.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2023.

MASCARENHAS, L. M. S.; SANTANA, J. R. F.; BRITO, A. L. Micropropagation of *Physalis peruviana* L. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 49, [art.] e55603, 2019.

MCEACHERN, G. R. **Pecan seed germination**. College Station, Texas: Texas A&M University, Jan./Feb. 2010. Disponível em: https://aggiehorticulture.tamu.edu/newsletters/hortupdate/2010/jan_feb/PecanSeed.html. Acesso em: 22 dez. 2020.

MEDRANO, E. G. *et al.* Using flow cytometry analysis in plant tissue culture derived plants. In: WALKER, M. J. (ed.). **Methods in molecular biology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2018. p. 317-332.

MO, Z. *et al.* Analysis of differentially accumulated proteins associated with graft union formation in pecan (*Carya illinoensis*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 224, p. 126-134, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 25, p. 135-166, 1974.

NAIDU, D.; JONES, N. Evaluation of mini-cuttings as a propagation system for Eucalyptus hybrids. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1, p. 1-6, 2016.

- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, PR, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.
- OLIVEIRA, T. P. F. *et al.* Exigência nutricional e produtividade em minijardim clonal de *Toona ciliata* var. *Australis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 1154-1167, 2019.
- ORTIZ, E. R. N.; CAMARGO, L. E. A. Doenças da noqueira pecan. *In*: KIMATI, H. *et al.* (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 501-505.
- OSBURN, L. D.; CHENG, Z. M.; TRIGIANO, R. N. Adventitious rooting of woody and herbaceous plants. *In*: BEYL, C. A.; TRIGIANO, R. N. (ed.). **Plant propagation concepts and laboratory exercises**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2015. p. 231-240.
- PALLARDY, S. G. **Physiology of woody plants**. 3rd ed. San Diego: Elsevier, 2008. 454 p.
- POLETO, 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. *In vitro* propagation of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 211-215, 2010.
- RINEHART, T. A. *et al.* Sexual reproduction and breeding. *In*: BEYL, C. A.; TRIGIANO, R. N. (ed.). **Plant propagation concepts and laboratory exercises**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2015. p. 65-84.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural. Câmara Setorial da Noz-Pecã. **Pró-Pecã: noz-pecão no RS**. Porto Alegre, 2020. 1 p. (Nota técnica, 2020). Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202003/09152147-nota-tecnica-noz-pecã-2020.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2022.
- RODRIGUES, F. A. *et al.* Curva de crescimento de calos de *Enterolobium contortisiliquum* induzidos *in vitro*. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2022.
- RUTER, J. M. Cloning plants by rooting stem cuttings. *In*: BEYL, C. A.; TRIGIANO, R. N. (ed.). **Plant propagation concepts and laboratory exercises**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2015. cap. 17, p. 219-230.
- SHARMA, G. C.; SHARMA, M.; BEYL, C. A. Molecular biology and the future of plant propagation. *In*: BEYL, C. A.; TRIGIANO, R. N. (ed.). **Plant propagation concepts and laboratory exercises**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2015. p. 469-497.
- SHU-FANG, L. *et al.* Treatments for germination of *Carya illinoensis* seeds. **Journal of Zhejiang A&F University**, Zhejiang, v. 3, p. 444-449, 2011.

- SOTTILE, F. *et al.* Selection and micropropagation of valuable caper genotypes. **Horticultural Science**, Ashford, v. 47, n. 2, p. 110–116, 2020.
- SOUZA, L. **Tipo de minijardim clonal e efeito do ácido indolbutírico na miniestaquia de *Grevillea robusta* A. cunn. (proteaceae)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- SPARKS, D. *et al.* Fruiting stress induces schuk decline and premature germination in pecan. **Hortscience**, Alexandria, VA, v. 120, p. 43- 53, 1995.
- STUEPP, C. A. *et al.* Estaquia de árvores adultas de *Paulownia fortunei* var. mikado a partir de brotações epicórmicas de decepa. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 667-677, 2015.
- SU, W. C. *et al.* Physiological and biochemical changes during graft union formation in *Carya illinoensis*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 65, p. 203-211, 2021.
- TAGHIZADEH, M.; SOLGI, M.; SHAHRJERDI, I. Essential oil as an alternative to chemical antimicrobial agent for the culture of strawberry in vitro. **Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology**, Timișoara, v. 20, n. 4, p. 99-106, 2016.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.
- TOMAZELLI, D. *et al.* Análise fitopatogênica de nozes pecan em diferentes situações de colheita. **Revista Técnico-Científica do IF-SC**, Florianópolis, v. 2, n. 2, p. 704-705, 2013.
- 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.
- VAHDATI, K. *et al.* Advances in micropropagation of commercial pecan cultivars. **International Journal of Fruit Science**, Binghamton, v. 20, p. 1-12, 2020.
- VARGAS, C. O. Hidroponia e jardins clonais em viveiros florestais de sementes florestais. *In*: HOPPE, J. M. *et al.* (org.). **Produção de sementes e mudas florestais**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2004. cap. 12, p. 247-271.
- VENDRAME, W.; WETZSTEIN, H. *Carya illinoensis*. *In*: LITZ, R. E. (ed.). **Biotechnology of fruit and nut crops**. Oxfordshire: CABI, 2005. p. 298-304.
- WARREN, C. J. **Evaluation of diferente propagation methods (budding, grafting and cuttings) for pecan**. 2015. Dissertation (Master of Horticulture) - Texas A&M University, College Station, 2015.
- WELLS, L. **Pecan: America's native nut tree**. Alabama: The University of Alabama Press, 2017. 320 p.
- WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de corticeira-do-mato por miniestaquia a partir de propágulos juvenis**. Colombo, PR: EMBRAPA Florestas, 2005. 5 p.

WETZSTEIN, H. Y. *et al.* *Carya illinoensis* (Pecan). In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and Forestry**. Berlin: Springer, 1996. v. 35, p. 50-75.

WILLIAMS, J. M. **The pecan: a history of americas native nut**. Austin: University of Texas, 2013. 192 p.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2013. 279 p.

ZHANG, J. Y. *et al.* Auxin type, auxin concentration, and air and substrate temperature difference play key roles in the rooting of juvenile hardwood pecan cuttings. **HortTechnology**, Alexandria, VA, v. 2, n. 2, p. 209-213, 2015.

ZHENGHAI, M. *et al.* Transcriptomic analysis provides insights into grafting union development in pecan (*Carya illinoensis*). **Genes**, Basel, v. 9, n. 2, [art.] 71, 2018.

ZHUANGZHUANG, L. *et al.* Grafting with different Rootstocks Induced DNA methylation alterations in Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Forests**, Basel, v. 14, n. 4, p. 1-16, 2023.