

**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado em Engenharia Agronómica**

Dissertação

**Estudo da interação entre a resposta ao stress e o  
metabolismo do AIB (ácido indol-3-butírico) no  
enraizamento adventício de noqueira (*Juglans* spp.)**

**Rafaela Novo Santos**

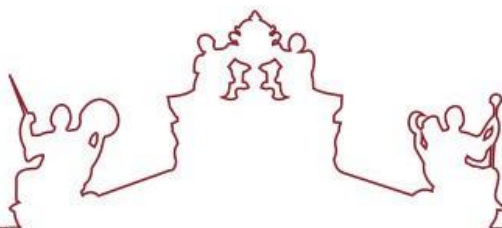
Orientador(es) | Hélia Cardoso

Rita Pires

Évora 2025







---

**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado em Engenharia Agronómica**

Dissertação

**Estudo da interação entre a resposta ao stress e o  
metabolismo do AIB (ácido indol-3-butírico) no  
enraizamento adventício de nogueira (*Juglans* spp.)**

**Rafaela Novo Santos**

Orientador(es) | Hélia Cardoso

Rita Pires

Évora 2025

---

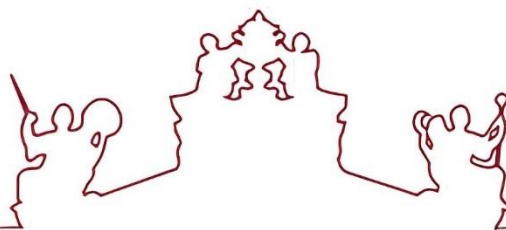
---

---

---

---





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Hélia Cristina Cardoso (Universidade de Évora) (Orientador)  
Maria Doroteia Campos (Universidade de Évora) (Arguente)



*“Consagre ao Senhor, tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos”*

*Provérbios 16:3*

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, dedico este trabalho à Universidade de Évora, por ter sido a instituição que me acolheu desde a licenciatura.

Dedico também a realização deste trabalho aos meus pais e à minha irmã, que através do seu apoio incondicional e do seu esforço, permitiram que eu prosseguisse na minha formação académica, que outrora, teria sido impossível. Agradeço também ao meu namorado, Gil Sousa, pelos bons momentos, apoio e carinho, que me ajudaram a concluir este mestrado.

Agradeço, a todos os professores que me acompanharam, desde a licenciatura até ao mestrado, por me transmitirem os seus conhecimentos, e contribuírem para o meu desenvolvimento pessoal.

Quero agradecer grandemente às minhas orientadoras, Hélia Cardoso e Rita Pires, pela sua dedicação, compreensão, orientação e incentivo, tornando-se, sem dúvida, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Agradeço ainda, aos restantes elementos do Laboratório de Biologia Molecular do Pólo da Mitra, da Universidade de Évora, Catarina Campos e Lénia Rodrigues, que partilhando os seus conhecimentos técnicos e teóricos, permitiram a realização deste trabalho com o maior sucesso.

De igual modo, agradeço à técnica Luísa Fialho do Laboratório de Práticas Histologia e Anatomia Patológica pelo apoio no trabalho de histologia e à Unidade de Microscopia do Instituto Mediterrânico para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento (MED) pelo apoio na aquisição de imagens. Agradeço ainda à empresa Microplant Lda., em particular ao mestre Augusto Viriato, pelo apoio técnico e pela disponibilização de material vegetal para estabelecimento dos ensaios.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os meus colegas e amigos, Valeriya Ustyenko, Rodrigo Eugénio, Mónica Marques e Catarina Estevão, que para além dos contributos fundamentais que forneceram ao meu trabalho, farão parte das minhas memórias, relativas a esta etapa da minha vida.





## **Estudo da interação entre a resposta ao *stress* e o metabolismo do AIB (ácido indol-3-butírico) no enraizamento adventício de nogueira (*Juglans* spp.)**

### **Resumo**

A micropropagação é uma alternativa eficiente à propagação convencional de nogueira-comum (*Juglans regia* L.), permitindo a multiplicação clonal de genótipos selecionados com a vantagem de permitir contornar a recalcitrância ao enraizamento adventício (EA), comportamento observado em diversas cultivares de interesse agronômico. Nesta dissertação foram investigados os mecanismos moleculares associados ao EA em dois genótipos com comportamento contrastante ao EA: ‘Chandler’ (recalcitrante) e o híbrido ‘Paradox’ (de fácil enraizamento). O estudo foi focado nos mecanismos de sinalização associados às espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), neste último focado na caracterização dos genes das Calmodulinas (CaM), genes que codificam proteínas ativadas pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . A análise *in silico* identificou seis genes *CaM* em *J. regia* (*JrCaM*), dos quais *JrCaM1*, *JrCaM2* e *JrCaM4* apresentaram expressão diferencial durante o processo de EA, com um perfil de expressão dependente do genótipo. A quantificação das ROS e a análise da expressão da Catalase (CAT), uma enzima envolvida na homeostase das ROS, revelaram também respostas dependentes do genótipo. Este é o primeiro estudo que descreve a caracterização dos genes *CaM* e revela o envolvimento da CAT na homeostase das ROS durante o EA em *J. regia*, contribuindo para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à eficiência da formação de raízes adventícias.

**Palavras-chave:** Raízes adventícias; micropropagação; auxina; nogueira; recalcitrância

***Exploring the interaction between stress response and IBA (Indole-3-butyric acid) metabolism in adventitious root formation in walnut (*Juglans* spp.)***

**Abstract**

Micropropagation of the common walnut (*Juglans regia* L.) offers an efficient alternative to conventional propagation methods, enabling large-scale multiplication of selected genotypes and overcoming the challenges associated with adventitious root formation (ARF) recalcitrance observed in various genotypes. This dissertation investigated the molecular mechanisms underlying ARF in two genotypes with contrasting rooting behaviors: the cultivar ‘Chandler’ (recalcitrant) and the hybrid ‘Paradox’ (easy-rooting). The study focused on signaling mechanisms involving reactive oxygen species (ROS) and calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ), with particular emphasis on the characterization of Calmodulin (CaM) genes, which encode  $\text{Ca}^{2+}$ -activated proteins. *In silico* analysis allowed the identification of six genes encoding for CaM in the *J. regia* genome, of which *JrCaM1*, *JrCaM2*, and *JrCaM4* showed genotype-dependent differential expression during ARF induction. ROS quantification and expression analysis of the antioxidant enzyme catalase (CAT) also revealed genotype-specific responses. This is the first study to characterize the CaM gene family and analyze CAT expression in *J. regia*, contributing to the understanding of the molecular mechanisms underlying the efficiency of adventitious root formation.

**Keywords:** Adventitious roots; micropropagation; auxin; walnut; recalcitrance

# Índice Geral

Resumo .....	VII
Abstract.....	VIII
Índice de Abreviaturas .....	XI
Índice de Figuras .....	XVI
Índice de Tabelas.....	XIX
1.Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	5
2.1. Caracterização da Nogueira .....	6
2.1.1. Classificação taxonómica de <i>Juglans regia</i> L.....	6
2.1.2. Origem e distribuição do género <i>Juglans</i> .....	9
2.1.3. Caracterização botânica da espécie <i>Juglans regia</i> .....	12
2.1.4. Importância económica do género <i>Juglans</i> .....	15
2.2. Métodos de Propagação da Nogueira.....	18
2.2.1. Propagação seminal .....	18
2.2.2. Propagação vegetativa .....	19
2.3. Sistema Radicular e a Formação de Raízes Adventícias - Enraizamento Adventício (EA)	
26	
2.3.1. Aspetos gerais do enraizamento adventício em condições <i>in vitro</i> .....	26
2.3.2. Fatores que influenciam o enraizamento adventício (EA) em noqueira .....	30
2.4. Mecanismos de Sinalização Envolvidos na Formação de Raízes Adventícias .....	41
2.4.1. Espécies reativas de oxigénio (ROS) envolvidas na sinalização imediata a condições	
de stress .....	45
2.4.2. Ião cálcio (Ca <sup>2+</sup> ) – mensageiro secundário na resposta ao stress.....	47
2.5. Reguladores de Crescimento – O Papel das Auxinas na Indução do Enraizamento	
Adventício (EA).....	50
2.5.1. Ácido indol-3-butírico e ácido indol-3-acético .....	50
2.5.2. Metabolismo e transporte do ácido indol-3-acético .....	53
3. Materiais e Métodos .....	58
3.1. Obtenção do Material Vegetal para Estabelecimento dos Ensaios de Enraizamento –	
Multiplicação Vegetativa por Cultura de Microestacas.....	59
3.2. Estabelecimento dos Ensaios de Enraizamento e Recolha de Material Vegetal .....	61

3.2.1. Avaliação dos mecanismos moleculares e bioquímicos .....	62
3.2.2. Caracterização histomorfológica do processo de enraizamento adventício (EA) .....	62
3.3. Envolvimento das Calmodulinas no Enraizamento Adventício (EA) .....	63
3.3.1. Identificação e caracterização dos genes das calmodulinas em <i>Juglans regia</i> .....	63
3.3.2. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA) .....	65
3.3.3. Estudo da expressão dos genes <i>JrCaM</i> por RT-qPCR ( <i>Reverse Transcription</i> <i>quantitative PCR</i> ) .....	67
3.4. Envolvimento do <i>Stress</i> Oxidativo no Enraizamento Adventício (EA) .....	71
3.4.1. Determinação dos níveis de peróxido de hidrogénio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) durante a indução do enraizamento adventício (EA) .....	71
3.4.2. Estudo da expressão da enzima catalase (CAT) na indução do enraizamento adventício (EA) .....	72
3.5. Análise das Alterações Histo-morfológicas Associadas à Formação de Raízes Adventícias .....	77
3.5.1. Preparação das amostras para análise histológica .....	77
3.6. Análise Estatística .....	81
4. Resultados e Discussão .....	83
4.1. Identificação dos Genes das Calmodulinas em <i>Juglans regia</i> e Caracterização das Proteínas Codificadas .....	84
4.2. Classificação e Análise da Estrutura dos Genes <i>JrCaM</i> .....	92
4.3. Análise da Expressão dos Genes <i>JrCaM</i> na Formação de Raízes Adventícias .....	98
4.3.1. Determinação da concentração e análise da integridade e pureza das amostras de RNA total .....	98
4.3.2. Análise da expressão dos genes <i>JrCaM</i> .....	104
4.4. Envolvimento do <i>Stress</i> Oxidativo no Enraizamento Adventício (EA) .....	111
4.4.1. Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogénio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	111
4.4.2. Expressão da enzima CAT por <i>Western blot</i> .....	115
4.5 – Alterações Histológicas Associadas ao Processo de Enraizamento Adventício (EA) .....	120
5. Conclusão e Perspetivas Futuras .....	124
6. Referências Bibliográficas .....	129
7. Apêndices .....	170

## Índice de Abreviaturas

%M – Percentagem de Metioninas

°C – Graus Celsius

µm – Micrómetro

µM – Micromolar

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – Oxigénio Singleto

2,4-D – 2,4-diclorofenoxiacético

aa – Aminoácidos

ABA – Ácido Abscísico

ABC – *MULTIDRUG RESISTANCE/ GLYCOPROTEIN (PGP)*

ACX – *Alquil-CoA oxidase*

AFA – Ácido Fenilacético

AIA – Ácido indol-3-acético

AIA-aa – Ácido indol-3-acético Conjugado com Aminoácidos

AIB – Ácido indol-3-butírico

AJ – Ácido Jasmónico

ANA – Ácido 1-Naftaleno Acético

AOX – *Alternative Oxidase*

APG – *Angiosperm Phylogeny Group*

APS – *Ammonium Persulfate*

APX – Ascorbato Peroxidase

ASA1 – *WEAK ETHYLENE-INSENSITIVE2/ANTHRA NILATO SINTASE alfa1*

ASB1 – *ANTHRANILATO SINTASE beta1*

AtCaM – Calmodulinas de *Arabidopsis thaliana*

AtCBK3 – Proteína Quinase de *Arabidopsis thaliana*

ATG – Codão de Iniciação

AtPP7 – Proteína Fosfatase de Ligação a Calmodulinas em *Arabidopsis thaliana*

AUX1 – *AUXIN RESISTANT1*

BAP – 6-Benzilaminopurina

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

C – Córtex  
 CA– Califórnia  
 Ca<sup>2+</sup>– Ião Cálcio  
 CaM– Calmodulina  
 CaMs– Calmodulinas  
 CAT – Catalase  
 CBL– Calceurina-B-Like  
 Cc – Câmbio Cortical.  
 CdCaM– Calmodulina de *Castanea dentata* L.  
 cDNA – DNA complementar  
 CDPKs/CPKs– Proteínas Quinases Dependentes de Ca<sup>2+</sup>  
 CDS– *CoDing Sequences*  
 CE– Comissão Europeia  
 Ch – Chandler  
 CHAPS – 3-((3-*cholamidopropyl*) *dimethylammonio*)-1-*propanesulfonate*  
 cito– Citoplasma  
 clo– Cloroplasto  
 cm – Centímetros  
 CMLs– Calmodulinas-Like  
 Cq– Ciclos de Quantificação  
 Cro – Cromossoma  
 cv. – Cultivar  
 cvs. – Cultivares  
 d– Dia  
 DAO – *DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION*  
 DKW – Meio de Driver e Kuniyuki Walnut  
 DKW-C – Meio de Driver e Kuniyuki Walnut modificado por McGranahan  
 DTT– *Dithiothreitol*  
 E– Eficiência da Reação  
 EA– Enraizamento Adventício  
 ECH2– *enoyl-COA hydratase2*  
 EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
 End – Endoderme  
 Ep – Epiderme

EPM– Erro Padrão da Média  
 EUA – Estados Unidos da América  
 extr– Extracelular  
 Fe – Ferro  
 FeEDDHA– Ferro Etilenodiamina-N,N'-bis(2-hidroxifenilacético)  
 FeEDTA– Quelato de ferro com EDTA  
 Fm – Feloderme  
 Fw– *Forward*  
 g – Força gravitacional (9,8 m/s<sup>2</sup>)  
 g<sup>-1</sup>.fw – Grama por Peso Fresco  
 g.L<sup>-1</sup> – Gramas por Litro  
 GH3– *GRETCHEN HAGEN 3*  
 GPP– Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral  
 GPX – Glutathione Peroxidase  
 GSDS– *Gene Structure Display Server*  
 h– Hora  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogénio  
 IAMT1– *IAA carboxyl methyltransferase 1*  
 IAR3– *IAA alanine hydrolase*  
 IBR1– *dehydrogenase/reductase indole-3-butyric acid response 1*  
 IBR10– *enoyl coA hydratase*  
 IBR3– *acyl-coA dehydrogenase/oxidase-like*  
 ID – Código Identificativo da Sequência  
 ILL2- IAA – *amino acid hydrolase*  
 INC– *International Nut and Dried Fruit Council*  
 INE– Instituto Nacional de Estatística  
 iTOL – *Interactive Tree Of Life*  
 JrB-Actin – *Juglans regia*  $\beta$ -Actin  
 JrCaM– Calmodulinas de *Juglans regia* L.  
 JrEF1-alfa – *Juglans regia* *Enlogation factor1*- alfa  
 JrH2B – *Juglans regia* *Histone 2B*  
 JrPoliUBI – *Juglans regia* *Polyubiquitin*  
 JrSDIR1 – *E3 ubiquitin-protein ligase SDIR1*  
 JrUBI-E2– *Juglans regia* *Ubiquitin-conjugating enzyme E2*



K– Potássio  
 Kb – Kilobases  
 kDa– quiloDalton  
 LAX3 – *LIKE AUXIN RESISTANT3*  
 M– Nível de Estabilidade  
 m/v– Massa por Volume  
 MA – Milhões de Anos  
 MdCaM– Calmodulina de *Malus domestica* L.  
 mDKW – Meio de Driver e Kuniyuki Walnut modificado  
 min – Minuto  
 mito– Mitocôndria  
 mM – Micromol  
 mm – Milímetros  
 Mn– Manganês  
 MS – Meio de Murashige e Skoog  
 N– Nitrogénio  
 NCBI – *National Center of Biotechnology Information*  
 ng/μL – Nanogramas por Microlitro  
 nm– Nanómetros  
 nM– nanoMolar  
 N°– Número  
 nucl– Núcleo  
 O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Radical Superóxido  
 OH<sup>•</sup> – Radical Hidroxilo  
 ON – Óxido Nítrico  
 ORF– *Open Reading Frame*  
 Pe – Periciclo  
 P– Fósforo  
 PALOPs – Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa  
 pb: Pares de Bases  
 PDVF – *Polyvinylidene Difluoride*  
 PED1– *3-ketoacyl COA thiolase*  
 PGP– *MULTIDRUG RESISTANCE/ GLYCOPROTEIN*  
 pI – Peso Isoelétrico

PIN– *PIN FORMED*

plas– Membrana Plasmática

ppm – Parte por Milhão

PPO – *Polyphenol Oxidase*

Pv – Parênquima vVascular

Px – Paradox

QR– Quantidades Relativas

R<sup>2</sup>– Coeficiente de Determinação

Rev– *Reverse*

ROS– *Reactive Oxygen Species*

RT– Reação de Transcrição Reversa

Sb – Súber

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

seg – Segundos

SOD – Superóxido Dismutase

SpCaM– Calmodulinas de *Solanum pennellii* L.

SPSS– *Statistical Package for the Social Sciences*

TA– Tamanho do Fragmento Amplificado

Ta– Temperatura de *annealing*

TAIR – *The Arabidopsis Information Resource*

TCA – Ácido Tricloroacético

TFP– Trifluoperazina

Tg – Tricomas Glandulares

TIR1/AFB-Aux/IAA – *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING*

*F-BOX PROTEIN-Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID*

UDP-GT – *uridine diphosphate glucosyl transferase*

UV– UltraVioleta

V– Variação Pareada

Xil – Xilema

Zn– Zinco

µL– Microlitro

## Índice de Figuras

Figura 1 - Classificação taxonómica de diferentes espécies produtoras de frutos secos pertencentes à divisão <i>Magnoliophyta</i> , segundo a classificação de Grupo Filogénico de Angiospérmicas.....	6
Figura 2 - Distribuição geográfica no Velho e Novo Mundo de espécies fósseis e modernas da família <i>Juglandaceae</i> . .....	10
Figura 3 - Evolução do grupo que integra espécies do género <i>Juglans</i> ( <i>J. regia</i> , <i>J. sigillata</i> , <i>J. cathayensis</i> , <i>J. hindsii</i> , <i>J. microcarpa</i> e <i>J. nigra</i> ) e do grupo englobando apenas a espécie <i>Pterocarya stenoptera</i> .....	12
Figura 4 - Caracterização botânica da espécie <i>J. regia</i> . ....	14
Figura 5 - Evolução da área de pomares de nogueira (ha) em Portugal nos anos de 2012 a 2021. .....	17
Figura 6 - Nogueiras da cv. ‘Chandler’ ( <i>Juglans regia</i> ) enxertada sob porta-enxerto de origem seminal com um ano, segundo a técnica de borbulhia .....20	20
Figura 7 - Exemplo da cultivar ‘Chandler’ ( <i>Juglans regia</i> ) microenxertada no porta-enxerto híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’.....21	21
Figura 8 - Representação das fases de estabelecimento, micropropagação, enraizamento (indução e expressão) e aclimação. ....25	25
Figura 9 - Esquema representativo dos eventos que marcam o processo de formação de raízes adventícias durante as três fases – indução, iniciação e expressão. ....28	28
Figura 10 - Alterações na morfologia das raízes em clones do híbrido de nogueira <i>Juglans major</i> (Torrey) Heller var. 209 × <i>Juglans regia</i> L. cv. RA inoculados em meio de cultura com diferentes fontes de ferro. .....	39
Figura 11 - Diferenças morfológicas observadas no sistema radicular de clones do híbrido <i>Juglans major</i> (Torrey) Heller cv. 209 × <i>Juglans regia</i> L. cv. RA, quando inoculados em meio de cultura suplementado com diferentes fontes de carbono. .....	40
Figura 12 - Esquema representativo do processo de sinalização envolvido no enraizamento adventício (EA). .....	41
Figura 13 - Modelo representativo da possível via de sinalização das espécies reativas de oxigénio (ROS) durante a indução do processo de formação de raízes adventícias associado ao stress provocado pelo corte. ....46	46
Figura 14 - Representação esquemática da ligação do ião cálcio (Ca <sup>2+</sup> ) às calmodulinas (CaM) através dos quatro <i>EF-Hand Motifs</i> . ....49	49
Figura 15 - Modelo representativo da atuação de ácido indol-3-butírico (AIB) exógeno na formação de raízes adventícias em <i>Arabidopsis</i> . ....51	51
Figura 16 - Representação das diferenças estruturais nas cadeias laterais em ácido indol-3-acético (AIA) e ácido indol-3-butírico (AIB). .....	53

Figura 17 - Modelo representativo do metabolismo e transporte de ácido indol-3-butírico (AIB) e ácido indol-3-acético (AIA) em <i>Eucalyptus nitens</i> durante a fase de indução da formação de raízes adventícias.	55
Figura 18 - Representação das diferentes etapas que caracterizaram o estabelecimento dos ensaios de enraizamento e recolha de material vegetal.	60
Figura 19 - Esquema representativo do procedimento experimental incluindo uma primeira fase de multiplicação do material vegetal para obtenção de plântulas suficientes para o estabelecimento dos ensaios de enraizamento, o estabelecimento dos ensaios de enraizamento para recolha de material utilizado nas diferentes análises (moleculares, bioquímicas e histológicas).	61
Figura 20 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado para análise da expressão dos genes das Calmodulinas ( <i>JrCaM</i> ) associado ao processo de formação de raízes adventícias em <i>Juglans regia</i> .	66
Figura 21 - Esquema demonstrativo da análise realizada durante o desenho dos <i>primers</i> específicos para os genes <i>JrCaM</i> .	68
Figura 22 - Representação das duas primeiras etapas da técnica de <i>Western blot</i> - separação de proteínas segundo o seu peso molecular, pelo método SDS-PAGE e Transferência em sistema de banho refrigerado.	75
Figura 23 - Representação da última etapa da técnica de <i>Western blot</i> : Imunodeteção e deteção das bandas correspondentes à enzima.	76
Figura 24 - Imagens representativas do procedimento realizado para o estudo histológico.	79
Figura 25 - Alinhamento das sequências de <i>AtCaMs</i> e <i>JrCaMs</i> e identificação dos quatro <i>EF-Hand Motifs</i> .	84
Figura 26 - Estrutura tridimensional representativa da proteína <i>CaM Jr04_06300</i> .	86
Figura 27 - Esquema representativo das interações identificadas entre as <i>JrCaM</i> .	91
Figura 28 - Dendrograma onde é mostrada a relação filogenética entre 40 sequências peptídicas de <i>CaM</i> de seis espécies da classe Magnoliopsida, incluindo <i>Juglans regia</i> L.	94
Figura 29 - Relação filogenética e estrutura de genes de <i>JrCaMs</i> e <i>AtCaMs</i> .	96
Figura 30 - Imagem representativa dos géis de agarose obtidos após eletroforese do RNA total.	99
Figura 31 - Curvas de dissociação e curvas de calibração obtidas por análise RT-qPCR dos genes candidatos a genes de referência – <i>JrB-Actin</i> , <i>JrH2B</i> , <i>JrPoliUBI</i> , <i>JrUBI-E2</i> , <i>JrEF1-alfa</i> e <i>JrSDIR1</i> .	101
Figura 32 - Diagramas de bigodes apresentando a distribuição dos valores de Cq (ciclo de quantificação) dos diferentes genes candidatos a genes de referência nos dois genótipos em estudo.	102
Figura 33 - Representação dos resultados obtidos da análise GeNorm dos genes selecionados como candidatos a genes de referência.	103
Figura 34 - Curvas de dissociação e curvas de calibração obtidas por análise RT-qPCR dos genes <i>JrCaMs</i> - <i>JrCaM1</i> , <i>JrCaM2</i> e <i>JrCaM4</i> .	105
Figura 35 - Expressão relativa dos genes <i>JrCaMs</i> – <i>JrCaM1</i> , <i>JrCaM2</i> e <i>JrCaM4</i> no híbrido 'Paradox' e na cv. 'Chandler', em plântulas tratadas com AIB e sem tratamento (controlo).	108
Figura 36 - Representação espaciotemporal da expressão dos genes <i>JrCaMs</i> , resultante da análise de RT-qPCR exibindo os padrões de expressão ao longo do tempo para as amostras	

(região basal da plântula) tratadas com AIB e amostras controlo, no híbrido 'Paradox' e na cv. 'Chandler' .....	109
Figura 37 - Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogénio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), na região basal, de plântulas da cv. 'Chandler' e do híbrido 'Paradox', tratadas com AIB e sem tratamento (controlo) em diferentes tempos de recolha durante o ensaio (0h, 6h, 24h, 3d, 5d, 7d).....	113
Figura 38 - Imagem representativa da membrana <i>Western blot</i> para a proteína Catalase (CAT) em amostras da região basal do híbrido 'Paradox' e da cv.'Chandler'.	
.....	116
Figura 39 - Expressão da proteína Catalase (CAT) em amostras provenientes da região basal do híbrido 'Paradox' e da cv.'Chandler' ao longo dos diferentes tempos de recolha após a inoculação em meio de enraizamento com AIB (0h, 3d, 5d e 7d). ....	117
Figura 40 - Cortes histológicos realizados no híbrido 'Paradox' cl. 'Vlach' na base da plântula recolhida em diferentes tempos (0h, 3d, 5d e 7d de tratamento com AIB). ....	122

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Ramificação do género *Juglans* nos quatro grupos e apresentação das espécies que integram cada grupo.

.....	8
Tabela 2- Informação relativa aos genes selecionados como candidatos a genes de referência para a normalização dos resultados de expressão dos genes <i>JrCaM</i> durante o processo de formação de raízes adventícias em <i>Juglans regia</i> . ....	67
Tabela 3- Informação relativa aos <i>primers</i> selecionados como candidatos a genes de referência e genes de interesse (Calmodulinas - <i>JrCaM</i> ) e alguns parâmetros relativos à análise RT-qPCR. ....	69
Tabela 4- Rácio de etanol e butanol considerado nas diferentes soluções para desidratação das amostras e respetivos tempos de imersão. ....	78
Tabela 5- Protocolo para coloração de amostras utilizando os corantes Safranina O e Fast Green. ....	80
Tabela 6- Sequências de CaMs de <i>Juglans regia</i> identificadas de acordo com os critérios de McCormack et al. (2005) e Shi & Du (2020) e apresentação de algumas das suas propriedades bioquímicas e localização subcelular. ....	88
Tabela 7- Matriz de Identidade ( <i>Sequence Identity Matrix</i> ) obtida pelo <i>software</i> BioEdit mostrando o nível de semelhança entre as seis sequências codificantes (CDS) de <i>Juglans regia</i> identificadas como pertencentes à família das CaMs. ....	95
Tabela 8- Informações relativas aos diferentes membros CaM de <i>Juglans regia</i> L., onde se encontra proposta a nomenclatura para os membros da família <i>CaM</i> em <i>Juglans regia</i> . ....	95
Tabela 9 - Informação sobre tamanho dos exões e intrões nos diferentes membros <i>CaM</i> de <i>Juglans regia</i> L. ....	98



## 1. Introdução

A noqueira-comum (*Juglans regia* L.), também denominada de noqueira inglesa ou persa, é a espécie de noqueira mais disseminada a nível mundial, apresentando grande relevância económica, estando presente desde as suas áreas de exploração tradicionais como a América do Norte, Europa e Ásia, dissipando-se até ao hemisfério sul (Dandekar et al., 2005; Zhang et al., 2020). Em Portugal, as nozes são de entre os frutos secos os mais consumidos, motivo pelo qual a instalação de novos pomares de noqueiras tem vindo a aumentar por todo o país, com especial destaque na região do Alentejo devido aos novos perímetros de rega associados à Barragem de Alqueva (Marketing Agrícola, 2017; Farinha et al., 2023).

No entanto, a disponibilidade de material vegetal para estabelecimento de novos pomares é limitada e na sua grande maioria associada a uma grande heterogeneidade. Devido às baixas taxas de enraizamento que caracterizam os genótipos do género *Juglans* spp., os métodos de propagação vegetativa como a estacaria lenhosa e semi-lenhosa não têm sido eficientes para a sua produção a nível comercial (Pei & Gu, 2002; Vahdati et al., 2022). Desta forma, a maioria das noqueiras comercializadas são propagadas pela enxertia de cultivares de interesse agronómico sob porta-enxertos de origem seminal, estes associados a uma grande variabilidade genética (Ribeiro et al., 2022) resultando em pomares constituídos por plantas não uniformes (Liu et al., 2024).

Por esse motivo, o interesse por porta-enxertos clonais obtidos por cultura *in vitro* tem vindo a aumentar (Peixe et al., 2015; Ribeiro et al., 2022), permitindo a disponibilização de plantas com características vantajosas, como é o caso do híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’ (*J. hindsii* × *J. regia*) que se destaca pelo seu vigor, tolerância à seca e resistência a agentes patogénicos do solo (Vahdati et al., 2021). Apesar da disponibilidade de porta-enxertos clonais obtidos por cultura *in vitro*, a enxertia de variedades de interesse agronómico nestes porta-enxertos apresenta, frequentemente, uma taxa de sucesso reduzida devido à complexidade do processo. A enxertia é uma tarefa exigente que requer mão-de-obra especializada, resultando numa produção de plantas com custos elevados (Ribeiro et al., 2022; Vahdati et al., 2022).

A micropropagação *in vitro* surge, assim, como uma alternativa promissora aos métodos clássicos de propagação, permitindo a produção em massa de plantas clonais auto-enraizadas, num curto espaço de tempo (Vahdati et al., 2004). A micropropagação *in vitro* de plantas de *Juglans* spp. consiste na excisão asséptica de secções de entre-nós do caule compostas por um gomo axilar (microestacas) que são seguidamente inoculados



em meio de cultura (Kaur et al., 2006; Kepenek & Kolağasi, 2016). Após um período sob condições controladas de fotoperíodo e temperatura, as novas plantas, resultantes do abrolhamento do gomo axilar e subsequente alongamento do rebento, serão encaminhadas para a fase de enraizamento. Nesta fase, as plantas são inoculadas em meio de cultura suplementado com uma auxina que induzirá a formação das raízes adventícias na base do caule (Ríos Leal et al., 2007). No entanto, a reduzida capacidade de resposta ao estímulo da rizogénese continua a ser o grande obstáculo na propagação vegetativa de um elevado número de cultivares de *J. regia*, sendo por isso considerados genótipos recalcitrantes (Yegizbayeva et al., 2021), sendo exemplo a cv. ‘Chandler’ (Vahdati et al., 2004). Contrariamente, algumas espécies dentro do género *Juglans* spp., como o híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’ apresentam particular destaque neste tema por possuírem um comportamento fácil ao enraizamento (Peixe et al., 2015).

A resposta ao estímulo da rizogénese, que se entende ser uma associação de *stresses* abióticos (ferimento resultante da preparação da plântula e o contacto com uma auxina), é controlada por fatores de natureza exógena, como a concentração e o tipo de auxina, a luz, a temperatura, o meio de cultura, e também de natureza endógena, como o genótipo, a idade e o estado fisiológico do material vegetal (Leslie et al., 2006; Vahdati et al., 2022). De forma a ultrapassar o problema da recalcitrância foram desenvolvidos vários estudos de forma a identificar os fatores endógenos e exógenos que influenciam o sucesso da rizogénese adventícia em noqueira, envolvendo estudos a nível moleculares e bioquímico (Alexieva et al., 2001; De Klerk, 2002; Luna et al., 2005; Li et al., 2009a; Liao et al., 2012; Gonin et al., 2019; Dubrovina et al., 2019).

O processo de formação de raízes adventícias é regulado por mecanismos moleculares complexos que envolvem numa primeira fase a perceção do sinal de indução, usualmente o corte associado à aplicação da auxina ácido indol-3-butírico (AIB) (Liao et al., 2012), e subsequentemente propagação desse sinal através de moléculas sinalizadoras típicas de diferentes vias de sinalização, cujo papel será a ativação de genes envolvidos na resposta ao estímulo da indução. Das moléculas sinalizadoras destacam-se as espécies reativas de oxigénio (ROS), por estarem associadas à resposta imediata e assegurar a comunicação intercelular a longa distância. Destas destaca-se o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) cujos níveis tendem a aumentar após a aplicação da auxina para retomar os seus níveis basais através dos mecanismos de restabelecimento da homeostase das ROS (Li et al., 2009a), e o ião cálcio ( $Ca^{2+}$ ), conhecido como mensageiro intracelular secundário responsável por transmitir sinais dentro da célula para ativar diferentes respostas

fisiológicas (Lanteri et al., 2006; Besson-Bard et al., 2008; Dodd et al., 2010). O  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se a proteínas específicas, como as calmodulinas (CaM), as quais estão associadas à ativação da enzima catalase (CAT) (Yang & Poovaiah, 2002), uma das principais enzimas antioxidantes responsável pela homeostase dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido no decorrer de uma condição de *stress*. A ativação da CAT garante assim o restabelecimento dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  antes que os mesmos se tornem prejudiciais (Virdi et al., 2015). Tendo em conta o conhecimento relativo ao envolvimento destas duas vias de sinalização no EA de diferentes espécies colocou-se a hipótese que serviu de base para o desenvolvimento da presente dissertação e que é apresentada abaixo.

**Hipótese:** As diferenças ao nível da eficiência do EA em nogueira estão associadas a diferenças ao nível da via de sinalização que envolve as espécies reativas de oxigénio, em particular o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e que envolve o ião  $\text{Ca}^{2+}$ .

De forma a tentar responder à hipótese inicial colocada, foram traçados dois objetivos principais, onde o primeiro, produzindo uma resposta mais direta à hipótese, consistiu na avaliação dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos durante o processo de EA, dividindo-se este em três subpontos: i) a análise da expressão de genes que codificam as proteínas JrCaM durante o EA em *Juglans* spp., ii) a quantificação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante o EA em *Juglans* spp., iii) a análise de expressão e determinação da atividade da enzima CAT durante o EA em *Juglans* spp.. O segundo objetivo principal consistiu na caracterização histo-morfológica do processo de EA, permitindo a visualização spatiotemporal das alterações morfológicas, a nível celular, desencadeadas pelas vias de sinalização acima referidas.

No Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal da Universidade de Évora foram estabelecidos *in vitro* diferentes genótipos de nogueira com comportamentos distintos ao nível da formação de raízes adventícias, a cv. ‘Chandler’ (*J. regia*), conhecida pelo seu comportamento recalcitrante ao enraizamento, e o híbrido ‘Paradox’ (*J. regia* × *J. hindsii*) cl. ‘Vlach’ conhecido como de fácil enraizamento, possibilitando assim o estabelecimento de ensaios de modo a desenvolver a investigação focada na hipótese apresentada.

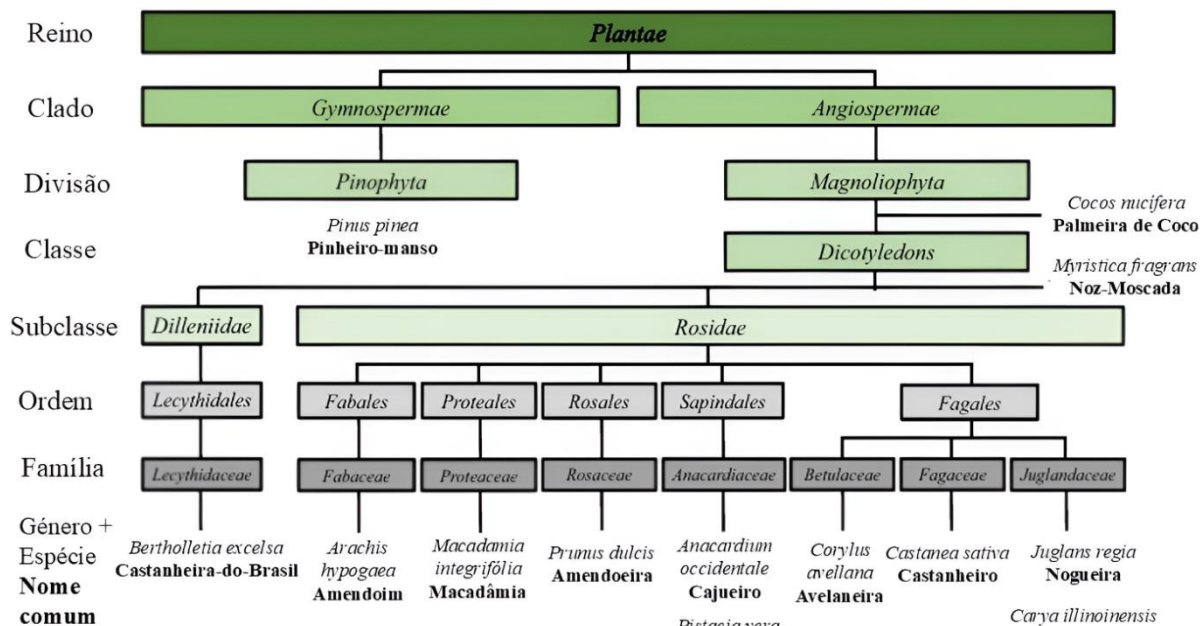


## 2. Revisão Bibliográfica

## 2.1. Caracterização da Nogueira

### 2.1.1. Classificação taxonómica de *Juglans regia* L.

A noqueira é uma planta Angiospérmica pertencente à divisão *Magnoliophyta*, classe *Dicotyledons* (*Magnoliophyta*) (Jacquenet & Moneret-Vautrin, 2007), subclasse *Rosidae* (Germain et al., 1999), ordem *Fagales* e família *Juglandaceae* (Bernard et al., 2018). Mais recentemente, através de análises filogenéticas, vários autores propuseram outra organização com a criação da subfamília *Juglandoideae* (Manos et al., 2007; Mu et al., 2020; Zhang et al., 2021; Zhou et al., 2021) e género *Juglans* spp. (Germain et al., 1999). A Figura 1 ilustra a classificação taxonómica de *J. regia*.



**Figura 1** – Classificação taxonómica de diferentes espécies produtoras de frutos secos pertencentes à divisão *Magnoliophyta*, segundo a classificação de Grupo Filogénico de Angiospérmicas (do inglês - *Angiosperm Phylogeny Group* (APG)) (APG III, 2009). Adaptado de Jacquenet & Moneret-Vautrin (2007).

No início do século XX, Dode (1906, 1909a, b) dividiu o género *Juglans* em quatro grupos tendo em conta parâmetros associados à morfologia das folhas e das flores: o grupo *Dioscaryon* Dode (tradicionalmente *Juglans*), o *Rhysocaryon* Dode (*Black walnuts*), o *Cardiocaryon* Dode (*Asian butternuts*) e o *Trachycaryon* Dode (*American*

*butternuts*). Esta divisão foi mais tarde suportada pelo trabalho de Manning (1978), baseada na morfologia do fruto. Atualmente são considerados os quatro grupos pertencentes ao género *Juglans* sendo a nomenclatura utilizada de *Dioscaryon/Juglans*, *Rhysocaryon*, *Cardiocaryon* e *Trachycaryon*.

Segundo McGranahan & Leslie (2009), a ramificação de cada um dos grupos é distinta, sendo que os grupos *Juglans/Dioscaryon* e *Trachycaryon* apresentavam inicialmente apenas uma espécie, o grupo *Cardiocaryon* três espécies e o grupo *Rhysocaryon* 16 espécies. Recentemente, a composição do grupo *Juglans/Dioscaryon* foi alterada, passando a integrar duas espécies (*J. regia* e *J. sigillata*), estando a espécie *J. hopeiensis* também proposta para integrar o mesmo grupo por se tratar de um híbrido entre *J. regia* x *J. mandshurica* (Mu et al., 2017). Desta forma, a organização mais atual dos grupos que dividem o género *Juglans/Dioscaryon* será, o grupo *Juglans* com duas espécies, *Trachycaryon* com apenas uma espécie, *Cardiocaryon* com três espécies e *Rhysocaryon* com 16 espécies (ver tabela 1).

Tabela 1 – Ramificação do género *Juglans* nos quatro grupos e apresentação das espécies que integram cada grupo. Adaptado de McGranahan & Leslie (2009) e Mu et al. (2017).

Grupos	Espécies
<i>Juglans/ Dioscaryon</i>	<i>J. regia</i> L. <i>J. sigillata</i> <i>J. hopeiensis</i>
<i>Trachycaryon</i>	<i>J. cinerea</i> L.
<i>Cardiocaryon</i>	<i>J. mandshurica</i> Maxim <i>J. ailantifolia</i> Carr ( <i>J. sieboldiana</i> ) var. <i>cordiformis</i> <i>J. cathayensis</i> Dode
<i>Rhysocaryon</i>	<i>J. australis</i> Griseb <i>J. boliviana</i> (C. DC) Dode <i>J. californica</i> S. Wats <i>J. hindsii</i> (Jeps.) Rehder <i>J. hirsuta</i> Mann <i>J. jamaicensis</i> C. DC <i>J. major</i> (Torr. Ex Sitsgr.) Heller var. <i>glabrata</i> Mann. <i>J. microcarpa</i> Berl. ( <i>J. rupestris</i> ) var. <i>stewartii</i> (Johnston) Mann. <i>J. mollis</i> Englem. Ex Hemsl <i>J. neotropica</i> Diels <i>J. nigra</i> L. <i>J. olanchana</i> Standl. e L.O. Williams var. <i>standleyi</i> Mann. <i>J. pyriformis</i> Liebm. <i>J. soratensis</i> Mann. <i>J. steyermarkii</i> Mann. <i>J. venezuelensis</i> Mann.

Apesar da divisão em quatro grupos distintos, espécies pertencentes a diferentes grupos podem hibridar entre si. As espécies pertencentes ao género *Juglans* são diploides, com  $2n = 2x = 32$  cromossomas (Woodworth, 1930). Em geral, espécies do grupo *Rhysocaryon* não hibridam com espécies dos grupos *Trachycaryon* e *Cardiocaryon*, mas a espécie *J. regia* do grupo *Dioscaryon/Juglans* pode hibridar com as espécies dos outros três grupos. Em termos comerciais, um dos híbridos comercialmente mais importante é o híbrido ‘Paradox’, resultante do cruzamento entre *J. regia* x *J. hindsii*. Este híbrido

interespecífico propaga-se naturalmente por via seminal (McGranahan & Leslie, 2009) e por se apresentar mais vigoroso comparativamente a genótipos obtidos por cruzamento intraespecíficos, tem tido grande aplicação na propagação vegetativa de diversas cultivares de *J. regia* funcionando como porta-enxerto (McGranahan & Catlin, 1987). O fenótipo de maior vigor é conhecido no contexto do melhoramento de plantas como “vigor híbrido” e está associado à supressão/complementação de alelos recessivos de um dos progenitores por alelos dominantes do outro progenitor, surgindo assim características agronômicas de interesse (Crow, 1998; Miyaji & Fujimoto, 2018).

### 2.1.2. Origem e distribuição do género *Juglans*

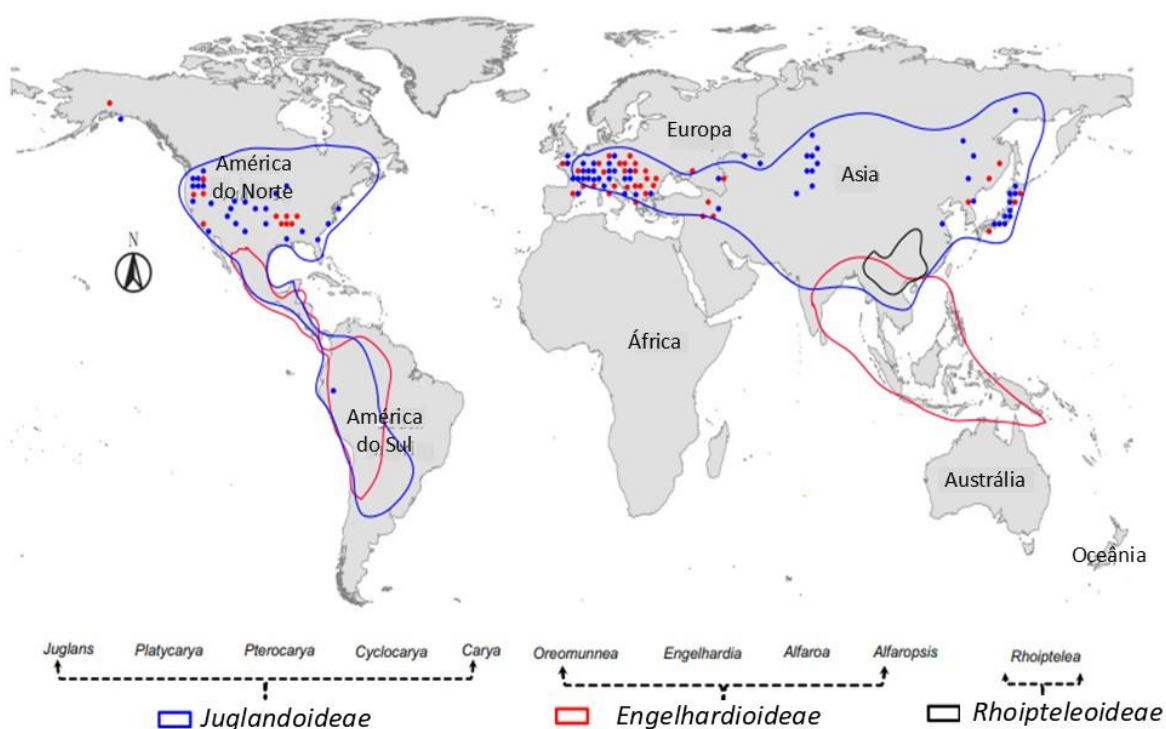
Apesar da referência à existência do género *Juglans* surgir apenas associada a exemplos da literatura antiga, como a Bíblia em Génesis (43:11) e Cântico dos Cânticos (6:11), revelando que plantas de noqueira pertencentes à espécie *J. regia* L. estariam plantadas no jardim do Rei Salomão (Moldenke & Moldenke, 1952; Bernard et al., 2018), pensa-se que a origem deste género *Juglans* terá sido anterior à origem da espécie humana (Jaynes, 1969).

Apesar da noqueira ter sido introduzida tanto na Europa quanto nos Balcãs antes do último período glacial, há cerca de 50.000 anos (Carrion & Sanchez-Gomez, 1992), ainda permanece uma incógnita de como as árvores chegaram à Europa (Bernard et al., 2018). Acredita-se que a sua domesticação tenha tido lugar na Ásia Central, mais particularmente nos Himalaias Ocidentais, desde Caxmira até ao Quirguistão (Zeven & Zhukovsky, 1975; Bernard, 2018). No século XVI, durante a conquista do Novo Mundo, a noqueira terá sido disseminada pela América do Sul, principalmente no Chile, antes de ser introduzida na Califórnia durante o século XIX (Germain et al., 1999).

A família *Juglandaceae*, que integra todas as espécies de noqueira, encontra-se atualmente distribuída tanto no Velho como no Novo Mundo (Guo et al., 2020; Zhang et al., 2021). O género *Juglans* encontra-se atualmente disperso pela América do Norte e do Sul, Índias Ocidentais, Sudeste da Europa até ao leste da Ásia e Japão (Manning, 1978).

Na figura 2 está ilustrada a história evolutiva de três das subfamílias que compõem a família *Juglandaceae* (*Engelhardioideae*, *Juglandoideae* e *Rhoipteleoideae*), resultante de um estudo filogenético com base em marcadores moleculares aplicados a material vegetal atual e fóssil. Esse estudo permitiu mapear áreas geográficas no Velho e no Novo Mundo (Zhou et al., 2021), confirmando resultados prévios descritos por outros autores

(Xiang et al. 2014; Larson-Johnson 2016; Zhang et al. 2021), os quais reportam um tempo de divergência entre gêneros que integram as três subfamílias de 50,9 a 62,0 milhões de anos. No entanto, algumas espécies dentro do gênero *Juglans*, de entre as quais se destaca a espécie *J. regia*, terão divergido mais recentemente sob influência das alterações climáticas durante o período glacial quaternário (Bai et al., 2017; Zhou et al., 2021). A espécie *J. regia* encontra-se bastante cultivada em várias regiões de clima temperado da Europa, América do Norte e do Sul, África do Sul, Ásia, Austrália e Nova Zelândia (Aradhya et al., 2006).



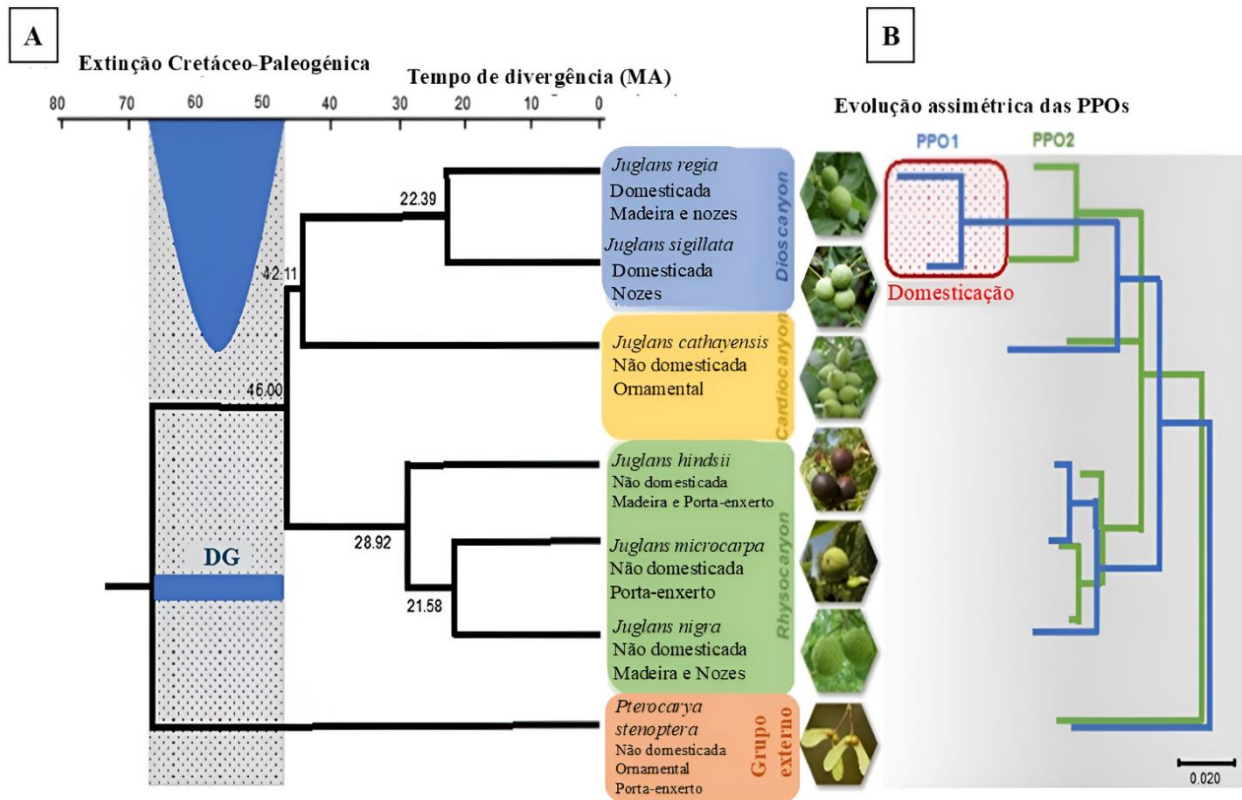
**Figura 2** – Distribuição geográfica no Velho e Novo Mundo de espécies fósseis e modernas da família *Juglandaceae*. Regiões agrupadas com uma linha da mesma cor indicam a atual dispersão dos 10 gêneros. Linha Azul: Subfamília *Juglandoideae*; Linha Vermelha: Subfamília *Engelhardioideae*; Linha Preta: Subfamília *Rhoipteleoideae*. Pontos coloridos indicam locais de origem das espécies fósseis: azul: subfamília *Juglandoideae*; vermelho: subfamília *Engelhardioideae*.

A realização de estudos de sintenia integrando seis espécies pertencentes ao gênero *Juglans* (*J. regia*, *J. sigillata*, *J. cathayensis*, *J. hindsii*, *J. microcarpa* e *J. nigra*) e a espécie *Pterocarya stenoptera*, espécie geneticamente muito próxima dessas espécies



*Juglans* (Chen et al., 2019) e igualmente pertencente à subfamília *Juglandoideae* (Stevens et al., 2018), permitiram uma análise evolutiva mais detalhada (Luo et al. 2015). De acordo com Luo et al. (2015), a espécie *J. regia* terá sofrido um evento de duplicação do genoma há aproximadamente 60 milhões de anos (MA). Segundo Mable et al. (2011), o período do Cretáceo-Paleogénico (~ 65 MA) marcado por uma forte instabilidade ambiental, estará associado à ocorrência de eventos de duplicação genómica (DG) originando divergências entre as linhagens ancestrais e as formas atuais das espécies. Devido à inconsistência de informações relativamente à datação, Chen et al. (2019) estimaram que o ancestral da linhagem *Juglans* terá sofrido uma separação do grupo que integra a espécie *Pterocarya stenoptera* no período do Cretáceo-Paleogénico há relativamente 65 milhões de anos (Figura 3-A). Estes eventos de duplicação genómica originaram ao longo de milhões de anos o surgimento de diferentes espécies (Rabier et al., 2013).

A integração das espécies *J. regia* e *J. sigillata* no grupo *Dioscaryon/Juglans* é novamente suportado por Mu et al. (2017) e Chen et al. (2019), estando estas duas espécies altamente relacionadas por serem as mais importantes comercialmente para produção de nozes (Ning et al., 2020). Na tentativa de compreender a evolução das seis espécies *Juglans* e da espécie *P. stenoptera*, Stevens et al. (2018), analisaram a variabilidade de dois genes da família Polifenol Oxidase (do inglês - *Polyphenol Oxidase*, *PPO*) – *PPO1* e *PPO2*, genes que codificam enzimas associadas à oxidação de compostos fenólicos envolvidos na resposta de defesa das plantas a situações de *stress* (Steffens et al., 1994). O facto do gene *PPO2* se agrupar em clusters muito próximos ao gene *PPO1* na árvore filogenética (Figura 3- B), associado a uma disposição em *tandem* no genoma de *P. stenoptera* e em quatro das espécies de *Juglans*, revela a ocorrência do evento de duplicação do gene ancestral PPO antes da diversificação do género *Juglans*, conduzindo à evolução destes genes ao longo de milhões de anos suportando uma vez mais que a duplicação genómica terá ocorrido antes da diversificação do género *Juglans*. Por outro lado, em espécies domesticadas, com interesse agronómico como *J. regia* e *J. sigillata* (Ning et al., 2020), a perda de funções de algum destes genes, em particular do *PPO1* terá conduzido a um afastamento em termos filogenéticos e à sua separação no genoma, razão pela qual não se encontram agrupados em *tandem* (Chen et al., 2019).



**Figura 3** – Evolução do grupo que integra espécies do género *Juglans* (*J. regia*, *J. sigillata*, *J. cathayensis*, *J. hindsii*, *J. microcarpa* e *J. nigra*) e do grupo englobando apenas a espécie *Pterocarya stenoptera*. (A) Evento de duplicação genómica e divergência de grupos das seis espécies pertencentes ao género *Juglans* e da espécie *P. stenoptera* a partir de um ancestral comum no período do Cretáceo-Paleogénico (~65 MA). Traço contínuo a preto representa a árvore filogenética de seis espécies pertencentes ao género *Juglans* e da espécie *P. stenoptera* (B) Divergência filogenética baseada na análise de dois genes da família PPO (*PPO1* e *PPO2*). Traços contínuos a verde representam a árvore filogenética do gene *PPO2* e a azul a árvore filogenética do gene *PPO1*. Adaptado de Chen et al. (2019).

### 2.1.3. Caracterização botânica da espécie *Juglans regia*

As plantas pertencentes à espécie *J. regia*, comumente conhecidas por noqueira persa ou noqueira inglesa (Zhang et al., 2020), apresentam um porte arbóreo (Figura 4-A) com uma altura que pode atingir até 30 metros (McGranahan & Leslie, 2009). São árvores de folha persistente, caracterizadas por apresentarem folhas alternadas, com um comprimento que varia entre 20 a 45 cm (Stonehouse, 2011) e uma largura de 40 cm (Totally Wild UK, 2022), compostas por folíolos em número variável (Stonehouse, 2011), organizados em pares, de um a três, terminando num terminal (Van Den Berk Nurseries, 2024) (Figura 4-B).

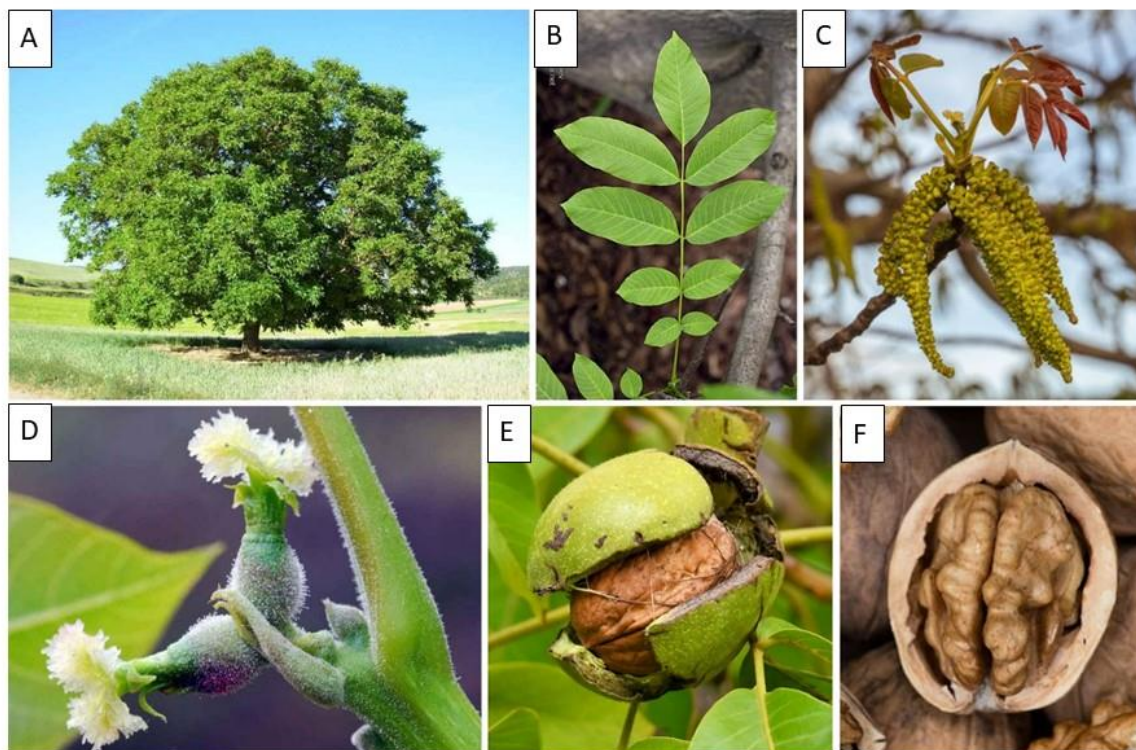
De acordo com a descrição de Germain et al. (1999), as nozeiras são plantas monoicas (com flores masculinas e femininas na mesma planta), no entanto, existem genótipos que apresentam apenas flores estaminadas e genótipos que apresentam apenas flores pistiladas. Apesar da autocompatibilidade verificada em plantas monoicas, a taxa de fecundação é baixa por se tratar de plantas dicogâmicas, em que as flores masculinas libertam pólen antes que as flores femininas estejam recetivas. Assim, em termos produtivos, de modo a aumentar a taxa de fecundação e subsequente frutificação devem ser consideradas pelo menos duas cultivares compatíveis no estabelecimento de novos pomares (Stonehouse, 2011).

As inflorescências masculinas apresentam-se sob a forma de amentilhos, compostos por um número máximo de 40 flores estaminadas desprovidas de pétalas e com um número elevado de estames (Figura 4-C), e as inflorescências femininas apresentam-se em forma de espiga constituídas por 2 a 5 flores pistiladas com involúcro peludo formado pela fusão basal das quatro sépalas que envolvem o ovário (Figura 4-D) (McGranahan & Leslie, 2009). O ovário surge ligado ao estigma bifurcado em dois lóbulos emplumados que terminam num estilete curto (McGranahan & Leslie, 2009). No seu interior possui apenas um lóculo dividido em quatro setores pelos septos maiores e menores (Figura 4-E) (McGranahan & Leslie, 2009) com apenas um óvulo envolvido num único tegumento (Pinney et al., 1998), o qual dará origem a uma única semente em formato cerebriforme repartida em quatro câmaras (Figura 4-F) (Aradhya et al., 2006, Garmendia & Navarro, 2013). Os frutos de *Juglans* são drupas e por apresentarem parte do pericarpo deiscente são designados de trimas (Hrabovský et al., 2017). Estes frutos, com um calibre de aproximadamente 4 a 5 cm de comprimento, surgem normalmente em grupos de dois ou três (Stonehouse, 2011).

Dependendo da cultivar, a nozeira pode apresentar dois tipos diferentes de frutificação, o qual influencia diretamente a sua capacidade produtiva, sendo estas a frutificação lateral e a frutificação apical/subapical. A frutificação apical/subapical, bastante comum em cultivares tradicionais mais antigas de origem francesa, tais como a cv. ‘Franquette’ e cv. ‘Lara’, caracteriza-se pela localização das flores femininas na zona apical ou subapical dos ramos. A frutificação lateral é característica de cultivares mais modernas como as cultivares californianas, nomeadamente as cvs. ‘Chandler’ e ‘Howard’ (Cabral, 2008; Ramos & Valério, 2017; AJAP, 2017), em que as flores femininas surgem também ao longo dos ramos. Este tipo de frutificação ocorre sobretudo quando a planta é

jovem e muito produtiva, sendo por outro lado um tipo de frutificação raro em árvores adultas (McGranahan & Leslie, 2009).

A frutificação do tipo apical/subapical é mais periférica correspondendo a uma menor capacidade produtiva, pelo contrário, a frutificação do tipo lateral é mais distribuída pela copa correspondendo a uma maior capacidade produtiva (Palomares, 2008).



**Figura 4** – Caracterização botânica da espécie *J. regia*. (A) Árvore adulta de nogueira (Fonte: [https://aminoapps.com/c/pagans-amino/page/item/nogal/IX5E\\_j3KcGIDY34Dbd0a7R6GpBK02XNXXXB](https://aminoapps.com/c/pagans-amino/page/item/nogal/IX5E_j3KcGIDY34Dbd0a7R6GpBK02XNXXXB)); (B) Folhas alternadas compostas por folíolos (Fonte: <https://www.arbolapp.es/en/species/info/juglans-regia/>); (C) Flores masculinas de nogueira na forma de amentilhos compostos por múltiplas flores estaminadas (Fonte: <https://www.istockphoto.com/pt/fotos/flowering-catkins-walnut>); (D) Flores femininas em forma de espiga constituídas por várias flores pistiladas, após a polinização (Fonte: <https://www.arbolapp.es/en/species/info/juglans-regia/>); (E) Nozes maduras dentro do pericarpo (Fonte: <https://botanicalarchive.com/products/juglans-regia>); (F) Miolo de noz (Fonte: <https://gde.md/ro/news/ekonomika/vrema-svobodnogo-sbora-orehov-i-jablok-zakonchilos-1026.html>).

#### 2.1.4. Importância económica do género *Juglans*

Todas as espécies de *Juglans* produzem nozes comestíveis, embora, a qualidade do miolo difira entre espécies de forma considerável, tornando assim, apenas algumas espécies *Juglans* valorizadas pelos frutos, tais como a *J. regia* e a *J. sigillata* (Ning et al., 2020). As outras espécies do género *Juglans* apresentam diversas aplicações, sendo valorizadas como ornamentais (*J. cathayensis*), como porta-enxertos (*J. hindsii* e *J. microcarpa*), ou na produção de madeira (*J. ailantifolia* e *J. cinerea*) (Chen et al., 2019; Germain & Sarraquigne, 2004; Native Plant Trust, 2024).

Por ser a espécie de noqueira mais distribuída a nível mundial, a espécie *J. regia* é a que apresenta a maior relevância económica (Zhang et al., 2020). O interesse ao nível dos frutos é devido ao seu elevado valor nutricional associado à ampla gama de compostos fitoquímicos de efeitos comprovados ao nível da saúde, de entre os quais se destacam os compostos fenólicos (Câmara & Schlegel, 2016; Vu et al., 2018) apresentando-se também como uma fonte de ácidos gordos essenciais, como o ómega-3 (Cheon et al., 2013). Estas características têm contribuído para o aumento do consumo do fruto (Almeida 2020). Segundo os dados estatísticos do INC (2023), entre o ano 2017 até 2021, a China foi o país que liderou o grupo dos principais países consumidores de nozes, seguindo-se os Estados Unidos da América e a Turquia. Quanto ao balanço do consumo global, verifica-se um aumento nos valores de consumo entre o ano de 2017 (834,198 toneladas) até 2020 (1,007,060 toneladas), ocorrendo um ligeiro decréscimo no ano de 2021 (977,272 toneladas).

Para além do fruto, as folhas de *J. regia* são também altamente valorizadas, sendo usadas em medicina tradicional devido aos compostos com características antissépticas, anti-inflamatórias, antidiabéticas, anti-helmínticas e antidiarreicas, bem como, para tratamento de hiperidrose, úlceras e caspa (Carvalho et al., 2010; Cosmulescu et al., 2014), ou para produção de produtos cosméticos de limpeza e hidratação de pele, (Comissão Europeia, 2006). A madeira de *J. regia* é altamente apreciada pela sua grande qualidade, sendo por isso utilizada no fabrico de móveis (Torkaman et al., 2018).

Os nogueirais plantados com variedades de noqueira *J. regia* encontram-se disseminados por todo o globo terrestre (Palomares, 2008), ocorrendo com maior incidência no hemisfério norte, direcionados em particular para a produção de fruto. Contudo, isto não significa que não exista produção de nozes no hemisfério sul, muito pelo contrário, no caso particular do Chile, as produções são bastante significativas, conseguindo fazer chegar à Europa nozes frescas e de elevada qualidade na época

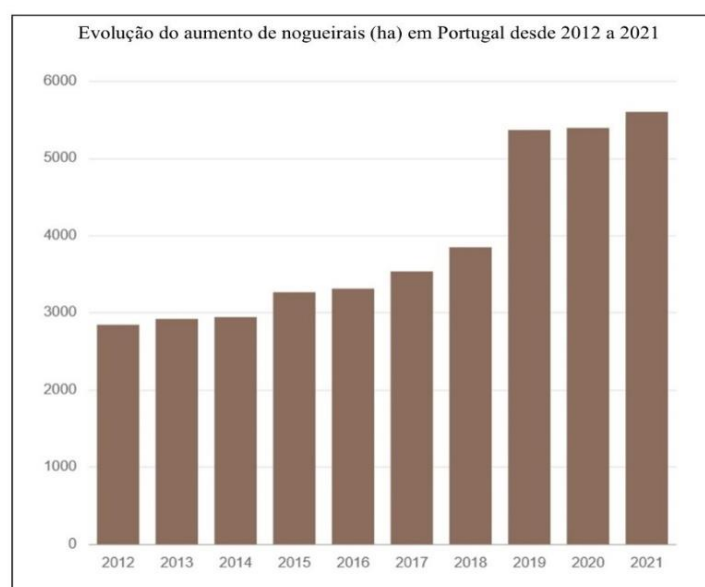
natalícia, período correspondente ao de maior comercialização deste produto (Almeida, 2017).

No que diz respeito às produções globais de fruto, destacam-se particularmente dois países, a China com 53% da produção mundial, conhecida como o maior produtor mundial de nozes sendo a maior parte da produção destinada ao consumo interno do país, embora com tendência crescente para a exportação, e os Estados Unidos da América (EUA) representando 26% do mercado mundial (Almeida, 2020). Depois da China e EUA segue-se o Chile, com 7% da produção global, e a Ucrânia com 3% (INC, 2023). No ano de 2022/2023 a produção mundial de noz com casca atingiu um volume de 2,6 milhões de toneladas e sem casca de aproximadamente 1,2 milhões de toneladas, alcançando assim o maior volume de produção alcançado na última década.

Em Portugal, a noz apresenta-se como o terceiro fruto seco mais produzido (Sara Pelicano, 2022), seguindo uma tendência crescente, com uma maior expressão no território continental, sendo baixa ou praticamente nula nas regiões autónomas da Madeira e dos Açores (Almeida, 2020). O aumento da produção tem estado associado a um aumento das áreas de pomares de nogueira, que terá passado dos 2,7 mil hectares para 5,6 mil hectares desde 2012 até 2021 (Figura 5) (Florestas.pt, <https://florestas.pt/valorizar/noz-portuguesa-em-expansao-na-ultima-decada/>, Consulta realizada a 20 de fevereiro de 2024).

No território continental, no início do século XXI a produção de noz incidia principalmente na zona Norte, particularmente na região de Trás-os-Montes (GPP, <https://www.gpp.pt/>, Consulta realizada a 21 de fevereiro de 2024). Nos últimos anos, é o Alentejo a região onde esta cultura se encontra maioritariamente concentrada, com 43% da sua área de cultivo ocupada por pomares de nogueiras a que corresponde uma produção de 57% (~ 1,8 toneladas por hectare) (Florestas.pt, <https://florestas.pt/valorizar/noz-portuguesa-em-expansao-na-ultima-decada/>, Consulta realizada a 20 de fevereiro de 2024). Este aumento da área dos pomares de nogueira focado no Alentejo, está maioritariamente relacionado com o estabelecimento do perímetro de regadio associado ao Alqueva (AGROPORTAL, <https://www.agroportal.pt/noz-portuguesa-em-expansao-na-ultima-decada/>, Consulta realizada a 25 de fevereiro de 2024).





**Figura 5-** Evolução da área de pomares de noqueira (ha) em Portugal nos anos de 2012 a 2021. Fonte: Adaptado de Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (GPP), com dados do INE – Instituto Nacional de Estatística (2022).

Em termos de produção, os dados de 2020 relatam 224 toneladas de nozes com casca e 135 toneladas de nozes sem casca, resultando num montante de 750.000 € nas exportações de nozes com casca e 876.000 € na exportação de nozes sem casca. Apesar do aumento de produção, Portugal continua a ser um país essencialmente importador de noz, o que continua a potenciar o aumento da produção nacional, desde que seja competitiva com os países de onde a noz é importada. Isto porque parte da noz sem casca que é exportada por Portugal é importada de outros países, nomeadamente França, Espanha, e em menor dimensão, da Roménia, sofrendo posteriormente algumas transformações, tornando assim, o produto final com valor monetário superior (Almeida, 2020). As nozes sem casca, são exportadas essencialmente para Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOPs), no entanto, as nozes com casca, são exportadas sobretudo para Turquia, Marrocos e em menor escala para Angola e Cabo Verde, sendo ainda, destinadas a alguns países da União Europeia tais como Espanha, Itália e com menor expressão, a França (Almeida, 2020; Comissão Europeia, 2019). Tendo em conta a tendência crescente da área de nogueirais é expectável que a produção de noz também

aumente durante a próxima década, uma vez, que a produtividade das nogueiras, com relevância comercial, se inicia em torno do sétimo ano de vida (Florestas.pt, <https://florestas.pt/valorizar/noz-portuguesa-em-expansao-na-ultima-decada/>, Consulta realizada a 20 de fevereiro de 2024).

## 2.2. Métodos de Propagação da Nogueira

### 2.2.1. Propagação seminal

A propagação de plantas pode ser realizada utilizando sementes, denominada de propagação seminal ou sexuada, ou utilizando segmentos do caule com pelo menos uma gema axilar (estacas) denominada de propagação vegetativa.

A utilização de sementes depende de um processo de fertilização que envolve a fusão de duas células sexuais (gâmetas) provenientes de cada progenitor envolvido, sendo caracterizada pela presença de variabilidade genética resultante do processo de formação dos gâmetas (meiose). Esta forma de propagação corresponde ao método mais ancestral, sobretudo por ser o mais fácil, tendo sido utilizado no estabelecimento de diversos pomares, o que consequentemente justifica a relevância em adquirir sementes de boa qualidade (Chauhan et al., 2021). No entanto, a grande variabilidade genética associada a esta forma de propagação conduz à presença características, quer sejam desejáveis ou indesejáveis, de forma não controlada (Monteuuis, 2017). Apesar das vantagens que este método pode apresentar face aos métodos de propagação vegetativa, em particular a facilidade do método, a obtenção de variabilidade genética, a obtenção de plantas mais vigorosas exibindo níveis de resistência a *stresses* bióticos e tolerância a *stresses* abióticos mais elevados, a variabilidade genética num contexto agrícola pode apresentar algumas desvantagens tornando-se um método desinteressante. A segregação de características dos progenitores com o consequente impacto ao nível da heterogeneidade dos pomares, um longo período de juvenilidade, conduzindo ao atraso da floração e subsequente frutificação (Chauhan et al., 2021) são fatores que condicionam o sucesso económico de qualquer cultura e que atualmente condicionam a utilização de plantas provenientes da germinação de sementes para plantação de pomares.

No caso particular da nogueira, como as plantas apresentam um elevado nível de heterozigota a produção e qualidade das nozes em pomares estabelecidos por via seminal é altamente variável (Reil et al., 1998). De entre as características morfológicas e fenológicas em que a variabilidade se destaca encontram-se os hábitos de crescimento e



a produção, o vigor da árvore, os períodos de dormência, a proporção do miolo, cor e peso da noz, quebras de produção, e longos períodos de juvenilidade resultando numa produção tardia e consequente atraso no retorno dos investimentos (Vahdati, 2003; Ertürk et al., 2014; Gandev, 2014; Kirca et al., 2014). Todas essas características tornam a utilização da multiplicação seminal nada atrativa para a propagação de variedades de noqueira colocando a propagação vegetativa como o método alternativo.

### 2.2.2. Propagação vegetativa

A propagação vegetativa ou propagação assexuada baseia-se na utilização de órgãos vegetativos tais como folhas, caules, raízes e as suas formas modificadas para regeneração de um novo indivíduo (Chauhan et al., 2021). Esta forma de propagação permite a multiplicação de genótipos de interesse de maneira ilimitada, preservando o património genético nativo, obtendo plantas homogêneas em termos genéticos e consequentemente manifestando as mesmas características fenotípicas em campo (Monteuuis, 2017). A utilização dos métodos de propagação vegetativa data de muitas décadas, sobretudo quando associados à propagação de genótipos desprovidos de sementes (apirenes) ou com sementes com baixa viabilidade ou com períodos de dormência muito longos (Gupta et al., 2022). Os métodos de propagação vegetativa mais utilizados na propagação de espécies vegetais são a enxertia, a estacaria e a alporquia/mergulhia (Chauhan et al., 2021). Destes, têm sido utilizados na propagação vegetativa de noqueira a enxertia e a estacaria (Scaltsoyiannes, 1997; Vahdati et al., 2022).

#### 2.2.2.1. Enxertia e microenxertia

A enxertia consiste na união de duas partes vivas de uma planta, neste caso, envolve a união de um sistema radicular (porta-enxerto) e um sistema aéreo produtivo (enxerto) (Baron et al., 2019), resultando numa nova planta após a regeneração dos tecidos vegetais que constituem a união da enxertia (Martínez-Ballesta et al., 2010; Cookson et al., 2014). Esta técnica é utilizada em diversas espécies lenhosas como *Olea europaea* L. (Fabbri et al., 2004), *Prunus spp.* (Zarrouk et al., 2010), *Citrus spp.* (He et al., 2018), e *Malus spp.* (Adams et al., 2018), sendo utilizada para ultrapassar adversidades associados ao solo, como a resistência a agentes patogénicos (Ramírez-Gil et al., 2017), seca (Zhou et al., 2018), salinidade (Mehdi-Tounsi et al., 2017), deficiências de nutrientes (Jimenes et al., 2018) e para permitir a propagação de determinadas espécies

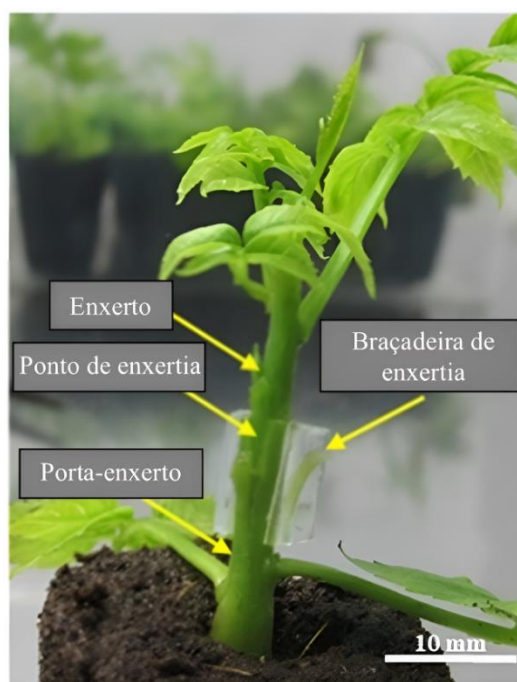
ou variedades/cultivares de interesse que não enraízam por estacaria ou não se propagavam facilmente por via seminal (Mudge et al., 2009). Esta técnica de propagação vegetativa é também associada à tentativa de aumento da precocidade de produção da planta evitando a fase juvenildade (Baron et al., 2019). A enxertia é utilizada na propagação vegetativa de noqueira devido, em particular, à grande dificuldade que as cultivares de *J. regia* apresentam na formação de raízes adventícias (recalcitrantes ao estímulo do enraizamento), como verificado na cv. ‘Chandler’ e ‘Howard’. A possibilidade de enxertar estas cultivares de interesse em porta-enxertos já enraizados tornou-se a estratégia utilizada durante as últimas décadas. Neste caso a cultivar é propagada de forma clonal, utilizando varas obtidas de plantas adultas estabelecidas em campo, sendo a origem dos porta-enxertos muitas vezes seminal (Figura 6) (Thirupathaiah et al., 2024).

O porta-enxerto constitui a parte principal da técnica de enxertia, visto que, permite que plantas com interesse agronómico, ultrapassem diversas condições de *stress* e promova o aumento da produção (Martínez-Ballesta, 2010; Warschefsky et al., 2016).



**Figura 6-** Nogueiras da cv. ‘Chandler’ (*Juglans regia*) enxertada sob porta-enxerto de origem seminal com um ano, segundo a técnica de borbúlia (Fonte: <https://www.waltreeturkey.com/>).

No entanto, a utilização de porta-enxertos obtidos por via seminal introduz grande heterogeneidade ao nível dos pomares (Ribeiro et al., 2022; Liu et al., 2024) e condiciona o sucesso da enxertia devido à incompatibilidade entre os dois genótipos (porta-enxerto e enxerto) podendo mesmo levar à morte da planta enxertada (Baron et al., 2018). No sentido de ultrapassar esta heterogeneidade ao nível do porta-enxerto foram estabelecidos protocolos de multiplicação *in vitro* por cultura de microestacas, os quais têm permitido a obtenção de porta-enxertos clonais posteriormente utilizados para enxertia com varas provenientes das cultivares de interesse estabelecidas em campo, ou microestacas provenientes da multiplicação dessas cultivares *in vitro* (Figura 7, denominando-se neste caso de microenxertia) (Ribeiro et al., 2022).



**Figura 7-** Exemplo da cultivar ‘Chandler’ (*Juglans regia*) microenxertada no porta-enxerto híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’. Setas amarelas a destacar, vários pontos fundamentais que compõe o método de microenxertia. Adaptado de Ribeiro et al. (2022).

Devido á heterogeneidade verificada ao nível dos pomares, resultante da enxertia de cultivares de interesse sob porta-enxertos de origem seminal (Ribeiro et al., 2022; Liu et al., 2024), a obtenção de cultivares auto-enraizadas, bem como, de porta-enxertos clonais, seria mais vantajoso (Vahdati et al., 2004; Vahdati et al., 2008). Atualmente, a

multiplicação por estacaria/microestacaria tem sido a estratégia mais seguida para multiplicação das principais cultivares de interesse (Tsutsui et al., 2020).

#### **2.2.2.2. Estacaria lenhosa e semi-lenhosa**

Algumas espécies lenhosas de interesse a nível agronómico ou florestal são propagadas por estacaria. Em plantas lenhosas esta técnica consiste na utilização de uma secção de um ramo destacado da árvore-mãe com pelo menos uma gema axilar, a qual irá abrolhar garantido a regeneração de uma nova planta. Existem, no entanto, alguns génotipos que mostram um comportamento recalcitrante ao processo de formação de raízes adventícias na base da estaca, impedindo a propagação eficiente desses génotipos e sua consequente disponibilidade para novas plantações (Relf & Ball, 2009). Este comportamento é comum a uma grande diversidade de fruteiras onde se inclui também a nogueira (Kuniyuki & Forde, 1985; Coggeshall & Beineke, 1997).

De acordo com Iqbal & Kumar Singh (2018) existem dois métodos de propagação por estacaria utilizados na propagação de nogueira, sendo estes a estacaria lenhosa e a estacaria semi-lenhosa. Segundo Reil et al. (1998), propagação de nogueira por estacaria lenhosa baseia-se na utilização de estacas lenhosas, recolhidas durante o período de dormência da árvore, logo após a queda das folhas. Estas estacas apresentam normalmente entre 13 a 31 cm de comprimento e 3 a 5 gemas. Para indução da formação de raízes na base da estaca é utilizada uma auxina, normalmente AIB, sendo de seguida colocadas em substrato orgânico e mantidas durante 30 a 50 dias em ambiente controlado de temperatura (24° - 27° C) e humidade relativa elevada.

Na propagação de nogueira por estacaria semi-lenhosa são utilizados ramos jovens, normalmente ramos formados no próprio ano e que já cessaram parte do seu crescimento primário iniciando o crescimento secundário com a formação de tecidos lenhificados (Reil et al., 1998). Dos ramos semi-lenhosos são preparadas as estacas semi-lenhosas com aproximadamente 13 ou 31 cm de comprimento exibindo 3 a 5 gemas. O momento de recolha do material vegetal para preparação das estacas influencia bastante o sucesso da propagação vegetativa. Estacas preparadas de material vegetal recolhido em meados de agosto e meados de outubro, provenientes de árvores jovens enxertadas ou auto-enraizadas, estão normalmente associadas a taxas de enraizamento mais elevadas. Para indução da formação do sistema radicular adventício a base das estacas é igualmente tratada com aplicação de uma auxina, geralmente AIB, sendo as estacas colocadas de

seguida em substratos orgânicos e mantidas em estufa por um período de 30 a 50 dias em condições de ambiente controlado com humidade relativa elevada durante o dia e temperatura entre 24° - 27 °C. A principal desvantagem deste método deve-se ao fato da noqueira ser uma árvore de folha caduca e a obtenção de estacas semi-lenhosas apenas pode decorrer até final do período de crescimento ativo da planta (Reil et al., 1998).

Embora a estacaria lenhosa e semi-lenhosa possa ser realizada para a propagação vegetativa de noqueira (Iqbal & Kumar Singh, 2020), ambos os métodos estão associados a baixas taxas de sucesso (Leslie & McGranahan, 1992; Kepenek, 1994; Iqbal & Kumar Singh, 2020) devido, em particular, à grande dificuldade de enraizamento das plantas (Kepenek, 1994; Iqbal & Kumar Singh, 2020). De modo a superar estas dificuldades, foram desenvolvidos protocolos *in vitro* (microestacaria) que permitiram ultrapassar as limitações associadas a estes métodos convencionais.

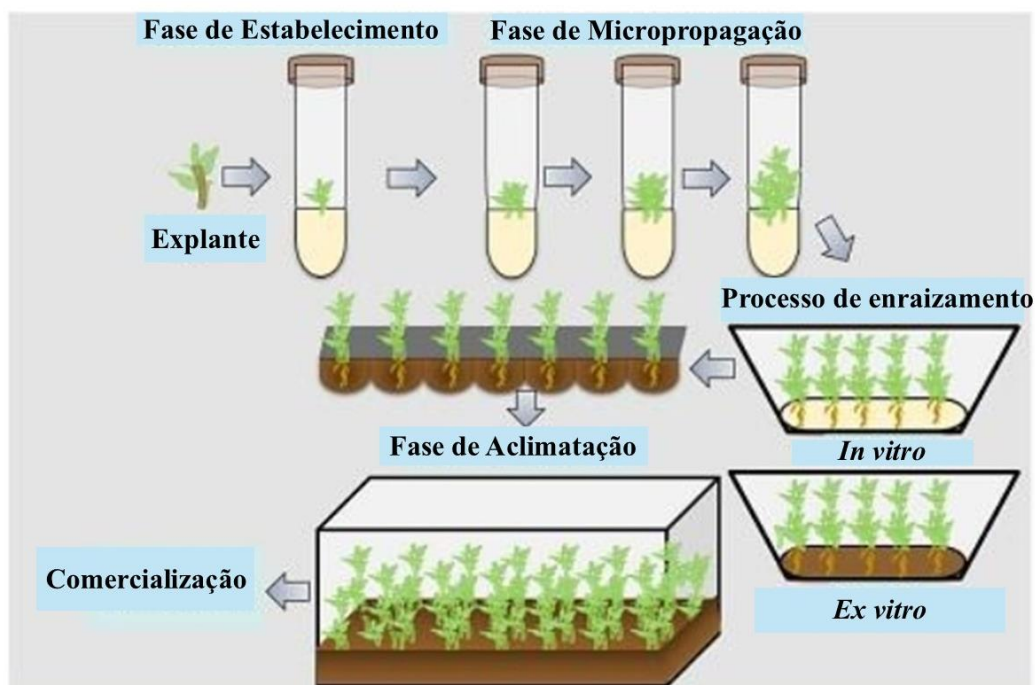
#### 2.2.2.3. Microestacaria

A micropropagação é um método de propagação vegetativa que se baseia na utilização de microestacas, segmentos do caule com 1 a 2 cm de comprimento com, normalmente, apenas um nó (gomo axilar) (Monteuuis, 2017). Esta metodologia permite a multiplicação clonal em grande escala, num espaço limitado, sem restrições relativas ao período do ano ou a condicionantes ambientais externas (Monteuuis, 2000; Cassells, 2003). Por ser uma técnica de cultura *in vitro* permite a produção de plantas isentas de organismos patogénicos e de outros contaminantes, disponibilizando material vegetal para comercialização e para fins de investigação (Monteuuis, 2017).

Para o estabelecimento *in vitro* de um genótipo a propagar por cultura de microestacas são geralmente utilizados segmentos de caules jovens obtidos de uma planta-mãe em condições *ex vitro* (campo ou estufa), com aproximadamente 3 cm de comprimento e apresentando apenas um nó, o que corresponde à presença de um gomo vegetativo. Estes segmentos de caule (explantes) são submetidos a um processo de lavagem e desinfeção de modo a eliminar potenciais contaminantes. Após o processo de desinfeção os fragmentos são inoculados em meios de cultura para permitir o abrolhamento dos gomos e subsequente alongamento da plântula (Ríos Leal et al., 2007). Esta fase de estabelecimento decorre normalmente durante um período de 30 dias, em câmaras de crescimento sob condições controladas de fotoperíodo e temperatura. Após este período as plântulas podem ser novamente segmentadas em microestacas de 1 a 2 cm

de comprimento (sub-culturas) e colocadas em novo meio de cultura de micropropagação de modo a aumentar a produção de plântulas *in vitro*, ou por outro lado, ser conduzidas para a fase de processo de enraizamento (Kepenek & Kolağasi, 2016; Ribeiro et al., 2022). O procedimento de indução do EA depende da espécie, podendo consistir no contacto da base da plântula (normalmente com 3 a 5 cm de comprimento e exibindo 2 a 4 folhas apicais) com uma solução de auxina e subsequente estabelecimento em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento, como na propagação de cultivares de oliveira (Santos Macedo et al., 2012), ou no estabelecimento direto da plântula em meio de cultura de composição semelhante ao meio de micropropagação suplementado com uma auxina (Peixe et al., 2015). Após a fase de indução as plântulas são transferidas para meio de cultura desprovido de auxinas ou para um substrato orgânico, e mantidas em condições de ambiente controlado, onde desenvolverão as raízes adventícias – fase de expressão (Santos Macedo et al., 2012; Ribeiro et al., 2022). Após o enraizamento, as plantas são extraídas do meio onde estavam inseridas (meio de cultura/ substratos orgânicos), lavadas as suas raízes e colocadas em novo substrato orgânico, sendo mantidas em ambiente controlado para que possam aclimatar às condições *ex vitro* – fase de aclimação (Ríos Leal et al., 2007). Após a sua preparação gradual para as condições de campo, as plantas podem ser finalmente comercializadas (Supriya, 2024). A Figura 8 representa as etapas de micropropagação, indução e expressão do enraizamento e aclimação.

Em nogueira o processo de indução do EA consiste no estabelecimento das plântulas em meio suplementado com uma auxina, normalmente o AIB, sendo as culturas mantidas sob ausência de luz durante alguns dias, sendo a duração deste período dependente da concentração da auxina e do genótipo (Scaltsoyiannes et al., 1997; Ríos Leal et al., 2007; Vahdati et al., 2022).



**Figura 8-** Representação das fases de estabelecimento, micropropagação, enraizamento (indução e expressão) e aclimação. Fragmentos de caule provenientes da planta-mãe (explantes) são inoculados em meio de cultura de estabelecimento para promoverem o abrolhamento dos gomos e subsequente alongamento da plântula seguindo posteriormente para a etapa de micropropagação, onde as plântulas serão segmentadas de modo a aumentar a produção de plântulas *in vitro*. As plântulas produzidas *in vitro* seguem para a fase de indução do enraizamento e posteriormente para a expressão. Após o enraizamento as plântulas são transferidas para substrato orgânicos ou inorgânicos, e mantidas em estufa para aclimação às condições *ex vitro*, sendo de seguida disponibilizadas para comercialização. Fonte: <https://biologyreader.com/micropropagation-technique.html>.

A cultura *in vitro* permite o rejuvenescimento fisiológico permitindo aumentar a eficiência do EA (Bonga, 1982; Durzan, 1984; Hackett, 1985). De facto, a grande limitação na propagação vegetativa de diversas variedades de *J. regia* é a reduzida capacidade de resposta ao estímulo do enraizamento, o que consequentemente se reflete na baixa taxa de EA. Este comportamento denominado de recalcitrância apresenta-se como um grande obstáculo na propagação vegetativa de genótipos de elite de muitas espécies lenhosas (Díaz-Sala, 2019) e é comum a muitos genótipos de *J. regia*. Compreender os mecanismos moleculares envolvidos na eficiência da formação de raízes adventícias atinge uma importância extrema quando se trata de espécies de elevado

interesse agronómico (De Klerk, 2002). O aumento da eficiência do processo de enraizamento está diretamente associado à redução dos custos associados à produção comparativamente com os métodos convencionais, não apenas pela obtenção de um maior número de plantas enraizadas num menor período, mas também pela redução dos gastos associados à gestão de plantas pés-mãe utilizadas para obtenção das estacas (Monteuuis 2017).

Os primeiros relatos de micropropagação de nogueira com resultados de sucesso datam da década de 1980 (Driver & Kuniyuki, 1984; McGranahan et al., 1987; McGranahan et al., 1988). Sabe-se que em nogueira, o sucesso da micropropagação está diretamente correlacionado com o genótipo, pelo que a utilização de um protocolo desenvolvido para um genótipo pode não resultar quando aplicado a um genótipo distinto (Vahdati et al., 2004; Vahdati et al., 2009). Atualmente a propagação de nogueira por microestacas tem a sua maior aplicação na propagação em massa de porta-enxertos. De entre os vários porta-enxertos clonais de nogueira, surge com maior destaque o híbrido ‘Paradox’ cl.’Vlach’ (Buchner et al., 2022), cuja utilização se deve sobretudo à elevada resistência a doenças e uma melhor adaptação a diversos tipos de solo quando comparado a genótipos *J. regia* (Leslie et al., 2006). De forma geral este é um porta-enxerto vigoroso, tolerante a solos calcários (Vahdati et al., 2021) e com elevados índices de salinidade (Caprile & Grattan, 2006), resistente ao vírus *Cherry leafroll virus* (Vahdati et al., 2021), com alguma resistência à *Phytophthora* (Buchner et al., 2022) e com elevadas taxas de enraizamento quando o processo de enraizamento é induzido *in vitro* (Peixe et al., 2015).

## 2.3. Sistema Radicular e a Formação de Raízes Adventícias - Enraizamento Adventício (EA)

### 2.3.1. Aspetos gerais do enraizamento adventício em condições *in vitro*

Numa planta, o sistema radicular, correspondente ao órgão que assegura a fixação da planta e absorção de nutrientes e água do solo, pode ser constituído por uma raiz principal de origem embrionária que se ramifica em múltiplas raízes laterais, ou ser constituído por raízes adventícias (Roussos, 2023). Em plantas da classe *Magnoliopsida*, a raiz principal tem origem na radícula do embrião e surge na fase de germinação do embrião, sofrendo durante o processo de desenvolvimento e alongamento a ramificação em múltiplas raízes laterais. As raízes laterais são raízes pós-embrionárias com origem em células do periciclo das raízes primárias. As raízes adventícias, típico do sistema



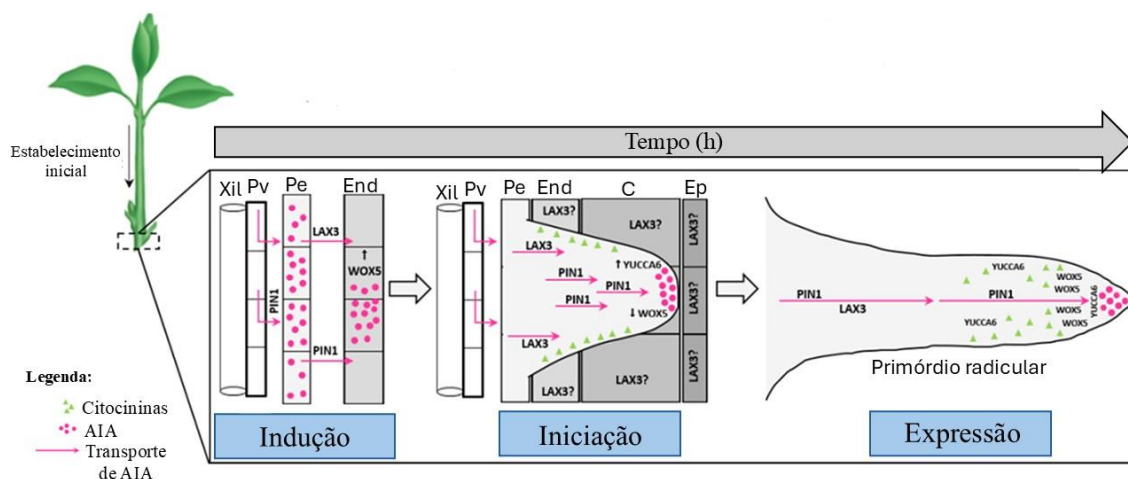
radicular das plantas da classe *Liliopsida*, têm uma origem pós-embriônica, formando-se não de tecidos da raiz, mas a partir da região mais basal do caule (Lovell, 1986; Verstraeten et al., 2014; Roussos, 2023). Tanto as raízes laterais como as raízes adventícias partilham os mesmos processos de formação (Ermel et al., 2000), uma vez que ambas provêm de células diferenciadas que perdem a sua identidade morfogenética para readquirirem as suas competências de células merismáticas primárias, e num processo subsequente de rediferenciação, dando origem a novos primórdios radiculares (Li et al., 2009b; Geiss et al., 2009).

Esau (1953) definiu o EA como sendo o processo associado à formação de raízes num local da planta onde não é comum o desenvolvimento de raízes, tais como, o caule ou a folha. A formação de raízes adventícias pode constituir parte do sistema radicular primário fazendo parte do desenvolvimento normal das plantas, como ocorre de forma natural na maioria das plantas da classe *Liliopsida*, ou resultar de uma resposta a condições de *stress* ambiental como característico de algumas dicotiledóneas, sendo em espécies de interesse agronómico o fator chave de um sistema de propagação vegetativa eficiente (Geiss et al., 2009; Oinam et al., 2011).

Alguns estudos sugerem que diferentes tipos de raízes adventícias possuem diferentes funções (Hochholdinger et al., 2004; Atkinson et al., 2014; Bellini et al., 2014; Pacurar et al., 2014). De entre os vários tipos de raízes adventícias destacam-se as raízes adventícias induzidas por estiolamento, alagamento, soterramento e ausência de luz, formadas em resposta a deficiência de nutrientes no solo, exposição a metais pesados ou a danos mecânicos (ferimento). Este último constitui um dos fatores associados à indução do processo de EA, base dos sistemas de propagação vegetativa de diversas espécies, incluindo culturas lenhosas de relevância agronómica, nomeadamente as fruteiras de caroço amplamente valorizadas pelos setores florestal e hortícola (Steffens & Rasmussen, 2016; Porfírio et al., 2016a), onde se inclui a nogueira (Licea-Moreno et al., 2015; Vahdati et al., 2022).

De um modo geral, o EA associado à propagação vegetativa, ocorre a partir de células somáticas que apresentam diferentes graus de diferenciação, plasticidade e competência para a formação dessas raízes (De Klerk et al., 1999; Vielba et al., 2020), sendo a sua eficiência dependente de diversos fatores, os quais se encontram descritos no ponto abaixo (2.3.1.). Estudos histológico realizados em diferentes espécies reportam a existência de três fases características do processo de formação de raízes adventícias - indução, iniciação e expressão, cada uma das quais envolve um controlo complexo a nível

molecular e bioquímico (Figura 9) (Kevers et al., 1997; Guan et al., 2015; Porfírio et al., 2016b).



**Figura 9** – Esquema representativo dos eventos que marcam o processo de formação de raízes adventícias durante as três fases – indução, iniciação e expressão. Durante a fase de indução, o ácido indol-3-acético (AIA) é transportado basipetalmente ao longo das células do parênquima vascular (Pv) em direção às células do periciclo (Pe) pelos transportadores de efluxo PIN1, acumulando-se na endoderme (End), ativando de seguida as proteínas de influxo LAX3 no P onde irá ocorrer a acumulação de auxina. O aumento dos níveis de AIA ativa a expressão dos genes *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 transcription factors (WOX5)*, o qual codifica para uma proteína associada ao posicionamento do centro quiescente (CQ) e indução da dediferenciação celular. Posteriormente, ocorrerá uma redução dos níveis de AIA através da sua conjugação com aminoácidos por ação das proteínas da família GRETCHEN HAGEN 3 (GH3), o que permite a transição para a fase de iniciação (descrição detalhada sobre metabolismo e transporte de AIA no ponto 2.5.2). Nesta fase, o transporte polar de auxina continua a ser mediado pelos transportadores PIN1, que conduzem a auxina para a extremidade do primórdio radicular através das células centrais desse tecido. A expressão dos genes *PIN1* e *LAX3* são inibidos nas células periféricas por ação das citocininas. Deste modo ocorre uma acumulação de auxina no primórdio da raiz que é também consequência da biossíntese *de novo* de AIA mediada pela enzima YUCCA6, o que limita a atividade do gene *WOX5* no ápice do primórdio radicular, promovendo o posicionamento e formação do CQ. A emergência da raiz é favorecida pela ativação do gene *LAX3*, atuando a proteína correspondente ao nível de diferentes tecidos como a endoderme (End), o córtex (C) e a epiderme (Ep), que são tecidos adjacentes ao primórdio radicular. Por último, na fase de expressão, os níveis de auxina são mantidos pelas *WOX5* e *YUCCA6*, que promove a integração do CQ. Ao mesmo tempo, as citocininas permanecem ativas no primórdio da raiz através da inibição dos transportadores PIN1 e LAX3 atuando assim na homeostase da auxina impedindo o

seu transporte excessivo, (descrição detalhada sobre transportadores de auxina no ponto 2.5.2). Xil: Xilema; Pv: Parenquima vascular; End: Endoderme; C: Córtex; Ep: Epiderme. Adaptado de Da Costa et al. (2013), Della Rovere et al. (2013), e Druege et al. (2014).

Durante a fase de indução, cujo período varia entre espécies (Macedo et al., 2013), células já especializadas passam por um processo de reprogramação de modo a adquirir competência para a formação dos primórdios radicular como resposta aos estímulos externos. Segundo Naija et al. (2008), o local de origem das raízes é influenciado pelo tipo de células que quando em contacto com o meio de cultura apresentam competência para responder ao estímulo. Essas células que apresentam competência radicular são usualmente células do câmbio vascular, podendo originar diretamente os primórdios radiculares por se tratar de células com competência meristemática (Da Costa et al., 2013; Vielba et al., 2020). No entanto, em oliveira cv. ‘Galega Vulgar’ foi descrita a origem a partir de células do córtex (Macedo et al., 2013). Nesta primeira fase não são, regra geral, observáveis quaisquer alterações a nível morfológico (Macedo et al., 2013; Pacurar et al., 2014), decorrendo as alterações apenas a nível bioquímico e fisiológico. Seguidamente, na fase de iniciação, as células começam então a dividir-se e a organizar-se conduzindo à formação de campos morfogénicos conhecidos como meristemóides visíveis em análises histológicas (Macedo et al., 2013; Vielba et al., 2020). Finalmente, durante a fase de expressão, os primórdios radiculares desenvolvem-se através dos diferentes tecidos da planta até emergir pela epiderme e ocorre a conexão dos sistemas vasculares (De Klerk et al., 1999; Macedo et al., 2013; Vielba et al., 2020).

Em espécies lenhosas como o castanheiro (Vielba et al., 2020), a oliveira (Macedo et al., 2013), a acácia-negra e a árvore de erva-mate (Oliveira et al., 2024), foi possível verificar as alterações morfológicas que ocorrem durante a formação de raízes adventícias, caracterizando as três fases deste processo. Apesar do processo decorrer de forma muito semelhante, são descritas ligeiras diferenças que dependem da espécie, sendo estas diferenças principalmente observadas durante a fase de indução, nomeadamente no que diz respeito à origem das raízes. Na generalidade, a origem das raízes está mais associada à região do câmbio vascular e tecidos vizinhos como o floema e menos às células do parênquima cortical.

Em nogueira o processo de EA é igualmente complexo e composto pelas três fases (Jay-Allemand et al., 1992; Bisbis et al., 2003; Vahdati et al., 2004). Atualmente, a

existência de estudos histológicos em noqueira é bastante limitada, sendo conhecida na literatura um estudo histológico durante o processo de formação de raízes adventícias em *J. nigra*, onde se verificou a existência das três fases características do processo de formação de raízes adventícias, onde uma vez mais, para esta espécie, a origem dos primórdios radiculares surge das células do parênquima intercaladas entre as fibras do floema (Stevens & Pijut, 2017).

### 2.3.2. Fatores que influenciam o enraizamento adventício (EA) em noqueira

O processo de EA, independentemente da espécie vegetal, é regulado por uma complexa interação entre fatores de natureza distinta, incluindo fatores de natureza endógena e exógena. Em noqueira são igualmente reportados fatores que influenciam o sucesso do EA, os quais se encontram descritos de forma detalhada nos pontos abaixo.

#### 2.3.2.1. Fatores endógenos

##### **Genótipo**

Diversos autores evidenciaram a influência do genótipo na capacidade de enraizamento *in vitro* de espécies lenhosas, incluindo genótipos de *Juglans* (Cornu & Chaix, 1981; Cornu et al., 1981; Evers et al., 1988; Scaltsoyiannes et al., 1994; McGranahan et al., 1987). A resposta ao enraizamento pode variar significativamente entre genótipos, sendo necessária a adequação da composição do meio de cultura, incluindo os sais minerais (MS ou DKW), o agente gelificante, a fonte e a concentração do quelato de ferro (Leslie et al., 2006) e de carbono (Chenevard et al., 1995), o tipo, concentração e tempo de exposição à auxina, assim como a temperatura a que as plântulas são submetidas (Scaltsoyiannes et al., 1997; Dolcet-Sanjuan et al., 2004; Vahdati et al., 2004).

Vahdati et al. (2004) observaram diferenças significativas nas taxas de enraizamento entre as cvs. ‘Sunland’, ‘Chandler’ e ‘Vina’ em meio MS suplementado com 15  $\mu$ M de AIB, registrando-se valores de 94%, 55% e 27%, respetivamente. De forma semelhante, Scaltsoyiannes et al. (1997) reportaram elevada variabilidade nas taxas de enraizamento entre dez clones de *J. regia* induzidos em meio DKW suplementado com 24,6  $\mu$ M de AIB. Apesar de se ter verificado uma taxa média de enraizamento de 44%, os valores individuais variaram entre 5% e 95%, evidenciando a forte dependência genotípica do processo de enraizamento.

Licea-Moreno et al. (2015) reforçaram esta variabilidade genotípica ao constatar que diferentes clones do híbrido *J. major* (Torrey) Heller cv. 209 × *J. regia* L. cv. RA apresentavam respostas diferenciadas às fontes de carbono testadas nos meios de cultura, evidenciando a necessidade de uma abordagem dirigida para a formulação de meios de indução para cada genótipo.

Outro fator identificado com elevada dependência do genótipo diz respeito ao processamento das plântulas. Jay-Allemand et al. (1992) demonstraram que a remoção dos gomos axilares na base do caule em plântulas de quatro clones híbridos de nogueira, seguida da indução em meio DKW com 24,6 µM de AIB, estava associado ao aumento significativo da formação de raízes, sugerindo que a eliminação seletiva de gomos axilares pode constituir uma estratégia eficaz para potenciar a formação de raízes adventícias. Noutros genótipos, pelo contrário, o mesmo procedimento não revelou um impacto relevante no enraizamento.

### ***Idade e estado fisiológico das plântulas***

O sucesso do enraizamento e sobrevivência das plântulas durante a fase de aclimação está diretamente relacionado com o seu estado fisiológico na fase indução do enraizamento (Vahdati et al., 2022). No caso do híbrido ‘Paradox’ foi recomendada a utilização de plântulas vigorosas, com altura compreendida entre 3 e 10 cm, provenientes da fase de multiplicação (McGranahan et al., 1987), recomendação que é atualmente considerada no enraizamento de cultivares de *J. regia*. Segundo McGranahan et al. (1987) esta recomendação surge do facto de apenas plântulas sem necroses nos ápices e sem sinais de desfolha apresentarem maior probabilidade de sobreviver ao processo de aclimação.

A qualidade das plântulas é determinada por um conjunto de fatores, incluindo características fisiológicas, metabólicas (parâmetros bioquímicos), grau de juvenilidade, sensibilidade a reguladores de crescimento e capacidade de diferenciação celular (Pei et al., 2007). De acordo com um trabalho realizado por Licea-Moreno (2016), plântulas de clones do híbrido *J. major* var. 209 × *J. regia* mais saudáveis e com maior densidade foliar revelaram melhor desempenho tanto no enraizamento como na adaptação a condições *ex vitro*.

Pei et al. (2007) estudaram o efeito da qualidade das plântulas na cv. ‘Xinzaofeng’ de *J. regia*, classificando-as em quatro tipos morfológicos distintos. As plântulas do tipo

I e II, caracterizadas por tecidos mais tenros e folhas de menor dimensão, com taxas de enraizamento de 83,3% e 71,9%, respetivamente. As plântulas do tipo III, parcialmente lenhificadas, com entrenós longos e folhas azuladas, com apenas 7,4% de enraizamento; e as do tipo IV, igualmente semi-lenhificadas, com folhas largas e caules estiolados na base, com uma taxa de enraizamento nula, sugerindo uma associação negativa entre o estado de desenvolvimento e a capacidade de enraizamento, fenómeno este também reportado noutras espécies lenhosas (Hartmann et al., 1997).

Outro fator determinante no processo de EA é o conteúdo de lenhina, um composto fenólico que contribui para a rigidez das paredes celulares e que por apresentar propriedades hidrofóbicas facilita o transporte de solutos através dos feixes vasculares (Schuetz et al., 2014). O aumento da deposição de lenhina nos tecidos vegetais está associado ao envelhecimento, tendo sido demonstrado que este processo afeta negativamente a capacidade de enraizamento (Licea-Moreno et al., 2012). Vahdati et al. (2004) constataram que o envelhecimento tem um efeito inibidor na formação de raízes em *J. regia*, sendo plântulas com três semanas de idade as que exibem uma taxa de enraizamento superior, possivelmente devido ao seu estado vegetativo ativo. Por outro lado, Driver (1986) sugeriu que a presença de um determinado nível de lenhina antes da indução ao enraizamento seria benéfica no caso do híbrido ‘Paradox’. Também Bisbis et al. (2003) verificaram que algumas plântulas de noqueira que não desenvolviam raízes apresentavam menor teor de lenhina, sugerindo que de certa forma um certo teor de lenhina será necessário para o desenvolvimento radicular.

A relação entre a idade das plântulas e a sua capacidade de enraizamento foi também estudada por Licea-Moreno et al. (2012), sendo os seus resultados contraditórios aos previamente reportados por diversos autores (Vahdati et al. 2004; Licea-Moreno et al., 2012). Os resultados publicados por esses autores utilizando diferentes genótipos do híbrido *J. major* var. 209 × *J. regia* mostram que plântulas mais velhas apresentaram maior número de raízes, independentemente do genótipo. A capacidade de enraizamento de plântulas com 4, 5 e 6 semanas provenientes da fase de micropropagação em meio DKW-C (McGranahan et al., 1987) suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP), foi avaliada através da indução em meio DKW-C de igual composição suplementado com AIB, durante 5 dias ao escuro. Plântulas com seis semanas de idade demonstraram taxas de enraizamento superiores às de quatro semanas. Por exemplo, no genótipo D53 a taxa de enraizamento foi de 0% em plântulas com quatro semanas, aumentando para mais de 90% em plântulas com seis semanas. Estes resultados podem estar associados à influência

dos reguladores de crescimento utilizados para indução do processo de enraizamento, como o BAP e AIB, na acumulação de lenhina nos tecidos vasculares (Quiala et al., 2012; Santos Macedo et al., 2012). Podem também ser indicativos de uma possível relação entre a redução do crescimento ativo, o envelhecimento das plântulas e a deposição de lenhina (Licea-Moreno et al., 2012), fatores que parecem, em conjunto, modular a competência das células para o processo morfogénico.

#### 2.3.2.2. Fatores exógenos

##### *Tipo e concentração dos reguladores de crescimento*

As fitohormonas constituem um conjunto de moléculas, naturalmente produzidos pelas plantas, que regulam diversos processos biológicos envolvidos no seu crescimento e desenvolvimento (Santner & Estelle, 2009; Taiz & Zeiger, 2010). Os reguladores de crescimento são compostos sintéticos com funções biológicas similares às hormonas vegetais naturais, regulando processos metabólicos e de desenvolvimento quando aplicados em baixas concentrações (Davies, 1995; Gaspar et al., 1996; Rademacher, 2015). O grupo das fitohormonas conhecidas por ‘clássicas’ é constituído pelas auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico e etileno. Também os brassinosteróides e os jasmonatos possuem funções hormonais (Rademacher, 2015). De entre as fitohormonas ‘clássicas’, as auxinas destacam-se como as mais amplamente estudadas, não só por terem sido as primeiras a serem descobertas (Darwin & Darwin, 1880), mas também pela sua vasta aplicação em protocolos de propagação vegetativa (Ludwig-Muller et al., 2005; Fogaça & Fett-Neto, 2005; Osterc & Stampar, 2011), incluindo a indução do EA em diversas espécies (Macedo et al., 2013; Vielba et al., 2020).

De entre as auxinas classificadas como endógenas, ou seja, sintetizadas pela própria planta, incluem-se o AIA (Simon & Petrásek, 2011), o AIB (Zimmerman & Wilcoxon, 1935), o ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA) (Porter & Thimann, 1965) e o ácido fenilacético (AFA) (Koepfli et al., 1938). Em contraste, o ácido 1-naftaleno acético (ANA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) são auxinas sintéticas (Simon & Petrásek, 2011). Durante muitos anos, o AIB foi considerado uma auxina sintética devido à sua capacidade de induzir respostas similares às auxinas naturalmente presentes nas plantas, como a iniciação radicular, curvatura caulinar e epinastia foliar (Zimmerman & Wilcoxon, 1935). No entanto, estudos posteriores confirmaram também a sua presença

endógena em diversas espécies vegetais, permitindo a sua posterior classificação como uma auxina natural (Korasick et al., 2013).

Das auxinas sintéticas disponíveis, o AIB apresenta-se como a principal auxina utilizada na indução do processo de formação de raízes adventícias (Frick & Strader, 2018). No entanto, dependendo de vários fatores como a espécie, o tipo de explante e as condições de crescimento, o AIB pode ser utilizado em combinação com outras auxinas, como o ácido ANA ou 2,4-D (Oinam et al., 2011). Segundo Heloir et al. (1996), as plântulas de nogueira induzidas *in vitro* são altamente dependentes da presença de auxina exógena para a eficiente indução do processo de enraizamento (ver ponto 2.5.1). Em trabalhos prévios o AIB é apresentado como associado a taxas de enraizamento de 70% em ‘Paradox’, ao passo que 3,0  $\mu\text{M}$  de ANA se apresentou mais eficiente, com taxas de enraizamento de 80% (Driver & Kuniyuki, 1984). No entanto, apesar de associado a uma taxa de enraizamento superior, as plântulas tratadas apenas com ANA demonstraram menos sucesso na fase de aclimação, isto devido a uma ineficiente conexão entre o sistema vascular da plântula e as raízes adventícias recém-formadas. Um trabalho similar realizado com um híbrido de *J. nigra*  $\times$  *J. regia* clone ‘A69’ corroborou os resultados prévios, confirmando a eficiência do AIB em comparação com o AIA e o ANA quando utilizado nas mesmas concentrações (Dolcet-Sanjuan et al., 2004).

As concentrações ideais de AIB para indução do enraizamento diferem consoante o genótipo, estando a taxa de eficiência do enraizamento geralmente relacionada com concentrações mais elevadas. No entanto, em alguns genótipos ocorre um efeito contrário, tendo concentrações mais elevadas um efeito inibitório. Trabalhos prévios mostram uma variação entre os 0% a 80% da taxa de enraizamento quando utilizado 5 partes por milhão (ppm) de AIB; da mesma forma que a utilização de 40 ppm esteve associada a taxas de enraizamento entre 19% e 100%. Todavia, a dependência dos fatores exógenos e no caso particular, do tipo e concentração dos reguladores de crescimento, não pode dissociar-se da dependência do genótipo, pelo que o estabelecimento de um protocolo de propagação para um genótipo específico implicará o estudo prévio destas condições. Por exemplo, Dong et al. (2007) reportou para a cv. ‘Xinzaofeng’ uma taxa de enraizamento nula com uma concentração de AIB  $\leq 15 \mu\text{M}$ , enquanto que para concentrações entre 25 e 50  $\mu\text{M}$  as taxas de enraizamento foram  $\geq 79,6\%$ . Por outro lado, no híbrido de *J. nigra*  $\times$  *J. regia* clone ‘A69’ a taxa de enraizamento atingiu os valores mais elevados com concentrações de 32 e 100  $\mu\text{M}$  de AIB (Da Dolcet-Sanjuan et al., 2004).



### ***Tempo de Indução***

A fase de indução radicular constitui uma etapa crucial em qualquer processo de micropropagação *in vitro*, em particular de plantas lenhosas (González et al., 1991). Esta fase é definida como o intervalo durante o qual ocorrem eventos bioquímicos essenciais que culminam no início das divisões celulares com a consequente formação dos campos morfogênicos, conduzindo à formação dos primórdios radiculares (Jarvis, 1986; Moncousin, 1991). A duração da fase de indução é determinada pelo tempo mínimo necessário para que um estímulo externo desencadeie o processo de enraizamento em células previamente competentes (Hand, 1994). A resposta específica a esse estímulo depende da capacidade de resposta das células submetidas ao estímulo externo, definindo a sua competência morfogênica (Gaspar et al., 1997). Um período inadequado pode, por um lado, não ser suficiente para uma indução eficiente, mas por outro, conduzir à formação de *calli* e consequente inibição do enraizamento.

Diversos estudos destacam a influência do período de exposição ao estímulo hormonal na eficiência do EA em noqueira. Gruselle et al. (1987) reportaram uma taxa de enraizamento nula em plântulas de noqueira estabelecidas em meio suplementado com AIB e mantidas no escuro durante 0, 1, 2 e 4 dias. No entanto, após 8 e 12 dias de incubação nas mesmas condições, obtiveram taxas de enraizamento de 11,1% e 33,3%, respetivamente. Jay-Allemand et al. (1992) demonstraram que a aplicação de um meio de indução suplementado com 24,6 µM de AIB durante 5 dias, em condições de ausência de luz, foi determinante para a formação de raízes adventícias em plântulas híbridas de noqueira (*J. nigra* × *J. regia*). Resultados similares foram obtidos por Bourrain & Navatel (1994), identificando um período de 6 dias como o mais eficaz para a indução radicular. De forma semelhante, Scaltsoyiannes et al. (1997) relataram que a indução no escuro durante 6 dias foi mais eficiente na promoção do enraizamento nos clones de *J. regia* ‘Plemiana3’ e ‘Plemiana5, quando comparada com uma indução de apenas 3 dias. Vahdati et al. (2004) observaram que plântulas das cvs. ‘Sunland’, ‘Chandler’ e ‘Vina’ apresentaram percentagens mais elevadas de enraizamento quando submetidas a um período de indução no escuro de 6 a 8 dias, em comparação com períodos de 2, 4 e 10 dias. Leslie et al. (2006) reportam os resultados da utilização de 40 ppm de AIB por um período de 3 e de 5 dias, mostrando que um tempo de exposição mais curto estava associado a uma maior eficiência do enraizamento na maioria dos génotipos estudados. Trabalhos mais recentes, demonstraram que a melhor concentração de AIB e tempo de

exposição no meio de indução para *J. regia* é de 12  $\mu$ M durante 5 dias no escuro (Tuan et al., 2017).

### **Fotoperíodo**

O fotoperíodo é um fator identificado como determinante no sucesso da formação de raízes adventícias (Geiss et al., 2009). Em nogueira, os protocolos de indução do enraizamento consideram frequentemente um período no escuro que normalmente coincide com o tempo de contacto com a auxina (Vahdati et al., 2004; Hackett et al., 2000). Dong et al. (2007) verificaram, num estudo com as cvs. ‘Xinzaofeng’, ‘Yuanfeng’, ‘Liaoning-1’, ‘Shangsong’, ‘Vina’ e ‘Chandler’, taxas de enraizamento de 60% a 75% em plântulas estabelecidas em meio de indução expostas ao escuro, ao passo que sob condições de fotoperíodo de 16 horas as mesmas cultivares não desenvolveram raízes. Num estudo similar realizado com a cv. ‘Serr’ foi reportada uma taxa de enraizamento significativamente superior (83%) em plântulas induzidas durante 9 dias no escuro em comparação com plântulas estabelecidas sob 16 horas de fotoperíodo (apenas 26,25%) (Saadat & Hennerty 2001).

### **Temperatura**

A temperatura é outro fator que pode condicionar a eficiência do processo de indução do EA por influenciar a absorção de água e nutrientes, e consequentemente as funções metabólicas de modo geral (Geiss et al., 2009). Embora as informações sobre o efeito da temperatura na formação de raízes adventícias sejam limitadas, reconhece-se que este fator pode influenciar significativamente o estado fisiológico da planta-mãe, refletindo-se subsequentemente na indução e no desenvolvimento radicular (Geiss et al., 2009). Dolcet-Sanjuan et al. (2004) observaram um aumento da percentagem de plântulas enraizadas quando induzidas a 22 °C em comparação com 27 °C. Um trabalho similar desenvolvido por Vahdati et al. (2004) em plântulas das cvs. ‘Sunland’, ‘Chandler’ e ‘Vina’ mostrou uma maior eficiência de enraizamento a 22 °C comparativamente a 30 °C. As taxas de enraizamento registadas a 22 °C foram de 94%, 42% e 25%, respetivamente, enquanto a 30 °C os valores descenderam significativamente para 50%, 13% e 3%, respetivamente.

A influência deste fator está igualmente dependente do genótipo, sendo exemplo desta dependência os resultados reportados por Dolcet-Sanjuan et al. (2004), em que no

híbrido 'A35' de *J. nigra* × *J. regia*, as taxas de enraizamento atingiram 60% a 22 °C face a 45% a 27 °C, e no híbrido 'A32', as taxas de enraizamento foram similares em ambas as condições (43% e 45%, respectivamente).

Regra geral, as evidências disponíveis apontam para um intervalo térmico entre 20 °C e 28 °C como o mais adequado para a indução do processo de EA em nogueira (Leslie & McGranahan, 2009).

### ***Composição do Meio de Cultura***

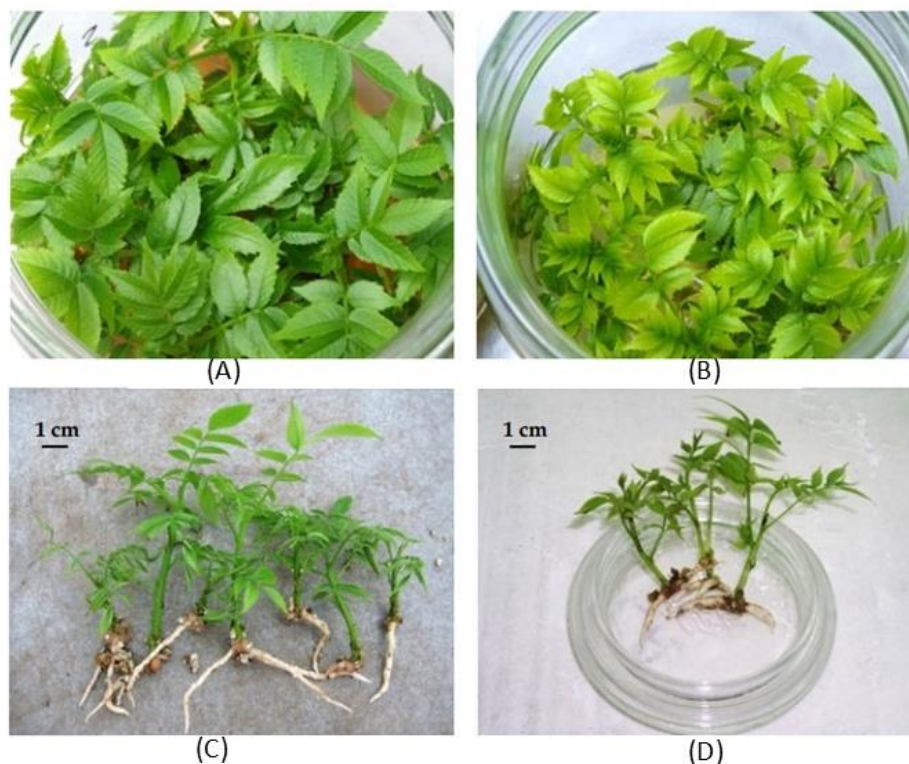
A composição mineral do meio influencia a absorção e o equilíbrio iônico das plântulas, especialmente na ausência de raízes funcionais, comprometendo assim a absorção de nutrientes e levando a uma possível difusão passiva de iões (Gribble et al., 2002). Alguns elementos minerais têm impacto direto na formação de raízes adventícias, podendo atuar como inibidores ou promotores do processo de formação de raízes adventícias, bem como do comprimento das raízes formadas. Tanto os macronutrientes assim como os micronutrientes são fundamentais ao crescimento e desenvolvimento das plantas, ainda que desempenhando diferentes funções segundo as diferentes quantidades em que são necessários (Nadeem et al., 2018). A presença de macronutrientes, como o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e o azoto (N) e de micronutrientes como o zinco (Zn), tem sido associada ao aumento do número de raízes, ao passo que macronutrientes como o N e fósforo (P), e de micronutrientes como o ferro (Fe) e manganês (Mn) estão mais relacionados com o comprimento das raízes.

Embora originalmente desenvolvido para o híbrido 'Paradox', o meio de Driver e Kuniyuki Walnut (DKW) (Driver & Kuniyuki, 1984) tem sido amplamente utilizado em diferentes espécies da família *Juglandaceae*, incluindo diversas cultivares de *J. regia* (McGranahan et al., 1987; McGranahan et al., 1988; Cornu & Jay-Allemand, 1989). Os meios de cultura mais frequentemente utilizados para a micropropagação da nogueira incluem o meio DKW, com ligeiras modificações (McGranahan et al., 1987), e o meio de Murashige e Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962). Apesar do meio DKW ser geralmente o mais eficiente na indução do processo de enraizamento (Gruselle & Boxus, 1990; Caboni & Lauri, 1995; Vahdati et al., 2004), alguns genótipos apresentam bons resultados também em meio MS (Penuela et al., 1988; Revilla et al., 1989; Gruselle & Boxus, 1990; Kornova et al., 1993; Navatel & Bourrain, 2001). Para Sadaat & Hennerty (2002), os genótipos de *J. regia* necessitam de um meio de cultura com elevado teor em

sais, sendo por isso o meio DKW o mais adequado comparativamente com o meio MS. Por outro lado, o meio MS, para além de possuir um elevado teor em sais, assim como DKW, é também constituído por um elevado teor em nitratos, que é reportado como promotor de *stress* metabólico nas plântulas, conduzindo a um sucesso reduzido na formação de raízes adventícias quando comparado com o meio DKW (Sadaat & Hennerty, 2002; Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011).

Ashrafi et al. (2010) avaliaram o enraizamento das cvs. ‘Chandler’ e ‘Sunland’ em dois tipos de meio, o meio DKW e uma versão modificada desse (mDKW), caracterizada por um aumento das concentrações de N, P e S, e uma redução dos níveis de K e  $\text{Ca}^{2+}$ . Para ambas as cultivares foi observada uma diminuição significativa nas taxas de enraizamento quando utilizadas as formulações modificadas.

A fonte de ferro mais comumente utilizada na micropropagação de *Juglans* é o quelato de ferro com EDTA (FeEDTA), cuja concentração mais utilizada no meio DKW ronda os  $6,81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  (McGranahan et al., 1987; Licea-Moreno et al., 2015). No entanto, Licea-Moreno et al. (2015) avaliaram o efeito de duas fontes distintas de ferro — FeEDTA e ferro etilenodiamina-N,N'-bis(2-hidroxifenilacético) (FeEDDHA) — aplicadas ao meio de indução DKW-C (McGranahan et al., 1987), em duas concentrações diferentes ( $6,81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $10,21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ ), utilizando nove clones de noqueira (J1–J9, resultantes do cruzamento entre *J. major* (Torrey) Heller cv. 209  $\times$  *J. regia* L. cv. RA) (Figura 10). Os autores descreveram que um aumento da concentração de FeEDTA para  $10,21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  não resultou em melhorias no desempenho das plântulas, tendo, pelo contrário, inibido por completo a formação de raízes. Mesmo a concentração padrão de  $6,81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , tradicionalmente considerada adequada, conduziu a uma redução significativa na taxa de enraizamento, atingindo apenas 1,1% no clone J9. Por outro lado, a substituição do FeEDTA por FeEDDHA resultou numa melhoria substancial das taxas de enraizamento em todos os clones testados, mesmo quando utilizada a menor concentração ( $6,81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ ). Além disso, em meio com FeEDDHA as plântulas apresentaram-se fenotipicamente mais saudáveis e demonstraram menor suscetibilidade à desfoliação durante a fase de aclimação quando comparadas com plântulas cultivadas na presença de FeEDTA. Embora os mecanismos responsáveis pela maior eficiência do quelato FeEDDHA face ao FeEDTA ainda não estejam totalmente elucidados, os resultados obtidos reforçam a importância da fonte de ferro utilizada nos meios de cultura de indução para o sucesso do processo de enraizamento em noqueira.



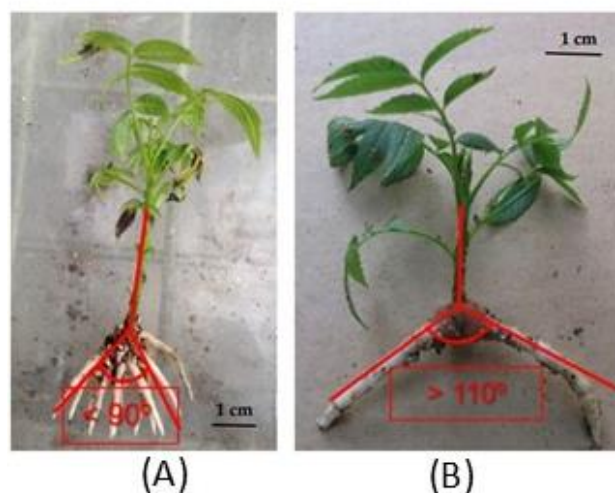
**Figura 10** – Alterações na morfologia das raízes em clones do híbrido de noqueira *Juglans major* (Torrey) Heller var. 209 × *Juglans regia* L. cv. RA inoculados em meio de cultura com diferentes fontes de ferro. (A, C) Plântulas inoculadas em meio suplementado com ferro etilenodiamina-N,N'-bis(2-hidroxifenilacético) (FeEDDHA), apresentando plantas mais vigorosas e com melhor desenvolvimento radicular; (B, D) Plântulas inoculadas em meio suplementado com quelato de ferro com EDTA (FeEDTA), de notar que apresentam menor desenvolvimento da parte aérea e menor desenvolvimento radicular. Adaptado de Vahdati et al. (2022).

Tal como observado com a fonte de ferro, também a concentração de carbono no meio de cultura é determinante no processo de enraizamento da noqueira (Chenevard et al., 1995; Kadota & Niimi, 2004; Corrêa et al., 2005; Ragonezi et al., 2010; Hassankhah et al., 2014). A sacarose é a fonte de carbono mais utilizada nos meios de indução e expressão radicular, desempenhando um papel crucial tanto no aumento da percentagem de enraizamento como no alongamento das raízes formadas, sendo a sua função principal o fornecimento de energia para a intensa atividade metabólica que caracteriza o processo de enraizamento (Chenevard et al., 1995). Um trabalho desenvolvido com clones do híbrido *J. nigra* × *J. regia* (clones ‘M41’ e ‘D152’) inoculados em meio de cultura com três concentrações de sacarose (0, 10 e 40 g·L<sup>-1</sup>) revelou um aumento da taxa de

enraizamento em meio suplementado com  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  relativamente ao meio sem de sacarose independentemente do genótipo, ao passo que em meio com  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  o efeito do genótipo foi determinante, não se verificando alterações significativas para o clone ‘M41’, ao passo que para o clone ‘D152’ se verificou um aumento de 41% da taxa de enraizamento (Chenevard et al., 1995).

Apesar da utilização generalizada da sacarose em protocolos de enraizamento *in vitro* de noqueira (Dolcet-Sanjuan et al., 2004; Vahdati et al., 2004; Leslie et al., 2009), outras fontes de carbono foram também já testadas. Licea-Moreno et al. (2015) avaliaram o efeito de igual concentração (83,2 mM) de sacarose, glicose e frutose na expressão radicular de nove clones híbridos (J1–J9) resultantes do cruzamento entre *J. major* (Torrey) Heller cv. 209 x *J. regia* cv. RA. De um modo geral, a frutose revelou-se a fonte mais eficaz na promoção da formação radicular para a maioria dos clones, com exceção dos clones J5 e J8, que apresentaram melhor resposta às outras duas fontes (Figura 11).

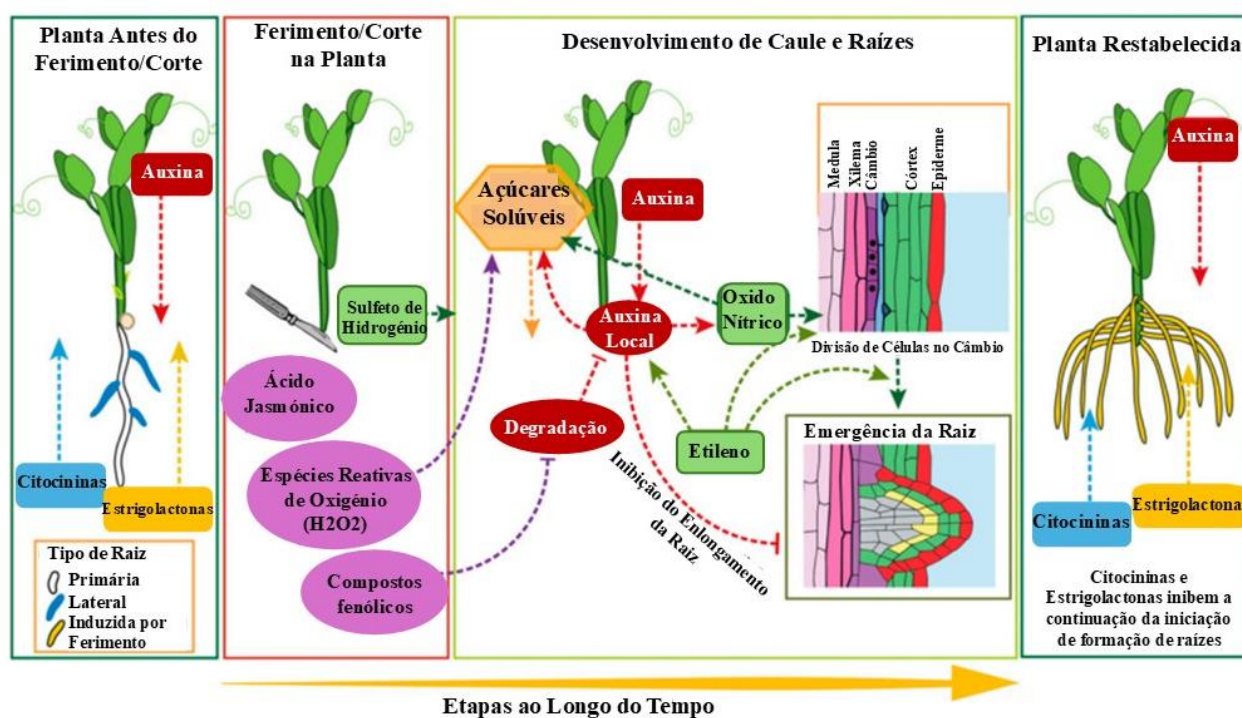
Uma vez mais, a grande dependência do genótipo, neste caso relativamente à concentração de carbono, torna imprescindível o desenvolvimento de protocolos de indução de EA otimizados para cada genótipo.



**Figura 11** - Diferenças morfológicas observadas no sistema radicular de clones do híbrido *Juglans major* (Torrey) Heller cv. 209 x *Juglans regia* L. cv. RA, quando inoculados em meio de cultura suplementado com diferentes fontes de carbono. (A) Plântulas inoculadas em meio de expressão suplementado com frutose; (B) Plântulas inoculadas em meio de expressão suplementado com glicose. Adaptado de Licea-Moreno et al. (2015).

## 2.4. Mecanismos de Sinalização Envolvidos na Formação de Raízes Adventícias

Em condições naturais, as vias de sinalização envolvidas na formação de raízes adventícias podem ser induzidas em resposta a fenômenos de herbivoria, danos físicos, doenças ou presença de parasitas (Schillmiller & Howe, 2005; Wasternack et al., 2006; Wasternack & Hause, 2013). Considerando que a formação de raízes adventícias por estacaria está fortemente associada ao dano mecânico (corte) provocado pela obtenção da estaca (lenhosa/semi-lenhosa) da planta-mãe, ou à preparação das microestacas a partir de plantas micropropagadas, o corte representa um fator chave para desencadear a reprogramação celular e iniciar o processo de formação de raízes adventícias (Figura 12).



**Figura 12** – Esquema representativo do processo de sinalização envolvido no enraizamento adventício (EA). O corte provocado na base da planta induz a biossíntese de ácido jasmônico (AJ) e de espécies reativas de oxigênio (ROS), moléculas sinalizadoras que irão desencadear uma resposta de defesa ao *stress* provocado na planta. As ROS, enquanto moléculas sinalizadoras com possibilidade de mobilização a longa distância irão ativar a fotossíntese na parte aérea da planta conduzindo à síntese de hidratos de carbono, posteriormente translocados para a região da base da plântula onde funcionarão como fonte de energia para a intensa atividade metabólica que aí ocorrerá. A auxina aplicada na base da plântula onde foi exercido o corte, conjuntamente com a auxina endógena, produzida ao nível da parte aérea da planta é translocada até à região basal indo induzir o processo de formação de raízes adventícias. Para impedir a degradação das auxinas, essenciais ao processo de enraizamento, a planta sintetiza compostos fenólicos que impedirão essa



degradação e resultam também na homeostase das ROS impedindo os efeitos negativos destas. As auxinas são essenciais na fase de indução ativando outras vias de sinalização onde está envolvido o óxido nítrico (ON), no entanto, em fases mais avançadas do processo de enraizamento as auxinas provocam a inibição do alongamento da raiz, contrariamente ao verificado para o etileno que o promove. Adaptado de Steffens & Rasmussen, (2016).

Vários protocolos têm sido estabelecidos de forma a promover a formação de raízes adventícias e assim otimizar as taxas de propagação vegetativa em espécies de interesse agrônomico e florestal, em particular espécies lenhosas (Porfírio et al., 2016a; Vielba et al., 2020; Morales-Orellana et al., 2022). Um estudo realizado por Steffens & Rasmussen (2016), revelou as etapas moleculares e fisiológicas que antecedem o processo de formação de raízes e que são responsáveis por controlar a divisão e diferenciação celular que resultará num novo primórdio radicular. Após o corte, as vias de sinalização de resposta ao *stress* do ferimento são iniciadas localmente, exatamente na região do corte que coincide com a base do caule aquando da propagação por estacaria (Creelman et al., 1992; Schilmiller & Howe, 2005). Esse *stress* desencadeia um aumento imediato dos níveis de ácido jasmónico (AJ), com níveis máximos aos 30 minutos após o corte (Ahkami et al., 2009; Rasmussen et al., 2015), necessário para o sucesso da formação de raízes adventícias (Steffens & Rasmussen, 2016). Semelhante ao que ocorre em resposta a outras condições de *stress*, quando ocorre um dano físico a produção de ROS também aumenta (Wasternack et al., 2006), sendo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fundamental para a resposta ao corte (Quan et al., 2008) e consequentemente a formação de raízes adventícias (Li & Xue, 2010; Liao et al., 2010; She et al., 2010). A integração da via de sinalização H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com outra via de sinalização, em particular envolvendo o ião Ca<sup>2+</sup> e as proteínas CaM, por serem ativadas pelo Ca<sup>2+</sup>, na regulação da formação de raízes adventícias foi previamente proposta por Liao et al. (2012) em *Tagetes erecta*. Os autores suportaram a sua hipótese ao verificarem um aumento nas concentrações de Ca<sup>2+</sup> e expressão das CaM resultante da aplicação exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante a indução do processo de formação de raízes adventícias.

Apesar dos ROS apresentarem um papel importante na sinalização da condição de *stress*, é importante que a célula apresente mecanismos para restabelecer a sua homeostase, impedido os efeitos negativos que estas possam apresentar, tais como, danos oxidativos e morte celular (Van Breusegem & Dat, 2006). A célula dispõe de dois mecanismos para restabelecer os níveis de ROS, um enzimático que envolve enzimas



antioxidantes que promovem a degradação dos ROS, tais como, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), o ascorbato peroxidase (APX) e a glutathione peroxidase (GPX) (Apel & Hirt, 2004), e outro não enzimático que envolve a biossíntese de compostos antioxidantes como os compostos fenólicos (Jaleel et al., 2009). O aumento dos compostos fenólicos em resposta ao corte (Steffens & Rasmussen, 2016) permite relacionar o papel destas biomoléculas na formação de raízes adventícias (De Klerk et al., 2011). Sabe-se também que durante o processo de formação de raízes as auxinas podem sofrer degradação, comprometendo assim o sucesso do enraizamento. Contudo, a utilização de compostos fenólicos inibe a degradação desta fitohormona, resultando em níveis mais elevados de auxinas e consequentemente na melhoria do EA (Liao et al., 2010; De Klerk et al., 2011). Para Da Costa et al. (2013), a propagação por estacaria em plantas lenhosas, origina alterações dos níveis de auxina que levam à acumulação desta fitohormona nos tecidos junto ao corte, desencadeando vias de sinalização que provocam uma reprogramação celular a nível molecular que conduzirá à formação dos primórdios radiculares.

Diversos estudos demonstraram a importância da auxina e o efeito antagônico exercido pelas citocininas durante o processo de formação de raízes adventícias (Delarue et al., 1998; Falasca & Altamura, 2003; Vidoz et al., 2010; Della Rovere et al., 2013). A indução do EA ocorre geralmente em condições de elevadas concentrações de auxina e níveis reduzidos de citocinina (De Klerk et al., 1999; Kuroha et al., 2002, 2005). As auxinas são sintetizadas maioritariamente nos tecidos aéreos, enquanto as citocininas são produzidas predominantemente nas raízes (Steffens & Rasmussen, 2016).

As estrigolactonas constituem um grupo adicional de fitohormonas, com funções reguladoras sobre a morfologia da planta, controlando, por exemplo, a ramificação, o crescimento secundário e o desenvolvimento do sistema radicular (Wu et al., 2022). Estas hormonas também estão envolvidas na regulação das fases iniciais da formação de raízes adventícias, em conjunto com as auxinas e as citocininas (Kohlen et al., 2012; Rasmussen et al., 2012). As estrigolactonas são sintetizadas, maioritariamente, nas raízes (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008), sendo que, na propagação por estacaria, devido à inexistência de raízes os níveis desta hormona são reduzidos, o que contribui para a redução da sua atividade inibitória sobre a iniciação radicular (Steffens & Rasmussen, 2016). À medida que os tecidos radiculares se reorganizam, a sinalização hormonal é modulada, com uma recuperação progressiva da síntese de estrigolactonas e citocininas, que atuam inibindo divisões celulares excessivas e prevenindo a iniciação radicular

descontrolada (Steffens & Rasmussen, 2016). Em fases mais avançadas do desenvolvimento radicular, os requisitos hormonais voltam a modificar-se, a auxina passa a inibir o alongamento das raízes (Kevers et al., 1997; De Klerk et al., 1999; da Costa et al., 2013), enquanto a citocinina e o etileno promovem a emergência e o alongamento das raízes adventícias (Steffens & Rasmussen, 2016).

Em 1933, Zimmerman e Hitchcock foram pioneiros ao demonstrar o papel fundamental do etileno no processo de formação de raízes adventícias em várias espécies, mesmo antes da descoberta do envolvimento da auxina. Sabe-se atualmente que o etileno interage tanto com a auxina (Růžicka et al., 2007; Lewis et al., 2011), como com a citocinina (Bollmark & Eliasson, 1990; Ramírez-Carvajal et al., 2009). No entanto, a natureza exata destas interações, no contexto da propagação por estacaria, permanece por esclarecer (Steffens & Rasmussen, 2016).

O corte (dano mecânico) da estaca induz a produção de etileno, seguido pela deposição de auxina endógena na base do corte. Cerca de 24 horas após o corte ocorre um segundo pico de síntese de etileno induzido pela presença da auxina (Podwyszynska et al., 2003). A Figura 12 esquematiza as complexas vias de sinalização hormonal envolvidas na indução de raízes adventícias provocada pelo corte.

Em várias espécies vegetais, o óxido nítrico (ON) e o sulfeto de hidrogénio têm sido identificados como moléculas sinalizadoras com um papel promotor no EA (Liao et al., 2010; Li et al., 2011). No caso do ON, este atua como mediador da resposta à auxina, desencadeando a formação de raízes adventícias (Pagnussat et al., 2003, 2004; Zhang, H. et al., 2009) (ver descrição no ponto 2.5.1). Paralelamente, o metabolismo dos açúcares solúveis também tem demonstrado grande relevância neste processo. Diversos estudos revelaram que níveis mais elevados de açúcares solúveis estão associados a um EA mais eficiente em muitas espécies (Hoad & Leakey, 1996; Druege et al., 2000; Druege et al., 2004; Druege & Kadner, 2008). Neste contexto, é importante salientar que as auxinas, o óxido nítrico e o peróxido de hidrogénio enquanto moléculas ROS sinalizadoras, contribuem diretamente para o aumento da acumulação de açúcares solúveis nos tecidos (Jasik & De Klerk, 1997; Husen & Pal, 2007; Liao et al., 2010), reforçando assim o seu papel no suporte metabólico necessário para a formação de novas raízes. Adicionalmente, condições ambientais, como a exposição a baixos níveis de luminosidade durante o armazenamento das estacas, podem favorecer o EA, possivelmente em resultado da acumulação de açúcares solúveis nesses tecidos (Husen, 2008; Klopotek et al., 2010). Esta interligação entre fatores hormonais, moléculas sinalizadoras e metabolismo

energético demonstra a complexidade e a coordenação bioquímica envolvidas na indução e desenvolvimento de raízes adventícias.

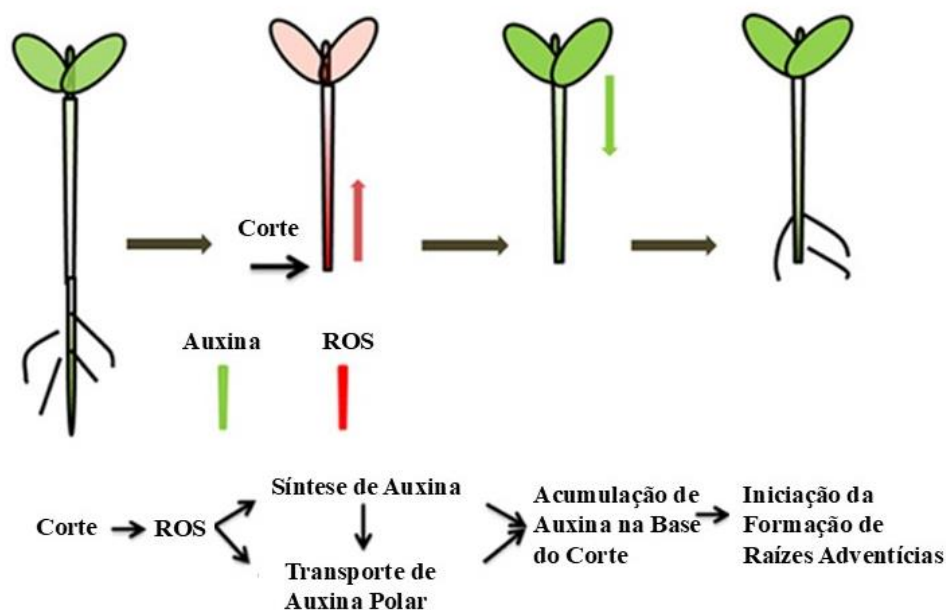
#### 2.4.1. Espécies reativas de oxigénio (ROS) envolvidas na sinalização imediata a condições de *stress*

As ROS constituem um conjunto de moléculas derivadas do oxigénio, englobando tanto formas radicais (oxigénio singlete  $^1\text{O}_2$ , radical hidroxilo  $\text{OH}^\bullet$  e superóxido  $\text{O}^{\bullet-2}$ ), como não radicais (peróxido de hidrogénio,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Zhang et al., 2016a; Zhang, et al., 2016b; Zhang et al., 2016c), caracterizando-se pela presença, na sua estrutura, de pelo menos um átomo de oxigénio (Halliwell, 2006). As ROS são subprodutos do metabolismo aeróbico das plantas, geradas em diversos compartimentos celulares, nomeadamente nos cloroplastos (Dietz et al., 2016), mitocôndrias (Huang et al., 2016), peroxissomas (Sandalio & Romero-Puertas, 2015) e retículo endoplasmático (Tu & Weissman, 2004; Gross et al., 2006) e desempenham um papel crucial como mensageiros secundários, estando envolvidas na regulação do crescimento e na modulação de respostas ao *stress* abiótico e biótico (Zeng, J. et al., 2017; Huang et al., 2019). Através das suas propriedades oxidativas, as ROS podem desencadear alterações morfológicas adaptativas que contribuem para o aumento da tolerância das plantas a diversas condições de *stress* (Wahid et al., 2007; Bose et al., 2014; Frederickson Matika & Loake, 2014).

Sob condições de *stress* as plantas aumentam rapidamente a produção de diferentes formas de ROS que estão envolvidas em processos de sinalização celular e indução de respostas de defesa, as quais incluem a indução de morte celular programada (Gill & Tuteja, 2010; Schippers et al., 2016). Este aumento pontual dos níveis de ROS exige, por parte da planta, a capacidade de restabelecer a homeostase redox intracelular, baixando as ROS aos níveis basais (Xie et al., 2014; Roussos, 2023). Níveis elevados de ROS podem originar a degradação de organelos celulares e comprometer a viabilidade celular por conduzirem à apoptose. Neste contexto, a reaquisição dos níveis basais de ROS é essencial, podendo ocorrer através do aumento da produção de compostos fenólicos enquanto compostos antioxidantes, ou da ativação de enzimas cuja função consiste na degradação destas moléculas (ver ponto 2.4) (Steffens & Rasmussen, 2016; Ban et al., 2021).

No processo de indução do EA, o corte do tecido vegetal representa um estímulo de *stress* físico, desencadeando um aumento nos níveis de ROS como resposta a essa

lesão (ver ponto 2.4) (Steffens & Rasmussen, 2016). De acordo com Huang et al. (2020), a produção de ROS induzida por danos físicos exerce um efeito positivo na indução de raízes adventícias em *Arabidopsis* (Figura 13).



**Figura 13-** Modelo representativo da possível via de sinalização das espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a indução do processo de formação de raízes adventícias associado ao *stress* provocado pelo corte. Um pico nos níveis de ROS ocorre em resposta ao corte provocado na planta. Em resposta a este aumento das ROS ocorre um aumento da biossíntese de auxina ao nível da parte aérea da planta e subsequente transporte para a região basal do caule onde se acumula durante a fase de indução, dando início à formação das raízes adventícias. Adaptado de Huang et al. (2020).

Entre as várias espécies das ROS, o  $H_2O_2$  destaca-se como a mais relevante durante a formação de raízes adventícias (ver ponto 2.4), reportado em diferentes espécies, como em oliveira, feijão mungo e crisântemo (Quan et al., 2008; Li et al., 2009a; Santos Macedo et al., 2009; Li & Xue, 2010; Liao et al., 2010; She et al., 2010). O  $H_2O_2$  é considerado a ROS mais estável (Gechev et al., 2002; Niu & Liao, 2016), estando diretamente associado a diversos reguladores de crescimento vegetal e influenciando múltiplas respostas fisiológicas e moleculares (Roussos, 2023). A sua participação nas vias de sinalização de fitohormonas como as citocininas, o AJ, AIA e o etileno foi demonstrada em vários estudos (Li et al., 2017; Gong et al., 2022). Durante o processo

de enraizamento, o corte do tecido associado à preparação da estaca induz um aumento local da concentração de  $H_2O_2$  (Kang et al., 2018; Kushwaha et al., 2019), sendo este fenómeno potencialmente regulado pela aplicação exógena de auxinas, sugerindo a existência de ciclos de feedback entre o  $H_2O_2$  e estes reguladores de crescimento (Kushwaha et al., 2019). Em *Vigna radiata*, verificou-se que o tratamento com AIB promoveu um aumento das concentrações endógenas de  $H_2O_2$ , indicando que a auxina pode potenciar o enraizamento por intermédio de uma via de sinalização que envolve o  $H_2O_2$  (Li et al., 2009a). A interação entre o  $H_2O_2$  e a auxina surge reportada em diversos trabalhos envolvendo espécies lenhosas e herbáceas, tais como a oliveira, o feijão e o pepino (Sebastiani et al., 2004; Zilkah et al., 2006; Liao et al., 2010). Em *Berberis thunbergii* var. *atropurpurea* Tehranifar et al. (2014) comprovaram que a aplicação de  $H_2O_2$  em combinação com auxina AIB resultava igualmente num aumento da taxa de enraizamento, corroborando assim os trabalhos prévios onde a interação entre o  $H_2O_2$  e a auxina já tinha sido associada ao sucesso do EA.

#### 2.4.2. Ião cálcio ( $Ca^{2+}$ ) – mensageiro secundário na resposta ao stress

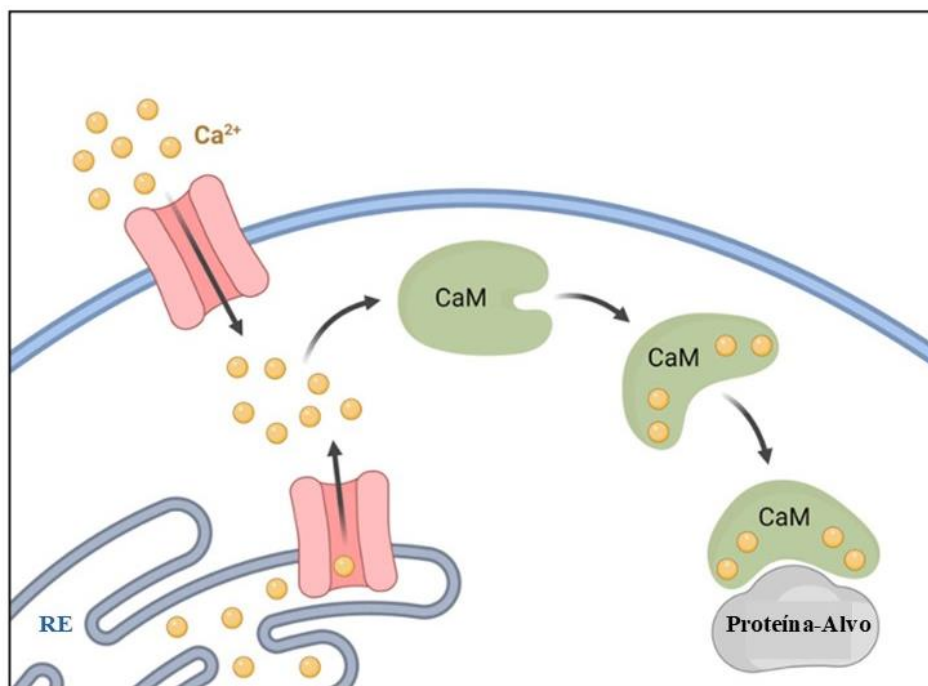
As plantas desenvolveram diversos mecanismos moleculares de defesa a estímulos ambientais, de entre os quais o  $Ca^{2+}$  se apresenta como mensageiro secundário na transdução de sinal a nível celular (Gilroy & Trewavas, 2001; Sanders et al., 2002; Harper et al., 2005; Vandelle et al., 2018), essencial na mediação das respostas fisiológicas das plantas (Besson-Bard et al., 2008; Dodd et al., 2010). Vários trabalhos reportam alterações na concentração de  $Ca^{2+}$  livre no citoplasma em resposta a diferentes estímulos de natureza abiótica e biótica, incluindo choque térmico (Gong et al., 1998), baixas temperaturas (Knight et al., 1991), radiação UV (Frohnmeier et al., 1999), ataque por agentes patogénicos (Blume et al., 2000), stress oxidativo (Price et al., 1994), salinidade, anoxia (Bush, 1996) e exposição ao ácido abscísico (ABA) (Schroeder et al., 2001).

Perante situações de stress, a resposta inicial das células vegetais consiste num aumento transiente da concentração de  $Ca^{2+}$  no citoplasma, conhecido como "oscilação de cálcio" ou "*calcium transients*" (Blume et al., 2000). Estas oscilações são percecionadas por proteínas sensoras, frequentemente dotadas de domínios *EF-Hand* (estrutura *helix-loop-helix*), que após ligação ao  $Ca^{2+}$  desencadeiam cascatas de sinalização (Sanders et al., 2002). Entre estas proteínas destacam-se as calmodulinas

(CaM), as proteínas semelhantes a calmodulinas (CMLs), as quinases dependentes de cálcio (CDPKs/CPKs) e as proteínas *Calcineurin B-like* (CBL), que apesar da ativação pela ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  requerem a interação com proteínas-alvo para efetivar a transdução de sinal (Liu et al., 2022; Reddy et al., 2011).

As CaM constituem uma família de proteínas sinalizadoras extremamente conservadas e muito comuns em organismos eucariotas (AL-Quraan et al., 2010). Estas proteínas apresentam uma estrutura típica constituída por 149 aminoácidos e contêm quatro *EF-Hand Motifs* (cada um com capacidade para ligar um íon  $\text{Ca}^{2+}$ ) que se agrupam aos pares constituindo dois domínios *EF-Hand* posicionados em extremidades opostas da proteína (Williams, 1999; McCormack et al., 2005). A ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  às CaMs provoca alterações na sua conformação ativando-as funcionalmente, o que consequentemente permitirá que atuem como reguladoras de proteínas-alvo (Figura 14) envolvidas em diversos processos biológicos, como o crescimento, o desenvolvimento e respostas a fatores de *stress* (Shi & Du, 2020; Zeng et al., 2015). As CMLs, por sua vez, apresentam uma estrutura semelhante às CaMs mas com variações ao nível do número de *EF-Hand Motifs* (normalmente entre 1 e 6) e na capacidade de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , uma vez que nem todos são funcionais (McCormack et al., 2005; Ranty et al., 2016; Mohanta et al., 2017).

A caracterização das CaM tem sido realizada em diferentes espécies vegetais. Em *A. thaliana* foram identificadas 7 CaM e 50 CML (McCormack et al., 2005); em *Oryza sativa*, 5 CaM e 32 CML (Boonburapong & Buaboocha, 2007); 6 CaM e 144 CML em *Glycine max* (Zeng, H. et al., 2017); 3 CaM e 62 CML em *Vitis vinifera* (Vandelle et al., 2018); 6 CaM e 30 CML em *Gossypium raimondii* (Mohanta et al., 2017) e 7 CaM e 55 CML em *Nicotiana benthamiana* (Zhao et al., 2013).



**Figura 14-** Representação esquemática da ligação do íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) às calmodulinas (CaM) através dos quatro *EF-Hand Motifs*. A ligação de um total de quatro íons de  $\text{Ca}^{2+}$  às CaMs provoca alterações conformacionais nestas proteínas alterando-as funcionalmente, o que permite a sua posterior associação a proteínas alvo envolvidas na transdução destes sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro da célula e consequente regulação de diversos processos biológicos. RE: Retículo Endoplasmático. Adaptado de Beghi et al. (2022).

As funções atribuídas às CaM e CML nas vias de sinalização mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  durante o desenvolvimento e em contextos de *stress* são amplamente diversificadas (Liu et al., 2022). Em *Arabidopsis*, a proteína AtCaM3 regula a atividade de enzimas como a fosfatase AtPP7 ou a quinase AtCBK3, promovendo a tolerância ao calor (Zhang, W. et al., 2009; Zhou et al., 2009). Entre as múltiplas funções atribuídas à família das calmodulinas (CaM), destaca-se o seu envolvimento na regulação do processo de formação de raízes adventícias (Roussos, 2023). Um dos primeiros estudos a demonstrar esta relação foi desenvolvido por Muto e Hirose (1987), utilizando *Tradescantia fluminensis* como organismo modelo. Os autores evidenciaram que tanto as CaM como o íon  $\text{Ca}^{2+}$  desempenhavam um papel essencial na indução deste processo morfogénico. A aplicação de inibidores específicos das CaM, como a trifluoperazina (TFP), o composto 48/80 e o calmidazolium, resultou na completa inibição do EA. De igual modo, o tratamento com antagonistas do  $\text{Ca}^{2+}$ , como o A23187 e o lantânio ( $\text{La}^{3+}$ ) provocou a inibição total do processo de EA (dos Remedios, 1981). Curiosamente, a aplicação

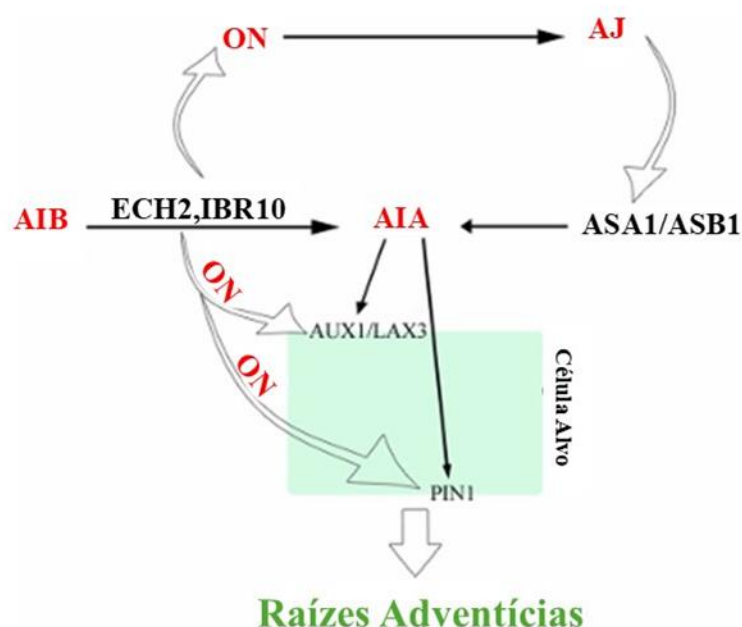
exógena de  $\text{Ca}^{2+}$  não apresentou efeito indutor do enraizamento, sugerindo que os níveis endógenos de cálcio intracelular seriam suficientes para suportar o processo de diferenciação radicular. Em todos os casos, a remoção dos inibidores mediante lavagem com água destilada reverteu o bloqueio, indicando a natureza reversível da inibição. A participação das CaM nos eventos de divisão e diferenciação celular está de acordo com diversos estudos que demonstram o seu envolvimento nos processos mitóticos e citocinéticos em células vegetais. Muto e Hirosawa (1987) relataram a associação das CaM com o fuso mitótico e com a formação do fragmoplasto durante a citocinese. Em células do endosperma de *Haemanthus*, as CaM foram localizadas na ligação entre os cinetocoros e os microtúbulos durante a mitose, reforçando o seu papel na regulação da dinâmica do citoesqueleto durante a multiplicação celular (Vantard et al., 1985).

## 2.5. Reguladores de Crescimento – O Papel das Auxinas na Indução do Enraizamento Adventício (EA)

### 2.5.1. Ácido indol-3-butírico e ácido indol-3-acético

Para induzir o processo de formação de raízes adventícias, a base das plântulas é frequentemente tratada com diferentes concentrações de auxina, naturais ou sintéticas (Winkelmann, 2013) (tal como mencionado previamente no ponto 2.3.1.2 – Tipo e concentração dos reguladores de crescimento). O AIB é a auxina mais utilizada em protocolos de indução de EA devido à sua elevada eficácia comparativamente a outras auxinas, como o AIA, o que se deve, em grande parte, à sua maior estabilidade à luz (Pacurar et al., 2014). No entanto o AIA é a auxina natural mais abundante nas plantas e fisiologicamente relevante, estando envolvida em inúmeros processos de crescimento e desenvolvimento, como o alongamento celular, a regulação da dominância apical, a diferenciação do tecido vascular, o desenvolvimento dos frutos, assim como a formação de raízes laterais e adventícias (Taiz & Zeiger, 2010; Flasiński & Hąc-Wydro, 2014; Porfírio et al., 2016c). Apesar de ser a auxina mais utilizada na indução do EA, o AIB é convertido metabolicamente em AIA, sendo a sua atividade biológica dependente desta conversão (Kurepin et al., 2011). Fattorini et al. (2017) demonstraram esta dependência seguindo uma abordagem mutagénica em enzimas responsáveis pela conversão do AIB em AIA em *A. thaliana*. A indução dessas mutações resultou numa redução da taxa de EA, evidenciando a importância da conversão do AIB em AIA (Figura 15).





**Figura 15-** Modelo representativo da atuação de ácido indol-3-butírico (AIB) exógeno na formação de raízes adventícias em *Arabidopsis*. Durante a conversão de AIB em ácido indol-3-acético (AIA) ocorre a produção de óxido nítrico (ON) pelas enzimas que catalisam a conversão do AIB, tais como, *enoyl-CoA hydratase2* (ECH2) e *enoyl-CoA hydratase* (IBR10), promovendo a síntese de ácido jasmônico (AJ), que irá induzir a atividade das enzimas *WEAK ETHYLENE-INSENSITIVE2/ANTHRANILATO SINTASE alfa1* (ASA1) e *WEI7/ANTHRANILATO SINTASE beta1* (ASB1). O AIA proveniente da conversão do AIB e biossíntese *de novo*, realizada pelas enzimas codificadas pelas enzimas ASA1 e ASB1, é transportado até às células-alvo pelos transportadores de efluxo *PIN FORMED1* (PIN1) e de influxo *AUXIN RESISTANT1* (AUX1) e *LIKE AUXIN RESISTANT3* (LAX3). O ON pode influenciar positivamente os PIN1 e AUX1 aumentando o transporte endógeno de AIA para a formação de raízes adventícias. Adaptado de Fattorini et al. (2017).

A conversão de AIB em AIA é assegurada pelas enzimas *enoyl-CoA hydratase2* (ECH2) e *enoyl-CoA hydratase* (IBR10) (Strader et al., 2011). A ação destas enzimas de  $\beta$ -oxidação peroxissomal, provoca a síntese de ON peroxissomal, que funcionará essencialmente como mensageiro do AIB no processo de EA (Schlicht et al., 2013). A síntese de ON irá induzir a biossíntese de AJ que por sua vez ativa os genes envolvidos na biossíntese de AIA, *WEAK ETHYLENE-INSENSITIVE2/ANTHRANILATO SINTASE alfa1* (ASA1) *WEI7/ANTHRANILATO SINTASE beta1* (ASB1) (Stepanova et al, 2005). Deste modo, os níveis de AIA proveniente da conversão do AIB, e da sua biossíntese *de novo* pelas enzimas ASA1 e ASB1, irão aumentar os níveis de AIA endógeno necessário

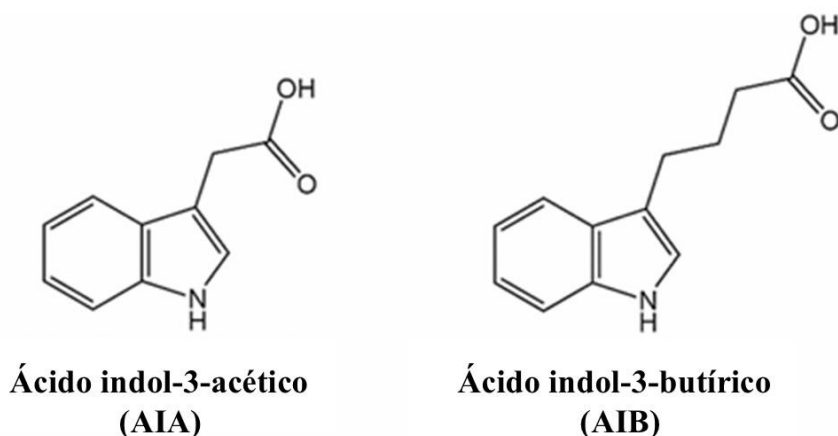
para o processo de EA (Fattorini et al., 2017). O AIA é transportado até às células-alvo responsáveis pelo processo de formação de raízes através dos transportadores de efluxo *PIN FORMED 1* (PIN1) e de influxo, como o *AUXIN RESISTANT1* (AUX1) e *LIKE AUXIN RESISTANT3* (LAX3) (Della Rovere et al., 2015; 2016), cuja atividade é também regulada pelo ON, aumentando o transporte endógeno de AIA, necessário para o EA (Fan et al., 2014; Fattorini et al., 2017). A descrição mais aprimorada relativamente ao metabolismo de AIB e transportadores de AIA encontra-se descrita no ponto 2.5.2.

Tal como descrito anteriormente (ponto 2.3), o processo de EA é caracterizado por uma sequência de fases fisiológicas associadas à reaquisição da competência meristemática e subsequente diferenciação *de novo* de um novo órgão (Berthon et al., 1990; De Klerk & Ter Brugge, 1992), sendo essas fases fortemente influenciadas pelas variações nos níveis endógenos de auxina, em particularmente do AIA (Berthon et al., 1989; Hausman, 1993; Simon & Petrásek, 2011). De acordo com Blakesley (1994) e Gaspar et al. (1994), durante a fase de indução, anterior a qualquer alteração visível a nível histológico, ocorre um aumento nos níveis de auxina endógena, seguido posteriormente por uma redução significativa durante a fase de iniciação, caracterizada por intensas divisões e diferenciação celular. Posteriormente, na fase de expressão radicular, correspondente ao crescimento e emergência dos primórdios radiculares, verifica-se novamente um aumento dos níveis de auxina.

Heloir et al. (1996) confirmaram esta dinâmica ao observar que plântulas de noqueira (*Juglans regia*), estabelecidas em meio de cultura suplementado com AIB apresentaram um aumento nos níveis endógenos de AIA, atingindo um pico às 60 horas após estabelecimento em meio de indução. Em contraste, plântulas mantidas em meio controlo (sem auxina exógena) não apresentaram variações significativas nos níveis de AIA, nem evidências de enraizamento. Após a transferência para meio de expressão, isento de auxinas exógenas, os níveis de AIA diminuíram gradualmente ao longo de quatro dias, mantendo-se em valores reduzidos, o que corrobora a hipótese de regulação faseada da concentração hormonal durante o processo de enraizamento.

### 2.5.2. Metabolismo e transporte do ácido indol-3-acético

A forma como o AIB contribui para a manutenção dos níveis gerais de auxina na planta são diferentes entre espécies e até mesmo entre genótipos dentro da mesma espécie, levantando a hipótese da existência de diferentes vias metabólicas do AIB (Ludwig-Müller & Epstein, 1991; Ludwig-Müller et al., 1993). O AIB é estruturalmente semelhante ao AIA, exceto pela cadeia lateral, em que, AIA possui dois carbonos e AIB possui quatro carbonos (Damodaran & Strader, 2019) (Figura 16).



**Figura 16** – Representação das diferenças estruturais nas cadeias laterais em ácido indol-3-acético (AIA) e ácido indole-3-butírico (AIB). Cadeia lateral de AIB constituída por quatro carbonos e cadeia lateral de AIA constituída por dois carbonos. Adaptado de Frick & Strader (2018).

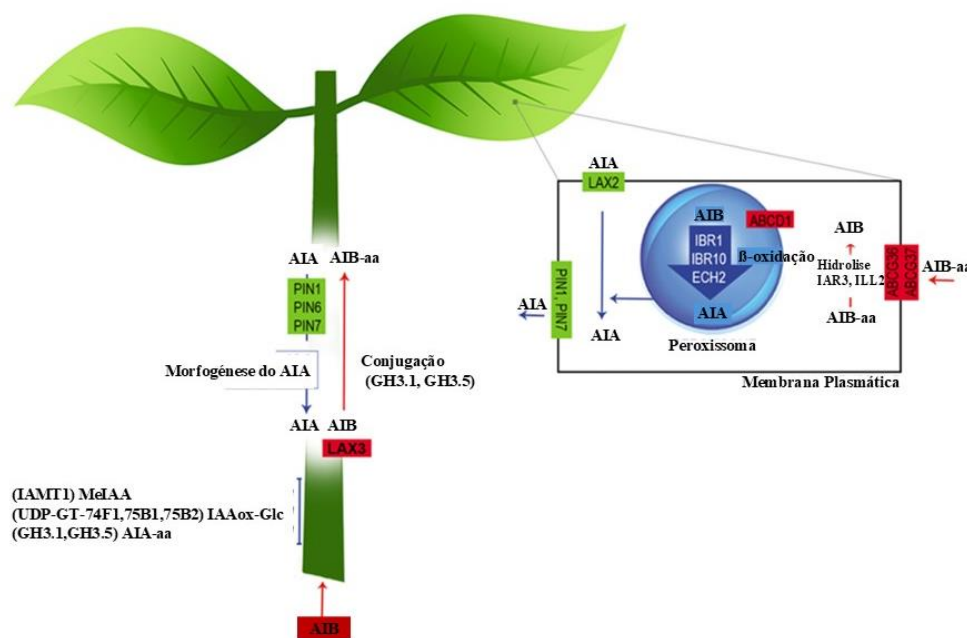
O facto do AIB possuir uma cadeia lateral mais alongada que a cadeia lateral de AIA, é dificultada a sua ligação ao complexo de proteínas coreceptor de auxina *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN-Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID* (TIR1/AFB-Aux/IAA) (Lavy & Estelle, 2016; Uzunova et al., 2016), um complexo proteico amplamente conhecido pela sua ligação ao AIA para regulação da expressão de genes mediados por auxinas (Tan et al., 2007; Calderon et al., 2012). Por este motivo, os efeitos fisiológicos resultantes do tratamento com AIB são causados mais provavelmente por AIA após a conversão do AIB e não pela molécula de AIB em si (Damodaran & Strader, 2019). O AIB é convertido em AIA através da redução da sua cadeia lateral de carbono num processo que decorre no peroxissoma pela  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos (Zolman et al., 2000; Strader et al., 2010). As enzimas específicas que participam no processo de catalisação da conversão de AIB

no peroxissoma são a *dehydrogenase/reductase indole-3-butyric acid response 1* (IBR1) (Zolman et al., 2007), a *acyl-coA dehydrogenase/oxidase-like* (IBR3) (Zolman et al., 2007), a IBR10 (Zolman et al., 2008) e a ECH2 (Strader et al., 2011) (Figura 17). Também as enzimas *3-ketoacyl CoA thiolase* (PED1) (Zolman et al., 2000) e a Alquil-CoA oxidase (ACX) (Adham et al., 2005) conseguem converter o AIB em AIA apesar de não serem específicas.

A hipótese do transporte do AIB a longa distância foi inicialmente sugerida por Zimmerman & Wilcoxon (1935) ao verificarem que a aplicação localizada de AIB estava associada à indução de respostas morfogênicas em regiões distais da planta. No entanto, investigações subsequentes demonstraram que o movimento do AIB pode ocorrer sob a forma da própria molécula ou através de compostos derivados, como AIB conjugado ou AIA resultante da conversão metabólica do AIB (Damodaran & Strader, 2019).

A distribuição espacial do AIA é rigorosamente regulada por transportadores específicos localizados na célula (Damodaran & Strader, 2019) que incluem proteínas de influxo e de efluxo (Vieten et al., 2007; Peer et al., 2011). Entre os principais transportadores de AIA destacam-se os pertencentes às famílias AUX/LAX, reconhecidos como mediadores do influxo de AIA (Frick & Strader, 2018) e as proteínas PIN e ABCG (classe de transportadores ABC do tipo P-glicoproteína) que atuam entre si para facilitar o efluxo polar de AIA (Vieten et al., 2007; Petrášek & Friml, 2009).

Dado que o AIB apresenta uma estrutura molecular semelhante à do AIA, permanece incerto se os mesmos transportadores são capazes de o reconhecer e transportar (Damodaran & Strader, 2019). A evidência atual sugere que o AIB não possui afinidade com o transportador AUX1, embora possa ser substrato de outras proteínas da mesma família (Damodaran & Strader, 2019). Em contraste, as proteínas LAX3 demonstram compatibilidade tanto com AIB como com AIA, atuando como transportadores para ambos (Swarup et al., 2008; Damodaran & Strader, 2019). Quanto ao efluxo, foi demonstrado que os mecanismos de transporte de AIB diferem dos do AIA, uma vez que a utilização de inibidores do transporte polar de auxinas resultou no bloqueio do movimento do AIA mas não afetou significativamente o transporte de AIB (Rashotte et al., 2003; Liu et al., 2012; Damodaran & Strader, 2019).



**Figura 17-** Modelo representativo do metabolismo e transporte de ácido indol-3-butírico (AIB) e ácido indol-3-acético (AIA) em *Eucalyptus nitens* durante a fase de indução da formação de raízes adventícias. O AIB exógeno é absorvido pelo caule e conjugado com aminoácidos pelas proteínas da família GRETCHEN HAGEN 3 (GH3) sendo seguidamente transportado pela enzima *LIKE AUXIN RESISTANT3* (LAX3) até às folhas, ativando assim a expressão dos genes *ABCG36*, *ABCG37* e *ABCD1*, que facilitam a entrada do AIB no peroxissoma onde este é convertido em AIA por β-oxidação, com auxílio das enzimas *dehydrogenase/reductase indole-3-butyric acid response 1* (IBR1), *enoyl-CoA hydratase* (IBR10) e *enoyl-CoA hydratase2* (ECH2). Ainda de forma a manter a homeostase dos níveis de AIB, são desencadeados dois mecanismos, o primeiro derivado das proteínas GH3, tais como, GH3.1 e GH3.5, que promovem a conjugação de AIB com aminoácidos e o segundo realizados pelas enzimas como IAA-alanina hidrolase (IAR3) e IAA-aminoácido hidrolase (ILL2), que atuam nas folhas e hidrolisam essas conjugações, libertando AIB livre. Ainda ao nível da folha, transportadores de influxo de AIA, como o *LIKE AUXIN RESISTANT2* (LAX2), transportam o AIA das folhas para o floema. Simultaneamente a este processo, membros da família *PIN FORMED* (PIN) transportam o AIA até ao local de rizogénese. De forma a regular o excesso dos níveis de AIA, as enzimas uridina difosfato-glucosiltransferases (UDP-GT75B1, UDP-GT74F1, UDP-GT75B2) conjugam o AIA com glicose (formando IAAox-Glc), ou a enzima IAA carboxil metiltransferase 1 (IAMT1) converte o AIA excedente em éster metílico (formando MeIAA). Adaptado de Frick & Strader (2018).

De forma integrada, Ayala et al. (2022) propuseram um modelo para o metabolismo e transporte de AIB e AIA durante a formação de raízes adventícias em *Eucalyptus nitens*. Neste modelo, o AIB é inicialmente absorvido na base do caule (zona do corte onde se irão desenvolver as raízes adventícias) e subsequentemente conjugado com aminoácidos via ação de proteínas da família GRETCHEN HAGEN 3 (GH3), sendo então transportado pela enzima LAX3 em direção às folhas. Este processo biológico induz a expressão de genes que codificam proteínas de efluxo ao nível da folha, nomeadamente *ABCG36* e *ABCG37*, bem como o gene *ABCD1*, que facilita a entrada do AIB nos peroxissomas, onde ocorre a  $\beta$ -oxidação e a conversão do AIB em AIA, mediada pelas enzimas IBR1, IBR10 e ECH2.

A conjugação de AIB com aminoácidos realizada pelas proteínas GH3 permitem não só o transporte de AIB mas também a regulação da homeostase dos níveis endógenos de AIB (Staswick et al., 2005; Hayashi et al., 2021). Em *E. nitens* verificou-se a sobreexpressão, em particular dos genes *GH3.1* e a *GH3.5*, que codificam proteínas que catalisam a conjugação de AIB com aminoácidos, quer nas folhas, quer na base do caule, regulando assim os níveis de AIB livre permitindo que seja armazenado na forma de conjugados e seja reativo apenas quando necessário (Ayala et al., 2022). Em contrapartida, enzimas como a IAA-alanina hidrolase (IAR3) e a IAA-aminoácido hidrolase (ILL2), ativas nas folhas, são responsáveis pela hidrólise dessas conjugações, libertando AIB livre, sugerindo que o AIB possa ser armazenado também na sua forma livre (Frick & Strader, 2018; Ayala et al., 2022).

Assim como descrito anteriormente, sabe-se que o transporte e distribuição de AIA através de transportadores específicos até ao seu local de atuação são um fator importante para o sucesso da indução da formação de raízes adventícias (Sukumar et al., 2013; Matthes et al., 2019). Em *E. nitens*, foi observado um aumento da expressão de transportadores de influxo de AIA extracelular nas folhas, como o LAX2, permitindo a posterior translocação do AIA via floema até à base do caule, onde atuará na indução da formação dos campos morfogénicos, posterior diferenciação celular e subsequente processo de organogénese com formação dos primórdios radiculares. Durante este processo verifica-se a expressão diferencial de membros da família PIN, com uma sobreexpressão visível em membros das subfamílias PIN1 e PIN7 nas folhas e base do caule, o que sugere que o transporte de AIA para fora destas regiões é mais intenso de modo a dirigir o fluxo de AIA até ao local de rizogénese, enquanto PIN6 se encontrava

especificamente na zona de enraizamento, orientando os restantes transportadores de efluxo para a região onde AIA é mais necessário (Ayala et al., 2022).

Resultante da conversão de AIB em AIA, o excedente AIA pode ser oxidado pela ação das enzimas *DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION* (DAO) (Hayashi et al., 2021). Apesar de descrito em *Arabidopsis*, em *E. nitens* a oxidação de AIA pelas enzimas DAO não se verificou, o que poderá sugerir que a oxidação do AIA não é a principal via de homeostase dos níveis de AIA. Ainda assim, foi possível verificar que as enzimas uridina difosfato-glucosiltransferases (UDP-GT75B1, UDP-GT74F1, UDP-GT75B2), terão conjugado AIA com glicose (formando IAAox-Glc), diminuindo os níveis de AIA oxidado, sendo a expressão de UDP-GT75B1 e UDP-GT75B2 detetada nas folhas e na base do caule, enquanto UDP-GT74F1 na zona de enraizamento (Ayala et al., 2022).

Caso os níveis de AIA se mantenham elevados, pode também ser desencadeado um mecanismo que permite a sua redução através da conversão em éster metílico (formando MeIAA), reação que é catalisada pela enzima IAA carboxil metiltransferase 1 (IAMT1), processo este observado no caule e folhas de *Arabidopsis* (Yang et al., 2008, Ayala et al., 2022) (Figura 17).



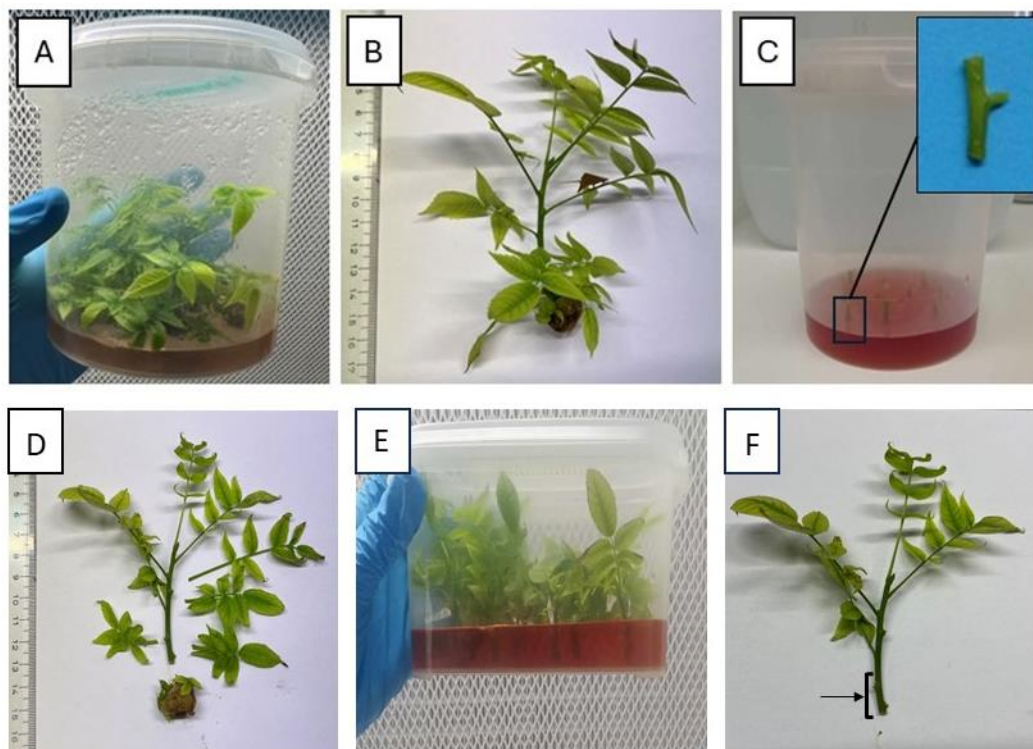
### 3. Materiais e Métodos



### 3.1. Obtenção do Material Vegetal para Estabelecimento dos Ensaios de Enraizamento – Multiplicação Vegetativa por Cultura de Microestacas

Para o estabelecimento dos ensaios de enraizamento foram considerados dois genótipos de *Juglans* com diferentes comportamentos ao estímulo do EA, a cv. ‘Chandler’ (*J. regia* L.) conhecida pela sua recalcitrância (com taxas de enraizamento raramente superiores a 61%) e o híbrido ‘Paradox’ (*J. regia* x *J. hindsii*) cl. ‘Vlach’ descrito como sendo um genótipo de fácil enraizamento (com taxas de enraizamento de aproximadamente 80%) (Pei et al., 2007, Peixe et al., 2015). Os dois genótipos já se encontravam estabelecidos em condições *in vitro* (Laboratório Melhoramento e Biotecnologia e Vegetal - Universidade de Évora) (Figura 18 A, B), tendo sido necessário proceder à sua multiplicação de modo a obter o número de plântulas necessário ao estabelecimento dos ensaios de enraizamento.

A multiplicação vegetativa das plantas dos dois genótipos de *Juglans* foi realizada em câmaras de fluxo laminar, em condições de total assepsia, de forma a garantir a inexistência de contaminações. De forma resumida, foram obtidos, das plântulas mantidas em condições *in vitro*, segmentos de caule de aproximadamente 1 cm de comprimento e apresentando 1 a 2 gemas axilares. Estas microestacas foram estabelecidas na posição vertical em caixas de polipropileno SacO2® modelo O118/120 + OD118 (Figura 18-C) contendo aproximadamente 80 mL de meio de multiplicação DKW - Driver & Kuniyukki Walnut (Driver & Kuniyuki, 1984) [1,5× micronutrientes, 200 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-BAP e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de AIB], gelificado por adição de Gellan Gum® (2,5 g L<sup>-1</sup>). O pH do meio foi ajustado a 5,5 previamente ao processo de esterilização, o qual decorreu a 121°C e 1 bar de pressão durante 20 min.

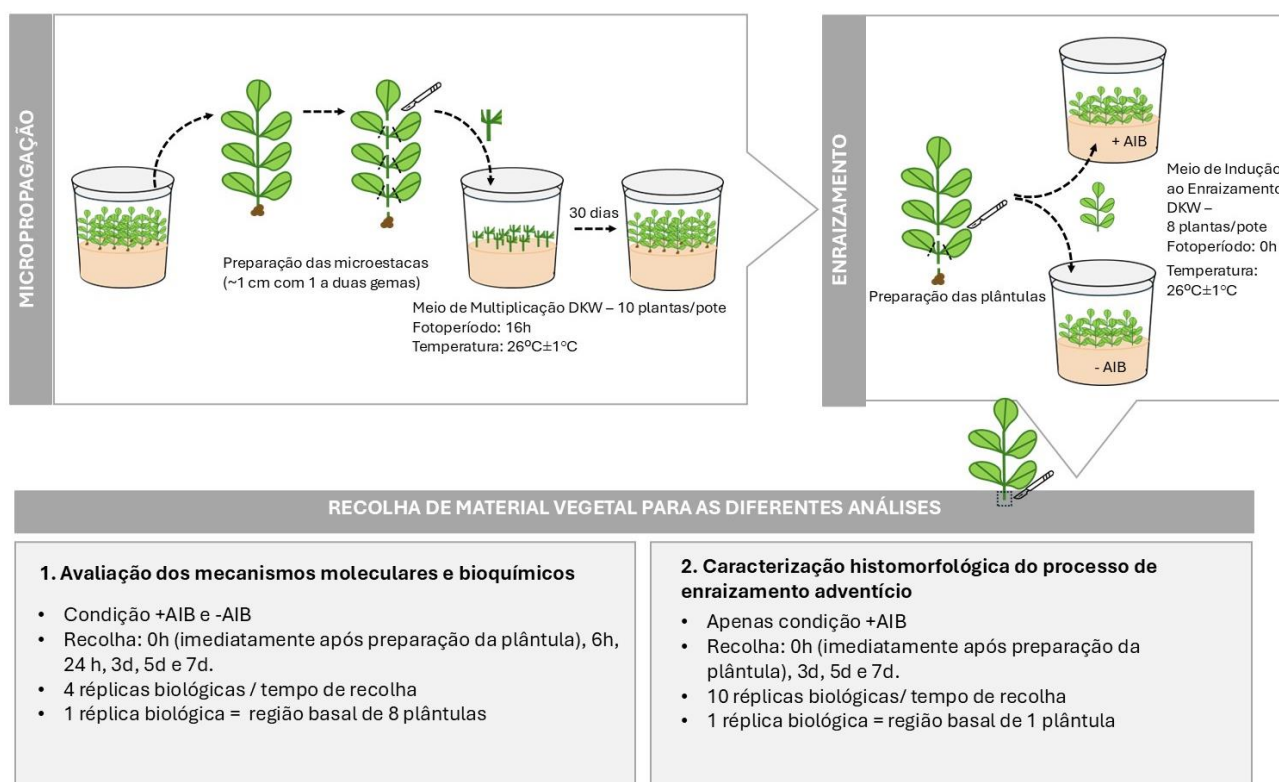


**Figura 18** - Representação das diferentes etapas que caracterizaram o estabelecimento dos ensaios de enraizamento e recolha de material vegetal. (A,B) Plântulas previamente estabelecidas em cultura *in vitro*, (C) Multiplicação por cultura de segmentos caulinares com uma gema axilar (microestacas), (D) Preparação das plântulas para estabelecimento dos ensaios de enraizamento, (E) Estabelecimento das plântulas em meio de indução de enraizamento, (F) Plântula após a fase de indução onde é indicada a região recolhida para os estudos moleculares, bioquímicos e caracterização histomorfológica do processo de enraizamento adventício (EA).

No total foram estabelecidas 400 microestacas de cada genótipo (40 caixas por genótipo, cada caixa apresentando 10 microestacas). A propagação das plântulas por cultura de microestacas permitiu obter o material vegetal necessário para estabelecimento dos diferentes ensaios de enraizamento. As culturas foram mantidas numa câmara de cultura (Aralab, Fitoclima 4600) com condições controladas de temperatura ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), fotoperíodo (16 horas) e intensidade luminosa ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante um período de 30 dias.

### 3.2. Estabelecimento dos Ensaios de Enraizamento e Recolha de Material Vegetal

Para o estabelecimento dos ensaios de EA as plântulas provenientes da fase de multiplicação foram preparadas retirando o *callus* formado na região basal e as folhas mais basais, mantendo entre 3 e 4 folhas apicais (Figura 18-D). Estas plântulas foram inoculadas em caixas de polipropileno, SacO2® modelo OV80 + OVD80 contendo aproximadamente 100 mL de meio de enraizamento DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) com 1/2 macronutrientes, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada (Figura 18-E).



**Figura 19** - Esquema representativo do procedimento experimental incluindo uma primeira fase de multiplicação do material vegetal para obtenção de plântulas suficientes para o estabelecimento dos ensaios de enraizamento, o estabelecimento dos ensaios de enraizamento para recolha de material utilizado nas diferentes análises (moleculares, bioquímicas e histológicas).

Como agente gelificante foi utilizado o Gellan Gum® (2,5 g. L<sup>-1</sup>), adicionado ao meio após ajuste do pH a 5,5. As condições de esterilização do meio de cultura foram as descritas no ponto anterior. As culturas permaneceram numa câmara de

cultura (Aralab, Fitoclima 4600) com condições controladas de temperatura ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (0h).

Foram estabelecidos dois ensaios de EA considerando dois objetivos distintos os quais são descritos abaixo nos pontos 3.2.1 e 3.2.2 e esquematizados na Figura 19.

### 3.2.1. Avaliação dos mecanismos moleculares e bioquímicos

Para os estudos moleculares (análise da expressão génica) e bioquímicos (expressão enzimática e determinação das ROS) foram consideradas duas condições, uma correspondendo ao meio de cultura onde foi adicionada a auxina AIB como agente indutor do EA ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) (meio de indução) e uma correspondente ao meio de igual composição base diferindo apenas do meio de indução por não apresentar a auxina AIB na sua composição (meio controlo). Foram consideradas por genótipo um total de 44 caixas (8 plântulas por caixa), sendo 24 caixas com meio controlo (sem AIB) e 20 caixas com meio de indução (com AIB).

As amostras foram recolhidas ao longo do período de indução e início da fase de expressão num total de seis tempos de recolha – 0h (imediatamente após preparação da plântula, previamente à inoculação no meio de indução do enraizamento), 6h, 24h, 3d, 5d e 7d após estabelecimento em meio de cultura (com AIB e sem AIB). Por cada tempo de recolha foram consideradas quatro réplicas biológicas, correspondendo cada réplica aos segmentos ( $\sim 1 \text{ cm}$ ) obtidos da região basal do caule de oito plântulas (cada caixa correspondeu a uma réplica biológica) (Figura 18-F). O material vegetal correspondente a cada réplica biológica foi recolhido para tubos estéreis de 2 mL, imediatamente congelado em azoto líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ao seu posterior processamento. A continuação do respetivo procedimento experimental encontra-se descrito nos pontos 3.3 e 3.4.

### 3.2.2. Caracterização histomorfológica do processo de enraizamento adventício (EA)

Para os estudos histológicos foi apenas considerado o meio de cultura suplementado com agente indutor AIB. Foram consideradas 8 caixas, cada uma contendo 10 plântulas do híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’. As plântulas permaneceram nas condições acima descritas até à recolha do material vegetal que decorreu às 0h, 3d, 5d e 7d. A região basal das plântulas ( $\sim 1 \text{ cm}$ ) foi seccionada (Figura 18-F) e colocada numa solução de fixação [10 mL de formaldeído, 10 mL de ácido acético, 80 mL de

etanol (70%)] (F.A.A.) e armazenada a 4°C até subsequente processamento. A continuação do respetivo procedimento experimental encontra-se descrito no ponto 3.5.

### 3.3. Envolvimento das Calmodulinas no Enraizamento Adventício (EA)

#### 3.3.1. Identificação e caracterização dos genes das calmodulinas em *Juglans regia*

A identificação das sequências putativas das CaMs em *J. regia* foram realizadas através de uma análise BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*) na base de dados EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/index.html>) utilizando como referência as 7 sequências canónicas de CaMs descritas em *A. thaliana* (*AtCaMs*) (McCormack et al., 2005; TAIR, 2024) sendo a análise focada na base de dados do genoma de *J. regia*. As sequências identificadas como sendo sequências de CaM de *J. regia* (JrCaMs) foram utilizadas para uma análise BLASTp na base de dados NCBI (*National Center of Biotechnology Information*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) garantido tratar-se de JrCaMs. As sequências JrCaMs foram por fim utilizadas como referência para uma última análise BLASTp na base de dados EnsemblPlants garantindo a identificação de todas as sequências de *J. regia*.

De entre as várias sequências obtidas como putativas JrCaMs e para garantir não incluir nenhuma sequência *Calmodulin-like* (CMLs) devido à sua elevada similaridade, foi realizada uma matriz de identidade entre a sequência *AtCaM7* e as seis sequências de JrCaMs. Para esta análise foi utilizado o *software* BioEdit (versão 7.7.1; Alzohairy, 2011).

Numa tentativa de classificar as JrCaMs seguindo a nomenclatura utilizadas em outras espécies foi realizada uma análise filogenética considerando 40 sequências de CaM de 5 espécies de plantas pertencentes à classe *Magnoliopsida* (*Malus domestica*, *Solanum pennellii*, *Castanea dentata*, *O. europaea*. e *A. thaliana*). Para construção da árvore filogenética foi realizado um alinhamento no MUSCLE do *software* MEGA11 (versão 11; Tamura et al., 2021) seguindo o método *Neighbor-Joining*, com o valor de *bootstrap* de 1000 réplicas. Para visualização gráfica da árvore filogenética foi utilizado o *software* iTOL versão 6 (*Interactive Tree Of Life*, versão 6, <https://itol.embl.de/>, Letunic & Bork, 2024).

Para análise de parâmetros relacionados com as sequências proteicas foi utilizado o programa ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>, Gasteiger et al., 2005) permitindo a determinação do ponto isoelétrico (pI), peso molecular e percentagem em metioninas (%M).

A previsão da localização subcelular das JrCaMs foi obtida por análise das sequências proteicas no programa WoLFPSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>, Horton et al., 2007).

Para identificação dos quatro *EF-Hand Motifs* envolvidos na ligação ao ião  $\text{Ca}^{2+}$  (característicos das Calmodulinas), foi realizado um alinhamento no CLC Main Workbench 11.0.1 (ClCbio, Aarhus N) considerando as sequências proteicas de JrCaMs e AtCaMs e as posições de cada um destes *Motifs* conservados descritas por Zhang et al. (2022). Para análise mais detalhada dos quatro *EF-Hand Motifs*, presentes nas sequências proteicas de JrCaMs, foi realizada uma análise BLASTp pelo programa UniProt (<https://www.uniprot.org/help/blast-submission>).

De modo a identificar potenciais interações entre as proteínas JrCaMs e outras proteínas potencialmente envolvidas no processo de EA foi utilizado o programa *Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING; versão 11; Szklarczyk et al., 2019; <https://string-db.org/>). A visualização da estrutura tridimensional das JrCaMs, foi realizada através do programa *Iterative Threading ASSEmbly Refinement* (I-TASSER) (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>; Zhou et al., 2022).

A estrutura dos genes *CaMs* de *A. thaliana* e *J. regia* foi obtida por comparação entre as sequências genómicas e as correspondentes sequências codificantes, limitadas a 5' pelo codão de iniciação (ATG) e a 3' pelo codão stop (ORF - *Open Reading Frame*), obtidas a partir das sequências transcritas (CDS – *CoDing Sequences*) disponíveis na base de dados EnsemblePlants (<https://plants.ensembl.org/index.html>). A representação gráfica da estrutura dos genes foi obtida no programa GSDS versão 2.0 (*Gene Structure Display Server*, <https://gsds.gao-lab.org/>, Hu et al., 2015) onde se associou uma árvore filogenética construída com as sequências das duas espécies seguindo o mesmo procedimento descrito acima.

As sequências codificantes dos genes de *JrCaMs* identificados no presente trabalho foram utilizadas para o desenho de *primers* específicos a utilizar na análise da expressão génica (procedimento descrito no ponto 3.3.3).

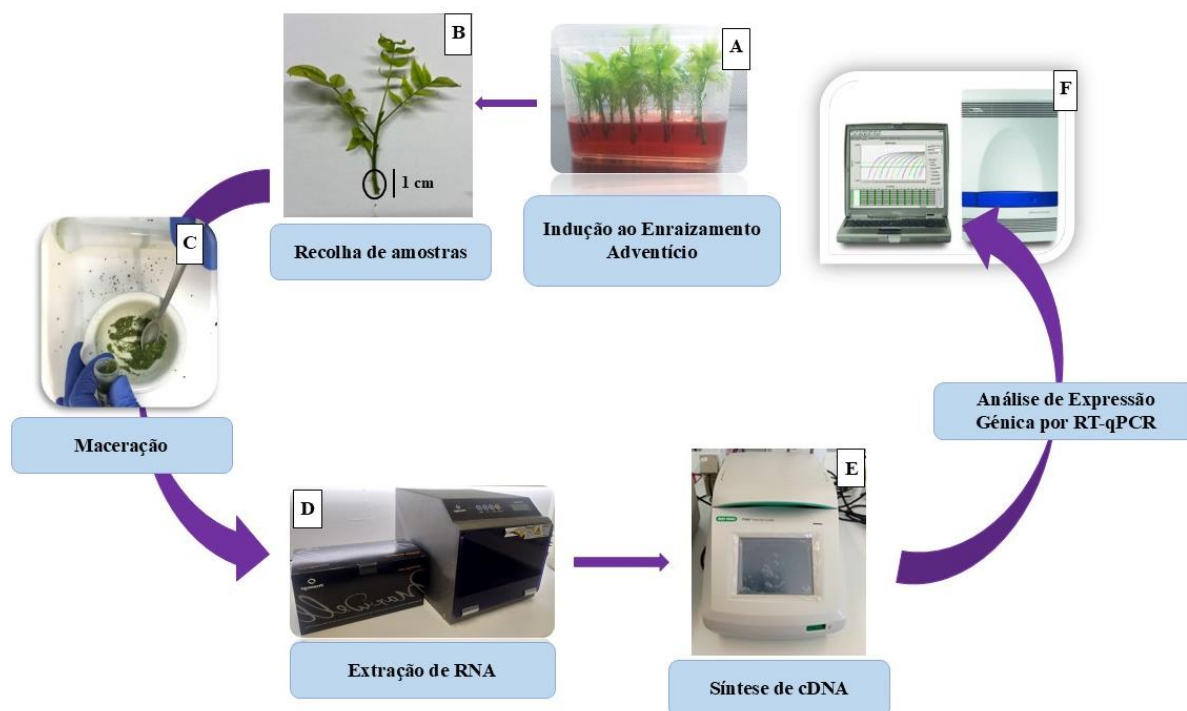
### 3.3.2. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a extração do RNA total, o material vegetal, recolhido nos diferentes tempos durante o ensaio de indução do EA (Figura 20 A e B), foi macerado em azoto líquido num almofariz com a ajuda de um pilão até à obtenção de um pó muito fino (Figura 20-C). Para o processo de extração foram utilizados aproximadamente 100 mg desse material vegetal macerado com recurso ao Maxwell 16 (Promega, Madison, EUA) utilizando o Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue kit (Promega, Madison, EUA) (Figura 20-D). As amostras extraídas foram eluídas num volume de 50  $\mu$ L de tampão de eluição. Durante o processo de extração de RNA cada amostra foi tratada com 5  $\mu$ L de DNase de forma a eliminar DNA genómico residual.

Para determinação da concentração e avaliação da pureza das amostras de RNA extraídas foi utilizado o espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (ThermoFisher Scientific, EUA). Como parâmetros de avaliação da pureza foram considerados os valores dos rácios das absorvâncias  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ , devendo os valores ser próximos de 2.0 para serem consideradas amostras puras (Thermo Scientific, 2009).

Para análise da integridade do RNA total foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (1.2% m/v, NZYTech MB02703) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) com a adição de 2  $\mu$ L de GreenSafe (NZYtech)/100 mL de agarose, permitindo a posterior visualização dos ácidos nucleicos sob luz UV. Por cada amostra foram considerados 5  $\mu$ L de RNA com 4  $\mu$ L de tampão de amostra (RNA Loading buffer, Thermo Scientific). Para controlo da migração das bandas em gel foi utilizado o marcador molecular NZYDNA Ladder VII (NZYtech). O resultado da eletroforese foi avaliado num Transiluminador UV (GENE FLASH Syngene Bio Imaging). As amostras extraídas foram conservadas a -80°C até à sua posterior utilização na síntese de cDNA.





**Figura 20** - Representação esquemática do procedimento experimental realizado para análise da expressão dos genes das Calmodulinas (*JrCaM*) associado ao processo de formação de raízes adventícias em *Juglans regia*.

Para a síntese de cDNA foram utilizados 0.5 µg de RNA total de cada amostra utilizando o Kit SensiFAST cDNA synthesis (Bioline) seguindo o protocolo descrito pelo fornecedor. O procedimento consistiu na preparação da mistura de reação comum a todas as amostras (incluindo o tampão de reação, a enzima e um volume de água comum a todas as amostras), sendo posteriormente adicionado por amostra o correspondente volume de RNA total e o restante volume de água para perfazer os 20 µL de reação. A reação de transcrição reversa (RT) decorreu no sistema BIO-RAD T100 (Figura 20-E) com o seguinte programa: 25°C durante 10 min para ligação dos *primers*, 42°C durante 15 min seguido de 48°C durante 15 min para a reação de transcrição reversa. Para inativação da enzima realizou-se um último passo a 85°C durante 5 min. As amostras de cDNA foram diluídas de 1:100, sendo o volume final dividido em alíquotas de 20 µL, posteriormente armazenadas a -20°C até realização das reações de RT-qPCR (Figura 20-F).



### 3.3.3. Estudo da expressão dos genes *JrCaM* por RT-qPCR (*Reverse Transcription quantitative PCR*)

#### 3.3.3.1. Seleção dos genes de referência

As sequências codificantes dos genes  *$\beta$ -Actin*, *Histone2B* e *Polyubiquitin*, *Ubiquitin-conjugating enzyme E2*, *Elongation Factor 1-alpha* e *E3 Ubiquitin-protein ligase SDIR1*, descritos na literatura como genes de referência no processo de EA de oliveira (Noceda et al., 2022), foram obtidas através de uma análise BLASTn na base de dados do genoma de *J. regia* (EnsemblPlants, disponível em <https://plants.ensembl.org/index.html>). As sequências identificadas como sendo as homólogas de *J. regia* (Tabela 2) foram utilizadas para análise BLASTn na base de dados NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), garantido tratar-se dos genes selecionados.

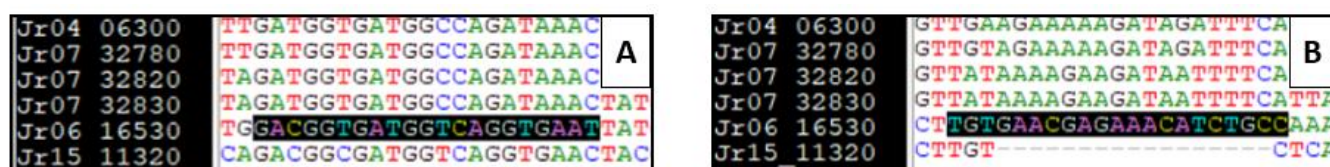
**Tabela 2** - Informação relativa aos genes selecionados como candidatos a genes de referência para a normalização dos resultados de expressão dos genes *JrCaM* durante o processo de formação de raízes adventícias em *Juglans regia*.

Gene	Abreviação	ID	Função
<i><math>\beta</math>-Actin</i>	<i>JrB-Actin</i>	<i>Jr10_10470</i>	Morfologia celular e manutenção do citoesqueleto
<i>Histone 2B</i>	<i>JrH2B</i>	<i>Jr14_11740</i>	Organização da Cromatina
<i>Polyubiquitin</i>	<i>JrPoliUBI</i>	<i>Jr03_10540</i>	Seleção de proteínas para degradação pelo proteassoma
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2</i>	<i>JrUBI-E2</i>	<i>Jr02_05000</i>	Modificação pós-traducional para regulação de degradação de proteínas
<i>Elongation factor1-alpha</i>	<i>JrEF1-alfa</i>	<i>Jr07_35160</i>	Alongamento de cadeias polipeptídicas durante a síntese proteica no ribossoma
<i>E3 ubiquitin-protein ligase SDIR1</i>	<i>JrSDIR1</i>	<i>Jr07_36870</i>	Modificação de proteínas-alvo

#### 3.3.3.2. Desenho de *primers* específicos

Para o desenho de *primers* específicos para as sequências dos genes candidatos a genes de referência e dos genes *JrCaM* utilizou-se o programa Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>; Untergasser et al., 2007) considerando em todos os casos as sequências codificantes.

Tendo em conta a similaridade entre as sequências de *JrCaM* foi efetuada uma matriz de modo a avaliar a dificuldade no desenho de *primers* específicos. Para realização desta matriz de similaridade foram alinhadas as seis sequências codificantes (CDS) de *JrCaM*, no ClustalW Multiple Alignment do programa BioEdit (versão 7.7.1; Alzohairy, 2011). A elevada similaridade entre duas das seis sequências codificantes de *JrCaMs* (*Jr04\_06300* e *Jr07\_32780*), impossibilitou o desenho de *primers* específicos para cada um destes dois genes, tornando necessário o desenho de *primers* que amplificassem simultaneamente ambos os genes. A especificidade dos *primers* foi avaliada utilizando o alinhamento previamente construído (Figura 21 A e B). Como complemento, foi ainda realizada uma análise no programa Primer-BLAST do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; Ye et al., 2012). Os *primers* desenhados (Tabela 3) foram sintetizados pela empresa STABVIDA Lda. (Caparica, Portugal).



**Figura 21** - Esquema demonstrativo da análise realizada durante o desenho dos *primers* específicos para os genes *JrCaM*. No alinhamento das seis sequências de *JrCaM* é realizada a posição dos *primers forward* (A) e *reverse* (B) para a sequência *Jr06\_16530*.

**Tabela 3** - Informação relativa aos *primers* selecionados como candidatos a genes de referência e genes de interesse (Calmodulinas - *JrCaM*) e alguns parâmetros relativos à análise RT-qPCR.

	Gene	ID	Primers (5'→3')	[nM]	Ta (°C)	TA (pb)	E(%) R <sup>2</sup>
Candidatos a genes de referência	<i>JrB-Actin</i>	<i>Jr10_10470</i>	Fw: TCTCTACGGAAATATCGTTCTCAGT Rev: CTTGGGGCAAGAGCAGTGAT	200	62	93	94,99 0,994
	<i>JrH2B</i>	<i>Jr14_11740</i>	Fw: CGGCCGAGAAGAAGCCTAAA Rev: ACGCTCTTCTTGGTACGCTT	200	62	94	90,92 0,998
	<i>JrPoliUBI</i>	<i>Jr03_10540</i>	Fw: GCAACTGGAGGATGGTCGC Rev: AGACGGAGGACAAGGTGAAG	500	64	75	93,78 0,997
	<i>JrUBI-E2</i>	<i>Jr02_05000</i>	Fw: TGAATTGCTGTGTACGTGTTG Rev: TGAAGCAAAGTCCACATGAACA	500	62	90	99,26 0,994
	<i>JrEF1-alfa</i>	<i>Jr07_35160</i>	Fw: CGGCCGGGTTCTATATTCAGTTT Rev: TGTGAACCTTTTCCTTGCCCA	500	62	71	101,44 0,996
	<i>JrSDIR1</i>	<i>Jr07_36870</i>	Fw: TGAGCGTTTCAAGGGTTAAGGA Rev: TGCCTCACAGAGCTGAACAA	500	62	88	100,69 0,964
<i>JrCaM</i>	<i>JrCaM1a</i>	<i>Jr04_06300</i>	Fw: ACTACGAGGAGTTTGTCAAGGT Rev: TGGTGGAGGCAAGATTGATT	500	61	56	95,4 0,999
	<i>JrCaM1b</i>	<i>Jr07_32780</i>	Fw: ACTACGAGGAGTTTGTCAAGGT Rev: TGGTGGAGGCAAGATTGATT	500	61	56	95,4 0,999
	<i>JrCaM2</i>	<i>Jr06_16530</i>	Fw: GACGGTGATGGTCAGGTGAAT Rev: TGTGAACGAGAAACATCTGCC	300	62	83	96,0 0,98
	<i>JrCaM3a</i>	<i>Jr07_32820</i>	Fw: TCCAAATTAAGATAGTCT Rev: CAAGATAAGATGAAACGAGATAG	500	62	104	*
	<i>JrCaM3b</i>	<i>Jr07_32830</i>	Fw: AAATTAGTCTCCATAA Rev: AGATGAAATAAGATGGAAC	500	62	99	*
	<i>JrCaM4</i>	<i>Jr15_11320</i>	Fw: GAGGATGATGCTTGCAAAGTGA Rev: TGTGTCTCATATCCATACCTTGCT	500	61	51	94,9 0,996

ID: Código identificativo da sequência [nM]: Concentração de *primers* utilizada por reação (nM), Ta: Temperatura de emparelhamento (*annealing*) dos primers (°C), TA: Tamanho do fragmento amplificado (amplicão) (pb). E(%): Eficiência da reação de amplificação; R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação. \*: Gene com expressão muito reduzida não permitindo a determinação da eficiência e posterior análise de expressão.

### 3.3.3.3. Estabelecimento das condições de RT-qPCR

Para cada reação de amplificação foi utilizado 1× Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, 200 a 500 nM de cada um dos *primers* específicos para os genes alvo e para os genes de referência (ver detalhes na Tabela 3) e 2 µL de cDNA (previamente diluído 1:100) para um volume total de 16 µL. Para cada amostra biológica foram realizadas duas réplicas técnicas. Em cada placa foram consideradas duas réplicas técnicas de uma reação sem cDNA de modo a descartar a possibilidade de

contaminações ou estruturas secundárias formadas pelos *primers* (controles negativos).

Para realização das reações de amplificação utilizou-se um equipamento 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) seguindo o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos consistindo cada ciclo num passo de 15 seg a 95°C para desnaturação das cadeiras seguido de 1 min para emparelhamento (*annealing*) e extensão à temperatura específica para cada gene (consultar detalhes da temperatura na Tabela 3). No final de cada reação foi considerado um passo adicional que permitiu gerar uma curva de dissociação que consistiu num passo a 95° C durante 15 seg, seguido de 60°C durante 1 min, com um aumento gradual até atingir os 95°C de modo a desnaturar todas as cadeias. A especificidade associada a cada par de *primers* foi avaliada por verificação da existência de um único pico na curva de dissociação correspondendo a apenas um fragmento amplificado.

De modo a avaliar a eficiência (*E*) da reação de RT-qPCR para cada um dos genes foram elaboradas curvas de calibração utilizando uma amostra padrão representativa de todo o ensaio que consistiu na mistura de 2 µL de cada amostra de cDNA (1:1) e onze diluições (1:2) em série (1:1 – 1024). Para o cálculo da *E* utilizou-se a fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{declive da reta})} * 100$$

O valor de *E* deve apresentar valores num intervalo entre 90 a 105% (Bio-Rad Laboratories, 2006). O valor de  $R^2$ , correspondente ao coeficiente de determinação, permite avaliar o ajuste à reta dos pontos considerados para construção da curva de calibração e deverá superior a 0,980 (Bio-Rad Laboratories, 2006).

#### 3.3.3.4. Análise da expressão dos genes *JrCaMs*

Para análise da expressão de todos os genes considerados (genes candidatos a genes de referência e genes de interesse – *JrCaM*) foi obtido o valor do ciclo de quantificação (*Cq*) de cada amostra através do Software Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Estes valores de *Cq* de cada amostra

foram convertidos em valores de quantidades relativas (QR) pelo método  $\Delta Cq$  (Vandesompele et al., 2002), usando a fórmula:

$QR = E^{\Delta Cq}$ , onde  $\Delta Cq$  = menor valor de  $Cq - Cq$  da amostra biológica e  $E$  o valor da eficiência previamente calculado (ver acima 3.3.3.3).

Para seleção dos genes de referência, os valores de QR foram analisados pelo software GeNorm (Vandesompele et al., 2002) considerando como critério de seleção o valor de  $V \leq 0.15$  (correspondente à variação pareada de cada gene de referência com todos os genes considerados como candidatos a genes de referência) e de  $M \leq 1,5$  (correspondente ao nível de estabilidade que é definida como a variação média aos pares de um gene específico com todos os outros genes de referência, sendo que genes com os valores  $M$  mais baixos apresentam uma expressão mais estável).

O cálculo do valor de expressão dos genes de interesse foi realizado segundo a expressão:

**QR da amostra/Fator de normalização**, sendo que o fator de normalização de cada amostra resultou da média geométrica do QR de três genes de referência selecionados para cada genótipo (a integração de três genes de referência teve em conta o menor valor de  $V$  resultante da análise realizada previamente no GeNorm; a diferença nos genes selecionados para cada genótipo, cv. ‘Chandler’ e híbrido ‘Paradox’, resultou da análise relativa ao valor de  $M$ ): *JrH2B*, *JrPoliUBI* e *JrB-Actin* para o híbrido ‘Paradox’ e *JrH2B*, *JrPoliUBI* e *JrUBI-E2* para a cv. ‘Chandler’.

De forma a ilustrar os padrões de expressão espaciotemporal dos genes *JrCaMs* pelo programa Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/>; Babicki et al., 2016) utilizaram-se os valores médios de QR normalizados. De modo a representar a expressão diferencial dos genes *JrCaM* os valores de QR normalizados foram convertidas num código de cores.

### 3.4. Envolvimento do *Stress* Oxidativo no Enraizamento Adventício (EA)

#### 3.4.1. Determinação dos níveis de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) durante a indução do enraizamento adventício (EA)

A quantificação de  $H_2O_2$  foi realizada por espectrofotometria seguindo o protocolo descrito por Alexieva et al. (2001), com algumas modificações. 200 mg de

material vegetal macerado foram homogeneizados com 750  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% (m/v), seguida de uma centrifugação (HERMLE, Z383K) de 15 min (16000 g; 4°C). O sobrenadante foi recolhido de cada amostra e o respetivo precipitado conservado para posterior utilização na quantificação de proteína total (ponto 3.4.2.1) e análise da expressão enzimática por *Western blot* (ponto 3.4.2.2). Do sobrenadante recolhido, 50  $\mu\text{L}$  foram aplicados nos respetivos poços da microplaca, sendo em seguida adicionados 50  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (100 mM, pH 7) e 200  $\mu\text{L}$  de 1 M de Iodeto de Potássio. A microplaca foi incubada no escuro à temperatura ambiente durante 1 hora e de seguida determinada a absorvância por espectrofotometria, a um comprimento de onda de 405 nm num Multiskan™ FC (ThermoScientific). A determinação do nível de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi realizada por interpolação com uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) (2500, 1200, 600, 300, 150, 75, 37.5 e 0  $\mu\text{M/mL}$ ). Os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram determinados para ambos os génotipos nas quatro réplicas biológicas recolhidas em cada tempo de recolha e em ambas as condições (AIB e controlo). Foram consideradas cinco réplicas técnicas por cada uma das réplicas biológicas. Os resultados finais foram expressos em  $\text{nmol.g}^{-1}.\text{fw}$ .

### 3.4.2. Estudo da expressão da enzima catalase (CAT) na indução do enraizamento adventício (EA)

Com base nos resultados da análise estatística relativa aos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre as amostras das duas condições do ensaio (meio de cultura com AIB e sem AIB – controlo) foram selecionados para análise da expressão da enzima CAT nos dois génotipos ('Chandler' e 'Paradox') apenas os tempos 0h, 3, 5 e 7d em condições de indução (meio de cultura com AIB). Para obtenção do resultado relativo à expressão da CAT foi necessário realizar o procedimento relativo à extração da proteína total, sua quantificação e análise da expressão pela técnica de *Western blot*, procedimentos estes descritos nos pontos abaixo (ponto 3.4.2.1.e 3.4.2.2).

#### 3.4.2.1. Extração e quantificação da proteína total

Os precipitados resultantes da extração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , obtidos no ponto 3.4.1, foram sujeitos a uma lavagem com 1 mL de acetona (90 %) previamente arrefecida a -20 °C, seguido de centrifugação durante 10 min (15000 g, 4 °C). Após centrifugação os

sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram secos à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min. Cada precipitado proteico foi solubilizado em 1 mL de tampão de solubilização [7 M urea; 2 M tiourea; 4 % (m/v) (3-((3-*cholamidopropyl*)*dimethylammonio*)-1-*propanesulfonate*) (CHAPS); 100 mM Tris; 60 mM *dithiothreitol* (DTT)]. Para maximizar a solubilização, a mistura foi homogeneizada em vórtex (Biosan, Multi-Vortex V-32) durante 20 min, seguidos de 15 min de banho de ultrassons. Após a solubilização do precipitado proteico a amostra foi novamente centrifugada (5000 g, 10 min, 4°C) para remoção de restos de material vegetal que não tivessem sido previamente removidos. No final, o sobrenadante proteico foi recolhido e armazenado a -20°C até posterior utilização.

A quantificação da proteína total foi realizada através do método de Bradford (Hammond & Kruger, 1988) que apresenta como princípio a ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250 às proteínas presentes na amostra. A formação do complexo corante-proteína resulta numa mudança de cor de castanho para azul e numa alteração do pico de absorvância de 465 para 595 nm. A intensidade da cor azul é proporcional à quantidade de proteína na amostra. Este método implica a realização prévia de uma curva de calibração com concentrações de BSA (Albumina de Soro Bovino, do inglês *Bovine Serum Albumin*) conhecidas para posterior cálculo das concentrações proteicas de cada amostra por interpolação com os valores obtidos na reta.

Para o procedimento de quantificação, as amostras foram descongeladas em gelo e diluídas na proporção de 1:2 em tampão de solubilização. Numa microplaca de 96 poços foram aplicados 10 µL de cada amostra e o mesmo volume das diferentes concentrações de BSA (25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 500 µg/mL). Cada amostra, incluindo as amostras de BSA, foram colocadas na placa em triplicado. Seguidamente, a cada poço foram adicionados 200 µL do reagente de Bradford [10 % (m/v) reagente *Coomassie Brilliant Blue* G-250; 5 % etanol 95 %; 10 % ácido fosfórico 85 %]. Após incubação à temperatura ambiente, durante 5 min, foram feitas as leituras de absorvância a um comprimento de onda de 590 nm, utilizando um leitor de microplacas Glomax Multi Detection System (Promega). Para cada placa foi traçada uma reta de calibração com os valores médios das absorvâncias de cada padrão de BSA em função da quantidade de proteína. Por interpolação, e tendo em conta o fator de diluição, calculou-se a concentração de proteína total para cada um dos triplicados das amostras.

### 3.4.2.2. Estudo da expressão da enzima CAT por *Western blot*

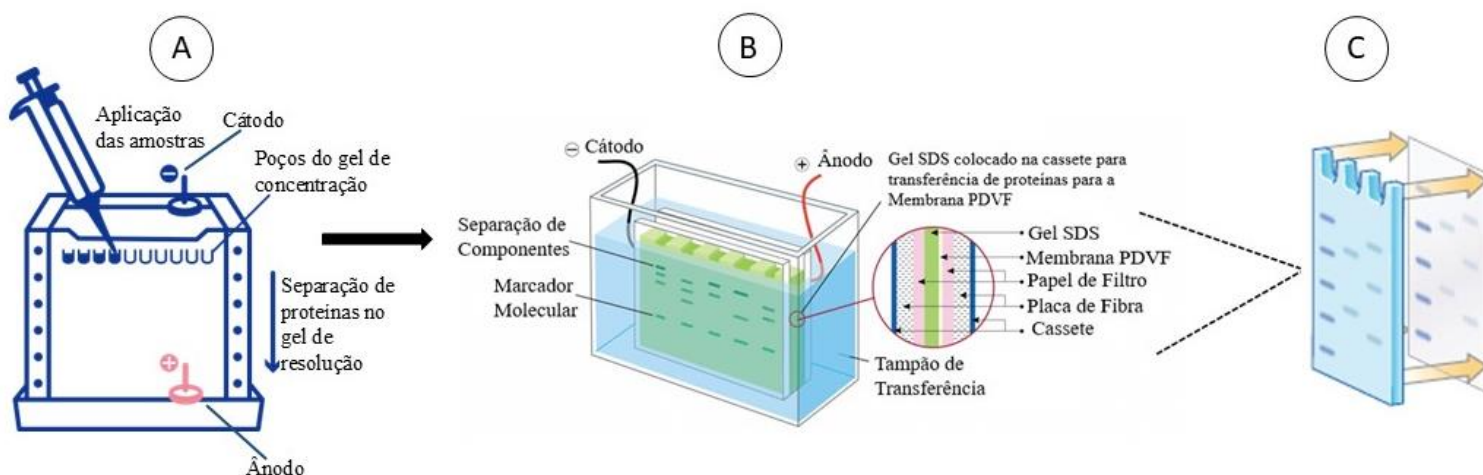
A técnica *Western blot* foi realizada para detetar e quantificar os níveis de expressão da proteína CAT nos extratos proteicos das amostras tratadas com AIB de ambos os genótipos. Para esta análise seguiu-se o método descrito por Towbin et al. (1979), considerando três réplicas técnicas por amostra biológica. Numa fase inicial, procedeu-se à separação de 15 µg de proteína total de cada amostra por eletroforese SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli, 1970), em géis de poliacrilamida a 14% (m/v). Para cada amostra o volume correspondente a 15 µg de proteína total foi misturado com tampão de amostra [0,125 M Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS (m/v), 5% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,0001% azul de bromofenol] e incubado a 37 °C num banho seco (Fisher Scientific, Drybath FB15103) durante 10 min. De seguida as amostras foram incubadas em gelo e posteriormente aplicadas no gel.

Para realização da técnica SDS-PAGE foram preparados géis (8 cm × 10 cm) com 0,75 mm de espessura, constituídos por um gel de resolução e um gel de concentração. O gel de resolução (14 % acrilamida, m/v) foi preparado através da mistura de 5 mL de Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8), 200 µl de SDS, 9,45 mL de acrilamida/bis-acrilamida 30 % (m/v), 5,45 mL de água bidestilada, 150 µL de Persulfato de Amónio (do inglês - *Ammonium Persulfate* - APS) 0,1 g/mL e 10 µl de TEMED. Após a homogeneização da mistura, a mesma foi colocada entre as duas placas de vidro deixando aproximadamente livre 1 cm que foi preenchido com água bidestilada de modo a evitar a polimerização da mistura em contacto com o ar. Após a polimerização do gel de resolução preparou-se o gel de concentração (4% acrilamida, m/v), que consistiu em 1,06 mL de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 2 mL de Tris-HCl (0,5M, pH 6.8), 80 µL de SDS, 4,86 mL de água bidestilada, 48 µL de APS e 8,8 µL de TEMED. O gel de concentração foi aplicado sobre o gel de resolução e após a sua aplicação foram colocados de imediato os pentes para formação de 10 poços no referido gel.

Após a polimerização dos géis, os mesmos foram colocados no sistema Protean mini (Bio-Rad), onde as câmaras superiores e inferiores foram cheias com tampão de corrida [0,025 M Tris, 0,192 M glicina, 1 % (m/v) SDS]. Em cada um dos géis foram aplicados 4 µL de marcador de massas moleculares (NZYA Colour Protein Marker II, nzytech) com um intervalo de massas moleculares de 10 a 245 kDa. A eletroforese



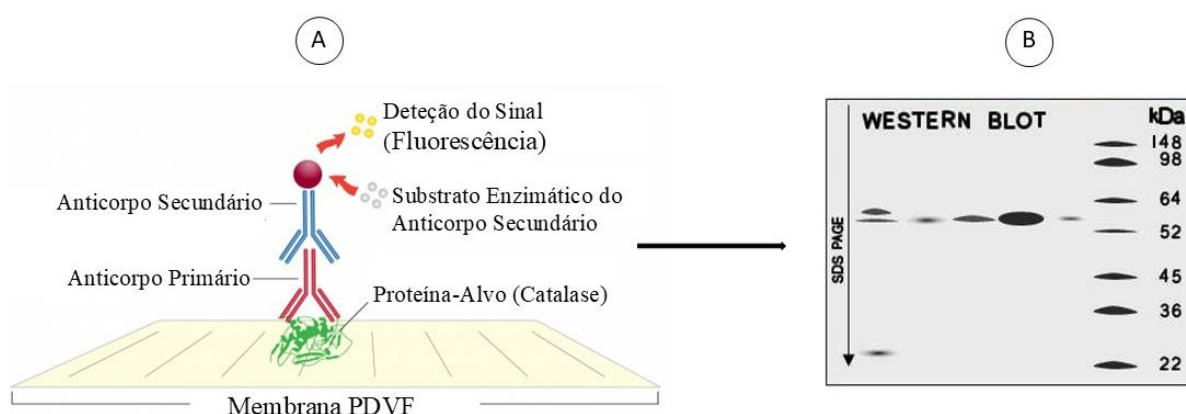
(Figura 22 - A) decorreu a uma voltagem constante de 135 Volts até que a frente de corrida atingisse o limite inferior do gel.



**Figura 22** - Representação das duas primeiras etapas da técnica de *Western blot* - separação de proteínas segundo o seu peso molecular, pelo método SDS-PAGE e Transferência em sistema de banho refrigerado. (A) Disposição das amostras nos poços do gel de concentração para corrida eletroforética em gel de poliácridamida (Fonte: <https://2018.igem.org/Team:XMU-China/Measurement>), (B) Transferência eletroforética das proteínas do gel para membrana PDVF (Fonte: <https://www.leinco.com/western-blotting-protocol/>), (C) Representação pormenorizada do processo de transferência eletroforética das proteínas para a membrana PDVF (Fonte: <https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blotting-samples-gels-and-blotting-membranes.html>).

Após a separação proteica pelo método SDS-PAGE realizou-se o processo de transferência num sistema de banho refrigerado. Este sistema baseia-se na mobilidade eletroforética das proteínas, fazendo com que as mesmas sejam transferidas do gel para uma membrana de Difluoreto de Polivinilideno (do inglês - *Polyvinylidene Difluoride* (PDVF)) (Cytiva, Amersham™ Hybond) com elevada capacidade de ligação a proteínas. Numa fase inicial as membranas foram ativadas em metanol (100%) durante 5 seg em agitação suave, sendo de seguida colocadas em tampão de transferência [Tris-HCl 25 mM, pH 8.3; glicina 192 mM; metanol 20%; SDS 0,037% (m/v)]. Os géis foram posteriormente retirados dos vidros de SDS-PAGE e colocados em contacto com a membrana no tampão de transferência durante 10 min. De seguida cortaram-se quatro folhas de papel de filtro com o tamanho aproximado do gel de resolução, sendo as mesmas também embebidas em tampão de transferência. Para a realização da

transferência procedeu-se à montagem da *sandwich* na seguinte ordem: na superfície da cassette do sistema de transferência, correspondente ao cátodo, colocou-se uma placa de fibra humedecida, por cima colocou-se papel de filtro humedecido, o gel obtido da corrida SDS-PAGE, a membrana de PDVF, nova folha de papel de filtro e por fim a placa de fibra. Todos estes componentes foram colocados de modo a evitar a formação de bolhas de ar (Figura 22-B). No final as cassetes com a *sandwich* foram colocadas na tina de transferência com sistema de arrefecimento e a mesma foi preenchida com tampão de transferência. A transferência (Figura 22-C) ocorreu a uma corrente constante de 350 mA durante 60 min e uma temperatura de 12 °C.



**Figura 23** - Representação da última etapa da técnica de *Western blot*: Imunodeteção e detecção das bandas correspondentes à enzima. (A) Ligações específicas entre a proteína alvo, anticorpo primário, anticorpo secundário e reação da enzima com o substrato ECF (Fonte: <https://www.leinco.com/western-blotting-protocol/>), (B) Detecção das bandas da proteína alvo na membrana PDVF (Fonte: <https://www.creativebiomart.net/resource/principle-protocol-western-blot-protocol-351.htm>).

Após o processo de transferência, as membranas PDVF foram incubadas numa série de soluções que permitiram a ligação de anticorpos específicos à proteína CAT (Figura 23-A). Primeiramente as membranas foram incubadas numa solução de bloqueio [5 % (m/v) leite em pó em TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20)] durante 2h à temperatura ambiente com agitação suave. A incubação da membrana com esta solução de bloqueio previne a formação de ligações inespecíficas do anticorpo. De seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário Anti-CAT (Agrisera AS09501, diluição de 1:1500), a 4°C com agitação suave durante aproximadamente 16h. Após a incubação com o anticorpo primário efetuaram-se três

lavagens em agitação suave, de 15 min cada, numa solução de 0,5% (m/v) de leite em pó em TBS-T (solução de lavagem). Após as lavagens a membrana foi incubada com o anticorpo secundário [Goat anti-Rabbit IgG antibody (Agrisera AS09 602), diluição 1:10000], tendo o mesmo acoplado a si a enzima Fosfatase alcalina, à temperatura ambiente e agitação suave durante 2h. De seguida foram novamente realizadas três lavagens em solução de lavagem, cada uma realizada à temperatura ambiente e agitação suave durante 15 min cada.

Após este procedimento as membranas foram então incubadas em substrato ECF (Plus *Western Blotting Detection Reagents*, GE, Healthcare) durante cerca de 40 seg. Este substrato reage com a enzima fosfatase alcalina do anticorpo-secundário provocando a emissão de fluorescência, permitindo a posterior identificação e quantificação da CAT (Figura 23-B). Para aquisição da imagem foi utilizado um transiluminador Gel-doc *system* (Bio-Rad) e a análise da expressão das bandas foi realizada através do programa Bio-Rad Image Lab (versão 5.2.1).

### 3.5. Análise das Alterações Histo-morfológicas Associadas à Formação de Raízes Adventícias

#### 3.5.1. Preparação das amostras para análise histológica

##### 3.5.1.1. Fixação, desidratação e impregnação em parafina

Para o estudo histológico as amostras vegetais que consistiram na região basal (~1 cm) das plântulas do híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’ estabelecidas em meio de enraizamento com AIB foram recolhidas e colocadas numa solução de FAA [10 mL de formaldeído, 10 mL de ácido acético, 80 mL de etanol (70%)] para fixação dos tecidos. O material vegetal foi mantido nesta solução a 4°C por um período de 2 dias.

Após o período de fixação seguiu-se o procedimento de desidratação que se iniciou com duas lavagens com uma solução de etanol (70%) seguindo-se a passagem por uma série de soluções de etanol:butanol com concentração crescente de butanol como indicado na Tabela 4.

**Tabela 4** - Rácio de etanol e butanol considerado nas diferentes soluções para desidratação das amostras, com indicação dos respectivos tempos de imersão.

Solução	Água (mL)	Etanol (mL)	Butanol (mL)	Tempo (h)
I	50	40	10	4
II	30	50	20	12
III	15	50	35	2
IV	-	45	55	2
V	-	25	75	2
VI	-	5	95	12

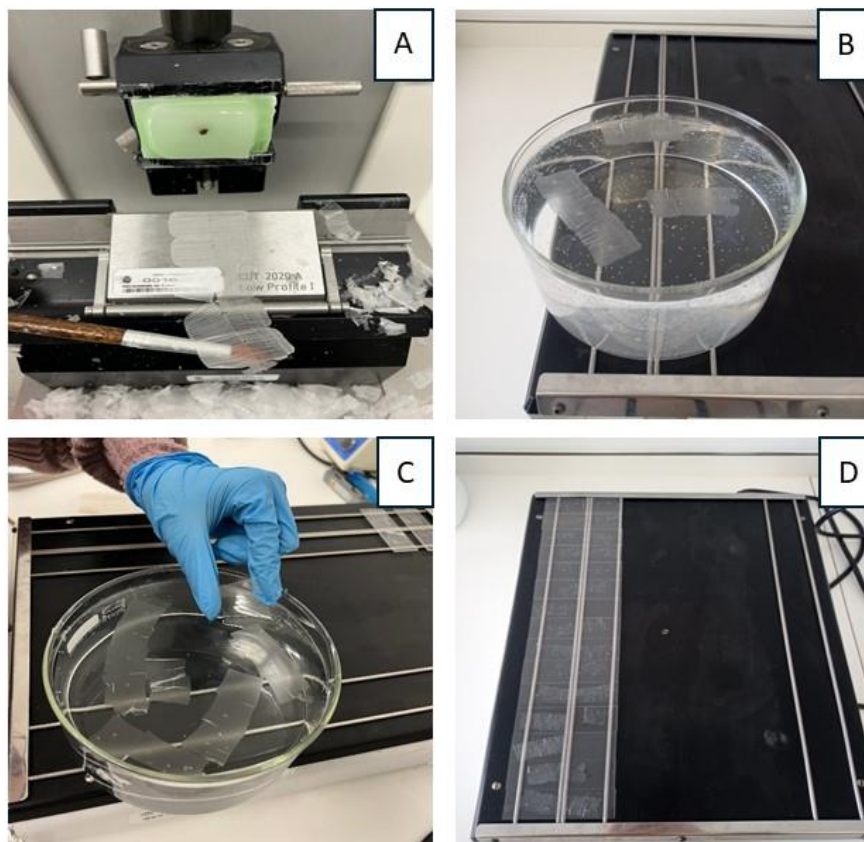
Após o processo de desidratação foram realizados dois banhos em xilol (100%) durante 30 min cada, seguindo-se o processo de impregnação em parafina. Para tal o material vegetal foi transferido para tubos contendo parafina liquefeita (Q path<sup>®</sup> Paraffin, VWR BDH Prolabo<sup>®</sup> Chemicals) onde permaneceu durante 4h. Após este período a parafina foi removida e substituída por nova parafina liquefeita permanecendo nessa por igual período. O procedimento foi repetido mais duas vezes sendo que nestes dois últimos passos o material vegetal permaneceu na parafina durante um período de 48h. Durante os banhos em parafina as amostras foram mantidas numa estufa VENTI-Line VL115 (VRW<sup>®</sup>) a 54°C.

Para obtenção dos blocos de parafina com o material vegetal recorreu-se a uma mesa especializada e ao auxílio de pinças aquecidas. Na mesa aquecida as amostras foram transferidas dos tubos onde decorreu o processo de inclusão para as cassetes sendo orientadas de modo a obter cortes transversais. De seguida, o material vegetal, foi embebido em parafina fundida até ficar completamente submerso. Após a colocação da parafina fundida as cassetes foram colocadas numa placa de arrefecimento (-8°C) e de seguida armazenadas a -20°C até à realização dos cortes histológicos.

### 3.5.1.3. Corte dos blocos e montagem em lâmina

Para obtenção dos cortes histológicos de 5 µm de espessura foi utilizado um micrótomo rotativo Cut4055 (MicroTec<sup>®</sup>) equipado com lâminas descartáveis dispostas num ângulo de corte de 30° (Figura 24-A). As ténias obtidas foram colocadas num recipiente com água à temperatura ambiente, após seleccionadas de acordo com a qualidade do corte, sendo transferidas para um recipiente com água a  $39 \pm 2^\circ\text{C}$  (Figura

24-B) de modo a permitir a extensão da parafina e facilitar a posterior montagem na lâmina. Os cortes seleccionados foram colocados em lâminas de vidro (1,0 mm) (Figura 24-C) sendo posteriormente secos à temperatura ambiente (Figura 24-D). Para garantir uma boa adesão do corte às lâminas, estas foram incubadas numa estufa VENTI-Line VL115 (VRW ®) a 37°C durante aproximadamente 16h.



**Figura 24** - Imagens representativas do procedimento realizado para o estudo histológico. (A) Micrótomo rotativo Cut4055 (MicroTec ®) sendo visível a formação das ténias obtidas durante o corte dos blocos de parafina, (B) Transferência das ténias para recipiente com água quente permitindo a extensão da parafina, (C) Montagem das ténias em lâminas de vidro, (D) Secagem das lâminas para adesão das ténias de parafina ao vidro.

#### 3.5.1.4. Desparafinação e coloração

Para remoção da parafina (desparafinação) dos cortes, as lâminas foram sujeitas a um banho em xilol (100%) durante 10 min.

Para coloração dos cortes foram considerados dois corantes, a ‘Safranina O’ que fornece uma coloração às paredes celulares lenhificadas e o Fast Green que cora

o citoplasma e as paredes celulares celulósicas. O processo de coloração foi iniciado com a hidratação dos cortes tendo as lâminas sido submetidas a três soluções de etanol de concentração decrescente (ver detalhes na Tabela 5), seguida de um banho numa solução aquosa de ‘Safranina O’ a 0,1% (2,5 g de ‘Safranina O’ dissolvidos em 250 mL de etanol a 95%, seguida de duas diluições sucessivas de 10 mL da solução em 90 mL de água destilada).

**Tabela 5** - Protocolo para coloração de amostras utilizando os corantes Safranina O e Fast Green.

Processo de Coloração	Tempo
<b>1. Hidratação das Amostras:</b>	
• Banho de Etanol 100%	5 min
• Banho de Etanol 95%	5 min
• Banho de Etanol 70%	5 min
• Banho de Água Destilada	5 min
<b>2. Coloração em ‘Safranina O’</b>	1 min
<b>3. Lavagem em Água Destilada</b>	Até remoção do excesso de ‘Safranina O’
<b>4. Desidratação de Material:</b>	
• Banho de Etanol 70%	1 min
• Banho de Etanol 95%	1 min
<b>5. Coloração com ‘Fast Green’</b>	5 seg
<b>6. Três passagens em Etanol Absoluto</b>	Passagens rápidas
<b>7. Banho de Xilol</b>	2 min

Para remoção do excesso do corante seguiu-se uma lavagem em água destilada. Para submeter os cortes a um segundo corante foi necessário proceder a nova desidratação tendo as lâminas sido submetidas a duas soluções de etanol de concentração crescente (ver Tabela 5) seguindo uma passagem por uma solução alcoólica de ‘Fast Green’ a 0,5% (0,5 g de corante Fast Green FCF dissolvido em 200 mL de etanol a 95%) seguindo-se três lavagens sucessivas com etanol absoluto e um bano final em xilol durante 2 min. Na Tabela 5 são apresentadas todas as etapas associadas ao processo de coloração dos cortes histológicos.

Para montagem das preparações definitivas foi adicionado ao corte aderente às lâminas de vidro uma gota de meio de montagem para histologia DPX (Sigma-Aldrich, Espanha). Sobre essa solução colocada uma lamela de vidro, deixando de seguida secar a solução à temperatura ambiente durante 1h.

### 3.5.1.5. Análise microscópia e registo de imagens

As preparações definitivas foram observadas num microscópio automatizado Leica DM6000B (Wetzlar, Alemanha) da Unidade de Microscopia - MED, permitindo a visualização das preparações definitivas nas objetivas de 5×, 10× e 40× de forma a observar detalhadamente diferentes pormenores dos cortes. As imagens foram recolhidas através de uma câmara digital (Leica CC7000, Wetzlar, Alemanha) acoplada ao microscópio.

## 3.6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 28.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Para todos os parâmetros analisados foi considerado um intervalo de confiança de 95%.

Primeiramente, os dados foram analisados relativamente à sua normalidade e homocedasticidade segundo os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente.

A comparação das médias dos valores de expressão dos diferentes genes em estudo e dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre as amostras tratadas com AIB e amostras controlo, nos diferentes tempos de recolha, foi realizada através do teste T-Student ou Mann-Whitney, quando as amostras não apresentavam distribuição normal. A comparação das médias dos valores de expressão dos genes e dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre os diferentes tempos de recolha, tanto no grupo tratado com AIB, bem como no grupo controlo, foi realizada através de One-way ANOVA. No caso de se verificarem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), as médias foram comparadas através do teste de Tukey. Sempre que os dados não cumpriam os critérios de normalidade ou homocedasticidade, a análise foi realizada com recurso ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. No caso dos testes não paramétricos, sempre que se verificaram diferenças significativas, as amostras foram comparadas pelo método *Pairwise*.

No caso da análise da expressão da CAT, obtida por *Western Blot*, a comparação entre as amostras dos dois genótipos foi realizada apenas para as amostras recolhidas no tratamento com AIB às 0h, 3d, 5d e 7d. A comparação entre as amostras foi realizada através do teste T-Student ou Mann-Whitney quando as amostras não apresentaram distribuição normal. A comparação da expressão das amostras tratadas com AIB entre os diferentes tempos de recolha, para cada um dos genótipos, foi realizada através de One-way ANOVA. No caso de se verificarem diferenças

significativas ( $p < 0,05$ ), as médias foram comparadas através do teste de Tukey. Sempre que os dados não cumpriram os critérios de normalidade ou homocedasticidade a análise foi feita com recurso ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. No caso dos testes não paramétricos, sempre que se verificaram diferenças significativas as amostras foram comparadas pelo método *Pairwise*.

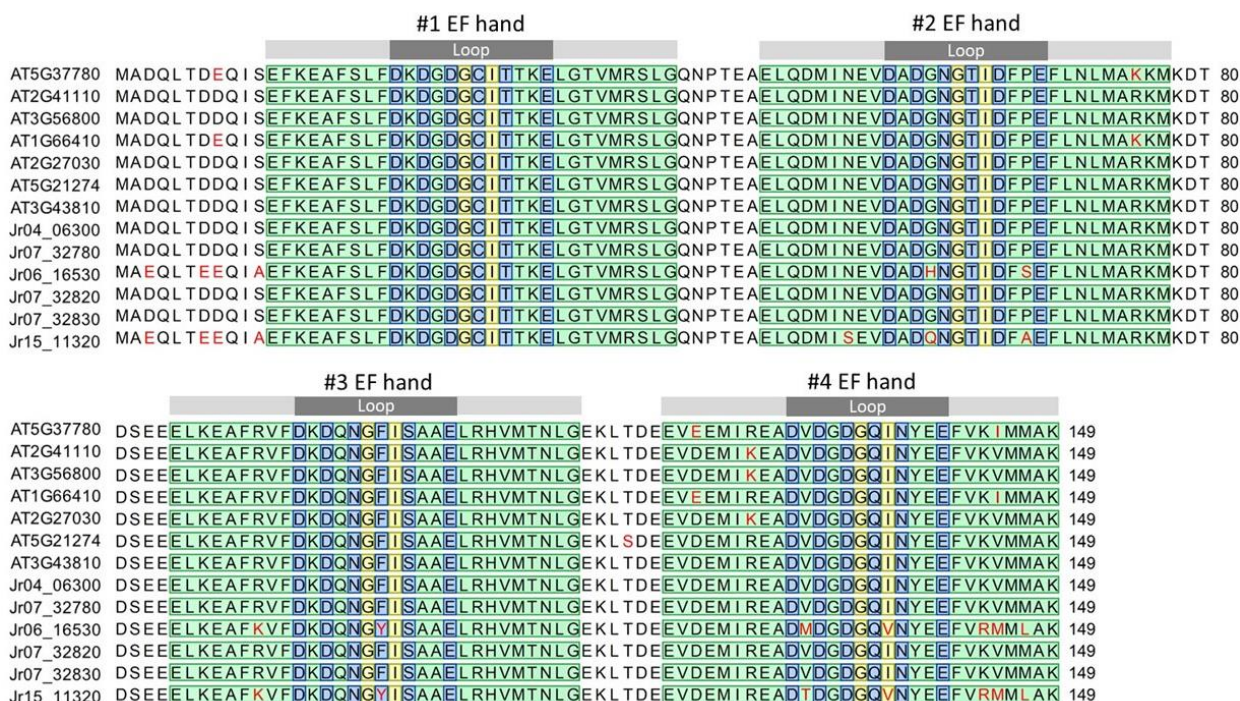




## 4. Resultados e Discussão

#### 4.1. Identificação dos Genes das Calmodulinas em *Juglans regia* e Caracterização das Proteínas Codificadas

Para a identificação dos genes que codificam para as Calmodulinas em *J. regia* (*JrCaMs*) foram utilizadas como referência as sequências proteicas previamente descritas em *A. thaliana* (*AtCaM*), referidas como sequências modelo em diversos trabalhos com objetivo similar (Koornneef & Meinke, 2010; Shi & Du, 2020; Liu et al., 2022). Neste sentido foi realizada uma análise BLASTp utilizando as 7 sequências de *AtCaM* (McCormack & Braam, 2003; McCormack et al., 2005). Das sequências identificadas com elevada homologia foram selecionadas as que apresentavam a estrutura típica das CaM descrita por McCormack et al. (2005), caracterizadas por serem péptidos constituídos por 149 aminoácidos (Figura 25) e apresentarem quatro *Motifs* de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (*EF-Hand Motifs*) (Figura 25).



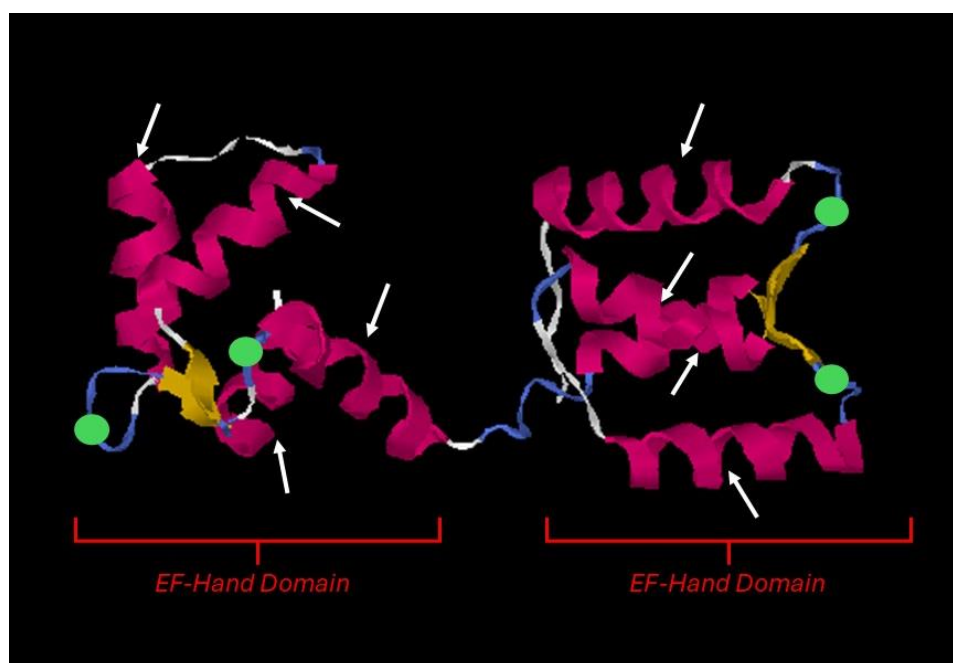
**Figura 25-** Alinhamento das sequências de *AtCaMs* e *JrCaMs* pelo programa CLC GenomicsWorkbench 11.0.1 e identificação dos quatro *EF-Hand Motifs*. As regiões correspondentes aos *EF-Hand Motifs* (indicadas a verde) foram identificadas de acordo com a informação publicada por Zhang et al. (2022). Na figura estão ainda marcadas algumas posições importantes na funcionalidade das CaM. A cinza-escuro estão assinaladas as regiões do *loop* que são responsáveis pela ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Persechini, 1989). Os aminoácidos G e I (a amarelo) são responsáveis pela estabilidade da estrutura *loop* e os aminoácidos D, N, F, S, Q e E (a azul) são aminoácidos responsáveis pela ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  na região *loop* (Zhang et al., 2022).

Nas diferentes JrCaMs bem como nas AtCaMs foram identificadas as regiões correspondentes aos quatro *EF-Hand Motifs*. De acordo com Mohanta et al. (2019) cada *EF-Hand Motif* de CaMs é constituído por um total de 36 aminoácidos. Os *EF-Hand Motifs* correspondem a locais específicos na região central da estrutura da proteína (região *loop*), com cerca de 12 aminoácidos residuais, responsáveis pela ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Persechini, 1989). Esta descrição na literatura corrobora com os resultados obtidos da análise dos quatro *EF-Hand Motifs* das JrCaMs (Figura 25). A análise detalhada de cada uma das sequências proteicas de JrCaMs, realizada no programa UniProt, revelou a presença de quatro *EF-Hand Motifs* com 36 aminoácidos cada um. No alinhamento representado na Figura 25 as zonas delimitadas como *EF-Hand Motifs* compreendem apenas às regiões conservadas dos *EF-Hand Motifs* (Zhang et al., 2022), apresentando por isso menor número de aminoácidos (30 aminoácidos). A presença dos diferentes *EF-Hand Motifs* nas sequências de CaM significa que não terão sofrido alterações significativas durante o processo de evolução das espécies (Baichoo & Ouzounis, 2017), sendo possível a sua associação a diversos processos biológicos onde o  $\text{Ca}^{2+}$  assegura o papel chave na atividade da proteína. A mesma análise realizada no UniProt permitiu visualizar que em todas as JrCaMs os *EF-Hand Motifs* se encontram agrupados aos pares, formando dois *EF-Hand Domains*, um localizado na extremidade N-terminal e outro na extremidade C-terminal da proteína (Figura 25) conforme descrito por Williams (1999).

A distribuição dos quatro *EF-Hand Motifs* aparece uniforme nas sequências de JrCaM e de AtCaM (Figura 25), o que confirma o elevado nível de conservação evolutiva dos *Motifs* entre CaMs destas duas espécies. Um resultado similar foi reportado em *Solanum pennellii*, identificando em todas as CaMs as quatro regiões *EF-Hand Motifs* com uma distribuição semelhante dos *Motifs* entre os diferentes membros SpCaMs (Shi & Du, 2020). No entanto, existem espécies onde a distribuição dos quatro *EF-Hand Motifs* não é uniforme, sendo exemplo o *Triticum aestivum* (Liu et al., 2022) e *Ginkgo biloba* (Zhang et al., 2022), onde essa variabilidade é apontada como resultante de um processo de evolução mais recente (Liu et al., 2022).

De forma a visualizar a estrutura tridimensional nas JrCaMs foi realizada uma análise das sequências proteicas através do programa I-TASSER. Na Figura 26, encontra-se representada a estrutura tridimensional de Jr04\_06300 de forma exemplificativa, uma vez que a estrutura tridimensional apresentou estar conservada para todas as JrCaMs. Assim como descrito anteriormente, foi possível verificar um arranjo na estrutura das JrCaMs coincidente com o descrito por Williams (1999), onde cada *EF-Hand Motif*

possui duas hélices ligadas a uma região *loop*, e que cada par de *EF-Hand Motifs* se encontra organizado num *EF-Hand Domain*. Foi possível observar uma homogeneidade estrutural entre os dois *EF-Hand Domains* das JrCaMs. Segundo Chattopadhyaya et al. (1992), embora os mesmos apresentem diferenças em termos das suas propriedades bioquímicas os dois *EF-Hand Domains* são caracterizados por um nível de semelhança de aproximadamente 75%. As diferenças entre os dois *EF-Hand Domains* numa CaM restringem-se à afinidade de ligação ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ , neste caso, a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  na extremidade C-terminal é 10 vezes mais forte que a sua ligação no N-terminal (Forsén et al., 1991; Linse & Forsén, 1995).



**Figura 26** - Estrutura tridimensional representativa da proteína CaM Jr04\_06300 obtida no programa I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>). As regiões correspondentes às hélices dos *EF-Hand Motifs* estão indicada com setas brancas. As regiões *loop* encontram-se representadas a verde (Chattopadhyaya et al., 1992). A vermelho estão representados os pares de *EF-Hand Motifs* que constituem os dois *EF-Hand Domains* (Kretsinger & Nockolds, 1973; Nelson & Chazin, 1998b). O sentido de ligação das regiões *loop* às hélices encontra-se indicado a amarelo.

Apesar das seis sequências consideradas JrCaM cumprirem os critérios indicados por McCormack et al. (2005), com 149 aminoácidos e os quatro *EF-Hand Motifs*, foi necessário considerar mais alguns critérios na análise das sequências de modo a descartar

a possibilidade de poderem ser CaM-like (CMLs). As CMLs são proteínas que apresentam elevada similaridade na sua estrutura com as CaMs, podendo apresentar tamanho variável e de 1 a 6 *EF-Hand Motifs*, os quais podem não ser específicos para a ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Ranty et al., 2016; Mohanta et al., 2017; Aleynova et al., 2020). Isto significa que uma CML pode também ser constituída por 149 aminoácidos e possuir quatro *EF-Hand Motifs*, podendo assim conduzir a erros na identificação das CaM. Para complementar o processo de identificação das *JrCaM* seguiu-se a metodologia descrita por Shi & Du (2020), baseada na análise de uma matriz de identidade integrando a CaM7 de *A. thaliana* (AtCaM7), sendo consideradas *JrCaM* as sequências com identidade superior a 90%.

Segundo Shi & Du (2020) em *S. pennellii*, de um total de 51 sequências foi possível identificar apenas 6 como SpCaM. A possibilidade de encontrar este elevado nível de similaridade entre as sequências de diferentes espécies é atribuído à conservação da estrutura primária das CaMs entre organismos, inclusivamente pertencentes a diferentes reinos (Roberts et al., 1986; Moncrief et al., 1990).

Tendo em conta o resultado da matriz de identidade realizada com as seis sequências de *J. regia* e com a sequência AtCaM7 foi possível confirmar que todas apresentavam um nível de identidade superior a 90% (ver detalhes na tabela 6), podendo por isso ser consideradas *JrCaM*.

Adicionalmente, a determinação do peso molecular, do pI e a percentagem de metioninas (%M), foram parâmetros também considerados para a caracterização das *JrCaMs*. Segundo Wang et al. (2017), uma CaM típica possui um peso molecular de 16.8 kDa e pI de 4.09, sendo a %M de ~6% comparativamente às proteínas em geral que possuem uma %M média de ~1.4% (Rose et al. 1985, Nelson & Chazin 1998a). A elevada %M nas CaMs está associada à flexibilidade e polarização das cadeias laterais (constituídas por metionina) contribuindo para a sua estrutura e função (McCormack & Braam, 2003).

Observando os resultados obtidos para as seis sequências de *JrCaM* verifica-se uma variação nos três parâmetros apontados, variando o peso molecular entre ~17 kDa e ~21 kDa, o pI entre 4.1 e 4.5 e a %M entre 4.8 % e 6 %. No entanto, as *JrCaMs* que apresentam o peso molecular mais próximo do indicado como valor padrão (16.8 kDa) e %M de 6% são as que apresentam o pI mais baixo (4.1/4.2). Pelo contrário, as que apresentam o valor de pI mais elevado (4.3/ 4.4/ 4.5), ainda assim abaixo do considerado valor padrão (4.9), apresentam um peso molecular superior (~21 kDa) e uma %M inferior

ao valor padrão (~4.8% considerando o padrão de 6%) mas superior ao indicado para a generalidade das proteínas (~1.4 %). Desta forma, foi a combinação entre os diferentes parâmetros, associados ao tamanho da sequência, que permitiu considerar as seis sequências como JrCaMs. Esta variabilidade nos diferentes parâmetros não é exclusiva de *J. regia*. Shi & Du (2020) reportaram em CaM de *S. pennellii* o número de aminoácidos das SpCaM e algumas propriedades bioquímicas, tais como o peso molecular, o pI e a %M, constantes na maioria das sequências, com valores de 149, 16.8, 4.1, e 6.0 %, respetivamente, sendo exceção a sequência SpCaM3 apresentando valores de 180, 20.51, 4.61, 6.70 % respetivamente. Valores esses que se encontram mais elevados dos previstos para uma típica CaM, contudo, mantiveram a classificação como CaM. À semelhança dos resultados obtidos no trabalho de Shi & Du (2020), também algumas CaMs propostas para noqueira (*Jr07\_32820*, *Jr07\_32830*, *Jr15\_11320* e *Jr06\_16530*) apresentam valores diferentes dos valores padrão indicados para os vários parâmetros, nomeadamente, na %M (< 6% ou > 6%) e peso molecular (~21 kDa). No entanto, os valores resultantes da matriz de identidade permitiram manter a classificação como CaMs, permitindo concluir que o genoma de *J. regia* codifica para seis CaMs.

**Tabela 6** - Sequências de CaMs de *Juglans regia* L. identificadas de acordo com os critérios de McCormack et al. (2005) e Shi & Du (2020) e apresentação de algumas das suas propriedades bioquímicas e localização subcelular.

ID	Nº aa	% de aminoácidos idênticos com AtCaM7	Motifs EF-Hand	Nº de regiões de ligação ao cálcio	% M	Localização Subcelular	pI	Peso Molecular (kDa)	Nº de EF-Hand Domains
<i>Jr04_06300</i>	149	100	4	4	6.0	nucl: 5, mito: 3, extr: 3, cito: 2, clo: 1	4.1	16.8	2
<i>Jr07_32780</i>	149	100	4	4	6.0	nucl: 5, mito: 3, extr: 3, cito: 2, clo: 1	4.1	16.8	2
<i>Jr07_32820</i>	149	100	4	4	4.9	nucl: 5, mito: 3, extr: 3, cito: 2, clo: 1	4.4	20.9	2
<i>Jr07_32830</i>	149	100	4	4	4.8	nucl: 5, mito: 3, extr: 3, cito: 2, clo: 1	4.5	21.1	2
<i>Jr06_16530</i>	149	91,2	4	4	6.7	nucl: 6.5, nucl_plas: 5, mito: 4, plas: 2.5, extr: 1	4.2	17.0	2
<i>Jr15_11320</i>	149	90,6	4	4	4.8	nucl: 5, mito: 5, plas: 2, clo: 1, cito: 1	4.3	21.3	2

ID: código identificativo da sequência; Nº aa: número de aminoácidos que constituem a proteína; pI: ponto isoelétrico; %M: percentagem de metioninas; nucl: núcleo; mito: mitocôndria; extr: extracelular; cito: citoplasma; clo: cloroplasto; plas: membrana plasmática.

Relativamente à localização subcelular das JrCaMs, as análises *in silico* revelaram ser o núcleo o seu principal compartimento. Resultado similar foi reportado por Shi & Du

(2020) para as SpCaMs. As CaM podem estar presentes em diferentes compartimentos na célula eucariota nomeadamente citoplasma (Kim et al., 2009), membrana plasmática (Collinge & Trewavas, 1989) e núcleo (Zielinski, 1998). A identificação da sua localização a nível celular permite extrapolar para o tipo de função que essa proteína poderá desempenhar na célula (Horton et al., 2007). O facto destas proteínas se encontrarem localizadas preferencialmente no núcleo sugere o seu papel em algumas funções específicas desempenhadas ao nível deste organelo celular, nomeadamente a regulação da expressão génica através da associação a fatores de transcrição, apresentando um papel determinante na regulação de genes alvo (Bachs et al., 1994; Corneliussen et al., 1994; Szymanski et al., 1996). A alteração dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo resultará da sua migração do citoplasma para esse organelo (Kim et al., 2009). Vários autores demonstraram a existência de canais específicos para o  $\text{Ca}^{2+}$  ao nível do núcleo das células vegetais, fornecendo evidências sobre a existência de uma via de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  específica do núcleo (Grygorczyk & Grygorczyk, 1998; White, 2000; Brière et al., 2006). De acordo com Chauhan et al. (2017), a regulação de alterações nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo são independentes da alteração dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma, sendo os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados de forma distinta nestes dois organelos (Mazars et al., 2009; Mazars et al., 2010), incluindo em resposta a diferentes estímulos (Pauly et al., 2001; Xiong et al., 2004; Kim et al., 2009).

Ao nível do citoplasma, a estrutura das CaM é alterada devido às suas ligações ao  $\text{Ca}^{2+}$  quando perante um estímulo, passando à sua forma biologicamente ativa, mediando assim uma resposta específica da planta que poderá passar pela interação com outras moléculas (Bergey *et al.* 2014; Junho et al., 2020; Takemoto-Kimura et al., 2017). A alteração dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  ao nível do citoplasma resulta da sua libertação de vários organelos celulares onde este se encontra armazenado, como o retículo endoplasmático, o vacúolo, as mitocôndrias, os cloroplastos e a parede celular (Naz et al., 2024).

A ocorrência de alterações nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser desencadeadas como resposta a vários estímulos, originando uma alteração da expressão de genes no núcleo, tais como a resposta a reguladores de crescimento como as auxinas (Okamoto et al., 1995) e danos mecânicos como o ferimento (Botella & Arteca, 1994; Ito et al., 1995; Oh et al., 1996,). As CaMs responsáveis pela perceção do sinal químico ( $\text{Ca}^{2+}$ ), interagem posteriormente com vários fatores de transcrição (Snedden & Fromm, 2001; Yang & Poovaiah, 2003; Bouché et al., 2005) atuando como descodificadores primários de sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo e reguladores da expressão de genes de resposta ao *stress*, precisamente

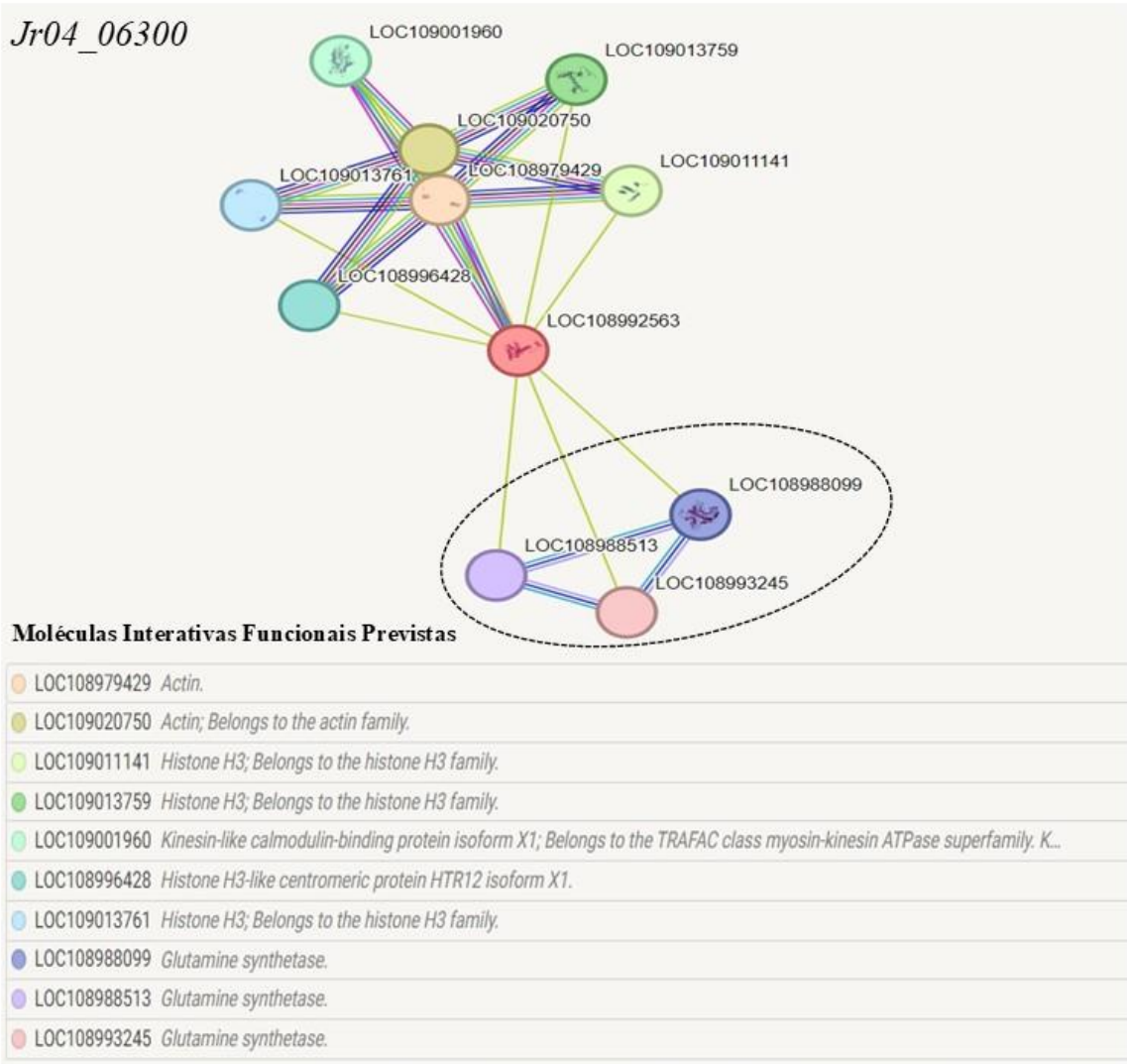
por se associarem a fatores de transcrição (Tuteja & Mahajan, 2007; Chauhan et al., 2017).

De um modo geral, quando ocorre o processo de transcrição de genes no núcleo, este processo pode ser regulado por sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  provenientes do próprio núcleo ou do citoplasma. Um estudo realizado em *N. tabacum* revelou que a regulação da expressão de genes ao nível do núcleo é influenciada por vias de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  provenientes de diferentes organelos. Em plantas de *N. tabacum* expostas ao vento a regulação da expressão de genes de resposta a essa condição de *stress* ocorreu por uma via de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do próprio núcleo, enquanto em plantas expostas ao frio a expressão foi controlada por uma via de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do citoplasma. Estes resultados sugerem que a regulação da expressão da proteína nestes dois organelos celulares depende não apenas de vias distintas de sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  mas depende também da condição de *stress* imposta (Chauhan et al., 2017). Assim, no âmbito do presente trabalho, seria interessante validar a localização subcelular das JrCaM bem como identificar os fatores de transcrição com os quais as JrCaM interagem regulando a expressão de genes associados ao processo de enraizamento.

Para identificar algumas proteínas que estejam associadas ao EA interagindo com as JrCaM foi realizada uma análise STRING na plataforma UniProt. Na figura 27, são apresentadas as interações identificadas com a JrCaM1a (Jr04\_06300), similar ao resultado encontrado para as restantes JrCaM, sendo em todas elas visível uma associação com a Actina, a Histona H3, a *Kinesin-like calmodulin binding protein* e a Glutamina sintetase. A intensidade dessas interações surge relativamente constante entre as proteínas JrCaMs e as diferentes proteínas putativamente associadas. As actinas são proteínas bastante presentes nos microfilamentos estando por isso envolvidas em processos que envolvem a divisão celular (Pollard, 2008), renovação da cromatina, manutenção do DNA e regulação da transcrição (Bettinger et al., 2004; Miralles & Visa, 2006; Percipalle & Visa, 2006; Chen & Shen, 2007; Hurst et al., 2019). Por outro lado, as Histonas estão envolvidas na regulação da expressão génica por estarem envolvidas na condensação da cromatina (National Human Genome Research Institute, 2024). O EA é um processo que envolve a reprogramação a nível molecular associada à desdiferenciação de células já programada, para readquirirem as características de células meristemáticas e originarem uma nova via de desenvolvimento celular, estando assim relacionadas com alterações de expressão de genes, quer seja à sua ativação quer seja ao seu silenciamento (Terranova et al., 2006). Desta forma, o processo de formação de raízes adventícias, está relacionado



com uma intensa atividade mitótica, isto é, está associado a uma intensa atividade de replicação do DNA, implicando por isso um rearranjo na compactação do mesmo (Druege et al., 2019).



**Figura 27-** Esquema representativo das interações identificadas entre as JrCaM identificado no programa STRING (<https://string-db.org/>) Representado em bolas coloridas as possíveis proteínas previstas de interação com as seis JrCaM. Traços contínuos representado as diferentes intensidades de interações.

As *Kinesin-like calmodulin binding proteins* são proteínas motoras que utilizam energia ATP para transportar moléculas ao longo dos microtúbulos apresentando também um papel crucial na divisão celular. Estas proteínas desempenham funções durante a mitose, tais como a separação dos centrômeros dos cromossomas homólogos e fixação dos cromossomas ao fuso acromático (News-Medical, 2024). Estando o processo de EA

associado a um período de elevada atividade mitótica (Druege et al., 2019) é possível associar as proteínas *Kinesin-like calmodulin binding protein* a este processo biológico sendo responsáveis pela organização e movimentação dos cromossomas durante a mitose.

No âmbito do presente trabalho, que envolve a sinalização associada à resposta às auxinas, é a interação com a Glutamina Sintetase que apresenta, neste âmbito, maior relevância. Sabe-se que o seu papel está essencialmente relacionado com a catálise da síntese do aminoácido glutâmico, sendo este um aminoácido essencial em diversos processos biológicos (Adeva et al., 2012). Para Druege et al. (2019), quando ocorre um dano físico na planta é desencadeada uma via de sinalização que envolve a auxina AIA, direcionada para as células de um tecido específico, mais precisamente para as células do câmbio vascular, conduzindo a um processo de dediferenciação que culminará na formação de uma massa morfogénica e subsequente formação de primórdios radiculares. A presença da auxina é bastante importante no processo de enraizamento (Woodward & Bartel, 2005) e o envolvimento da Glutamina Sintetase, enquanto uma proteína associada ao aumento dos níveis de auxina endógena, permite associar o seu envolvimento no processo de formação de raízes adventícias (Lebedev et al., 2018). Em termos gerais, os níveis de AIA aumentam de forma proporcional ao aumento do conteúdo em glutamina (Lebedev et al., 2018), uma vez que este aminoácido promove a síntese do precursor triptofano, responsável pela biossíntese de AIA (Man et al., 2011).

#### 4.2. Classificação e Análise da Estrutura dos Genes *JrCaM*

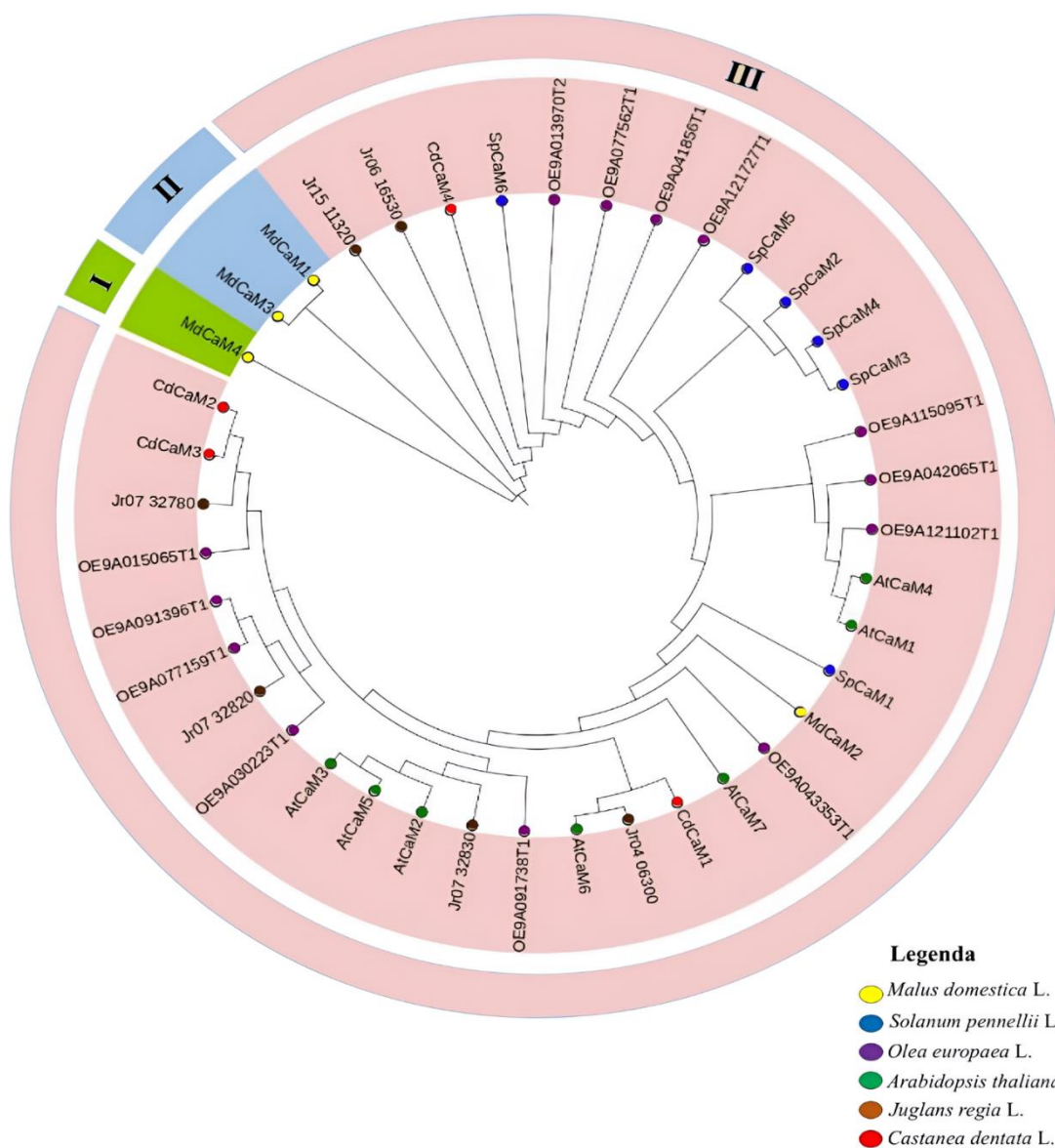
De modo a proceder à classificação dos genes *CaM* de *J. regia* foi seguida uma abordagem descrita para outras famílias génicas (Campos et al., 2021; Cardoso et al. 2022) que consistiu numa análise filogenética incluindo nesta análise sequências já classificadas noutras espécies vegetais. Nesta análise foram consideradas sequências de um total de cinco espécies pertencentes à classe Magnoliopsida. Os resultados mostram a distribuição das sequências por três grupos principais (Figura 28), o que poderá indicar a existência de três ancestrais comuns às sequências que integram cada um destes grupos, tal como proposto por Han et al. (2024). As sequências pertencentes a cada um dos grupos apresentam um nível de semelhança superior entre si do que quando comparadas com sequências integradas em grupos distintos. Vários autores referem que a integração de sequências num mesmo grupo estará relacionada não apenas com uma origem em comum (ancestral que durante a evolução permitiu o aparecimento de variabilidade ao nível das

sequências) mas com o desempenho de funções biológicas similares (Eisen et al., 1998; Do & Choi, 2008). Deste modo, o grupo I apresenta-se constituído por apenas uma CaM de *M. domestica*, enquanto o grupo II apresenta duas CaMs, ambas de *M. domestica*. O grupo III apresenta-se constituído pelas restantes 37 CaMs que incluem as sequências das cinco espécies, incluindo todas as JrCaMs. Das sequências que integram o grupo III é de notar que as sequências de JrCaMs são filogeneticamente mais próximas das sequências de *C. dentata* L., espécie pertencente à mesma família *Fagaceae*, confirmando assim a sua maior proximidade filogenética e uma divergência evolutiva mais recente comparativamente às outras espécies que pertencem às diferentes famílias (*Rosaceae*, *Solanaceae*, *Oleaceae* e *Brassicaceae*).

Em relação à nomenclatura, contrariamente com o que é referido para outras famílias génicas (Campos et al., 2021; Cardoso et al. 2022), verificou-se a inexistência de uma uniformidade relativamente à atribuição dos nomes quando comparados os membros das diferentes espécies consideradas na construção do dendrograma. Desta forma, o critério seguido no presente trabalho com o objetivo de atribuir uma nomenclatura aos genes *JrCaMs* teve por base a posição dos genes no genoma de *J. regia* (Tabela 8) e o nível de similaridade entre as sequências.

Para análise da similaridade foi elaborada uma matriz de identidade utilizando a região codificante de cada sequência génica. Como ilustrado na Tabela 7 foi revelado um nível de similaridade de ~ 93% entre os genes *Jr04\_06300* e *Jr07\_32780* e de ~94% entre os genes *Jr07\_32820* e *Jr07\_32830*. Tendo em conta a similaridade encontrada, colocou-se como hipótese que cada um destes dois pares de genes possa ser resultado de eventos de duplicação mais recentes sendo o nível de variabilidade entre as sequências ainda baixo (Cardoso et al., 2022). Assim, a classificação proposta para esta família génica é de quatro subfamílias (*JrCaM1*, *JrCaM2*, *JrCaM3* e *JrCaM4*), sendo as subfamílias *JrCaM1* e *JrCaM3* constituídas por dois membros (*JrCaM1a* e *JrCaM1b*; *JrCaM3a* e *JrCaM3b*) e as subfamílias *JrCaM2* e *JrCaM4* constituídas por apenas um membro. Membros da mesma subfamília apresentam um tamanho da sequência genómica muito similar e partilham a mesma estrutura génica (tabela 8). A estrutura exão-intrão fornece evidências significativas que apoiam as relações filogenéticas dentro de uma família de genes (Liu et al., 2014), o que de facto se confirma no dendrograma da figura 28 com a proximidade filogenética visível entre membros *JrCaM* que apresentam a mesma estrutura – os genes *JrCaM1b*, *JrCaM1a* e entre os genes *JrCaM3a* e *JrCaM3b*. Este elevado nível de similaridade apresentada pelos diferentes membros de uma família génica poderá estar

associado ao desempenho de funções muito similares pela proteína codificada (Shiu & Bleeker, 2003).



**Figura 28** - Dendrograma onde é mostrada a relação filogenética entre 40 sequências peptídicas de CaM de seis espécies da classe Magnoliopsida, incluindo *Juglans regia* L. O dendrograma foi obtido utilizando o método MUSCLE do software MEGA11 (versão 11). O dendrograma foi construído segundo o método *Neighbor-Joining* com análise de bootstrap utilizando 1000 réplicas no software MEGA11 (versão 11). Para visualização gráfica do resultado foi utilizado o programa iTOL (<https://itol.embl.de/>). O Grupo I encontra-se identificado a azul, o Grupo II a rosa e o Grupo III a verde. Ponto colorido a amarelo representa as CaM de *M. domestica*, a azul de *S. pennellii*, a roxo de *O. europaea*, a verde de *A. thaliana*, a castanho de *J. regia*, e a vermelho de *Castanea dentata* L.

**Tabela 7** – Matriz de Identidade (*Sequence Identity Matrix*) obtida pelo *software* BioEdit mostrando o nível de semelhança entre as seis sequências codificantes (CDS) de *J. regia* identificadas como pertencentes à família das CaMs.

ID	<i>Jr04_06300</i>	<i>Jr07_32780</i>	<i>Jr07_32820</i>	<i>Jr07_32830</i>	<i>Jr06_16530</i>	<i>Jr15_11320</i>
<i>Jr04_06300</i>	ID	<b>0,929</b>	0,718	0,725	0,525	0,523
<i>Jr07_32780</i>	<b>0,929</b>	ID	0,709	0,718	0,51	0,502
<i>Jr07_32820</i>	0,718	0,709	ID	<b>0,936</b>	0,47	0,463
<i>Jr07_32830</i>	0,725	0,718	<b>0,936</b>	ID	0,481	0,471
<i>Jr06_16530</i>	0,525	0,51	0,47	0,481	ID	0,757
<i>Jr15_11320</i>	0,523	0,502	0,463	0,471	0,757	ID

ID: Código identificativo da sequência

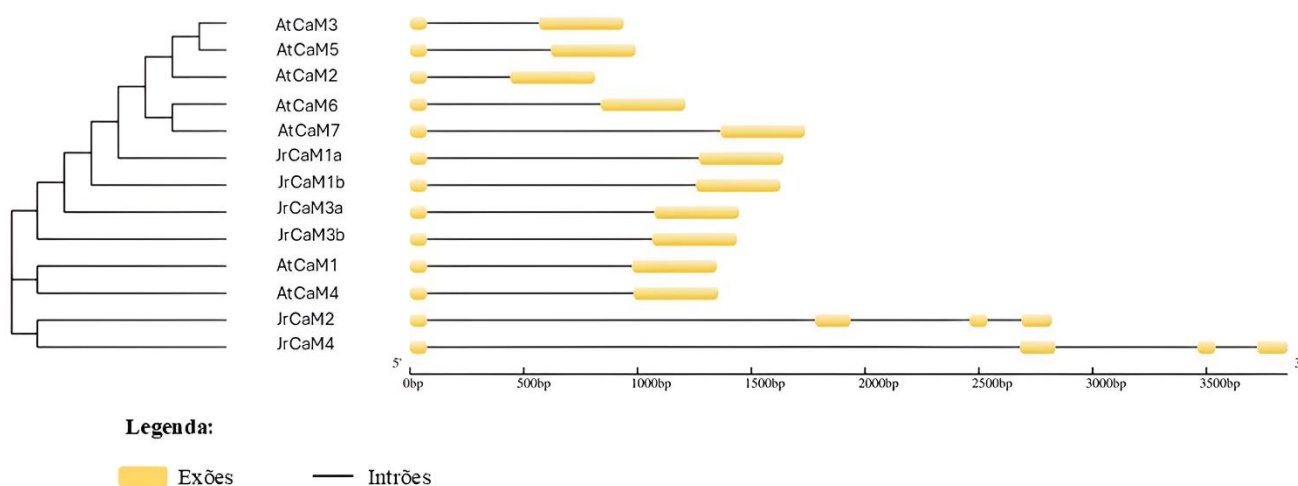
**Tabela 8** - Informações relativas aos diferentes membros CaM de *Juglans regia* L., obtidas através da base de dados do Ensemble Plants (disponível em <https://plants.ensembl.org/index.html>).

Gene	ID	Cro	Posição no genoma	Orientação	gDNA (pb)	ORF (pb)	Nº exões
<i>JrCaM1a</i>	<i>Jr04_06300</i>	4	<a href="#">12354733-12356369</a>	-	1643	450	2
<i>JrCaM1b</i>	<i>Jr07_32780</i>	7	<a href="#">47546968-47548590</a>	-	1629	450	2
<i>JrCaM2</i>	<i>Jr06_16530</i>	6	<a href="#">33493315-33496130</a>	+	2822	450	4
<i>JrCaM3a</i>	<i>Jr07_32820</i>	7	<a href="#">47674214-47675654</a>	+	1447	450	2
<i>JrCaM3b</i>	<i>Jr07_32830</i>	7	<a href="#">47710835-47712266</a>	-	1438	450	2
<i>JrCaM4</i>	<i>Jr15_11320</i>	15	<a href="#">17725506-17729356</a>	+	3857	450	4

Gene: nomenclatura proposta para os membros da família *CaM* em *Juglans regia* L.; ID: Código identificativo da sequência; Cro: cromossoma; gDNA: DNA genómico (pb); ORF: *Open Reading Frame* (pb).

Da análise da estrutura dos genes *JrCaM* verificou-se que todos apresentavam a estrutura característica dos genes em organismos eucariotas, constituída por sequências codificantes (exões) interrompidas por sequências não codificantes de proteínas (intrões). De entre os seis *JrCaMs* verificou-se que quatro membros apresentam uma estrutura caracterizada pela presença de dois exões interrompida por um longo intrão (> 1kb) – *JrCaM* (*JrCaM1a*, *JrCaM1b*, *JrCaM3a* e *JrCaM3b*), estrutura esta também visível em três membros *AtCaM*. Diversos trabalhos sugerem esta estrutura de dois exões e um intrão como sendo a mais comum dos genes *CaM* entre diversas espécies vegetais (Watillon et al., 1992; Chandra et al., 1994; Takezawa et al., 1995; Choi et al., 1996; Yang et al., 1996, Shi & Du 2020).

Os restantes dois membros que integram a família *CaM* de *J. regia*, *JrCaM4* e *JrCaM2*, apresentam uma estrutura mais complexa, constituída por quatro exões e três intrões, integrando um grupo distinto na análise filogenética (figura 29). Várias referências na literatura sugerem que os genes *CaMs* com estruturas mais complexa, com três a quatro exões, são menos comuns (Watillon et al., 1992; Chandra et al., 1994; Takezawa et al., 1995; Choi et al., 1996; Yang et al., 1996). No entanto, são exemplo membros identificados em *S. pennelli* e *T. aestivum* com mais que dois exões na sua estrutura (Shi & Du, 2020; Liu et al., 2022). De acordo com Shi & Du (2020), os genes que possuem estruturas mais complexas são resultado de um processo evolutivo mais recente que levou à sua divergência genética relativamente aos restantes membros da mesma família génica e que no caso particular de *J. regia* poderá ter passado pelo ganho de dois intrões, hipótese levantada quando comparado o tamanho dos exões nas diferentes sequências.



**Figura 29** - Relação filogenética e estrutura de genes de *JrCaMs* e *AtCaMs*. Representado à esquerda encontra-se a árvore filogenética dos genes de *JrCaMs* e *AtCaMs*, obtida através do método *Neighbor-Joining* com análise de bootstrap utilizando 1000 réplicas no software MEGA11 (versão 11). Representado à direita encontra-se a estrutura dos genes de *JrCaM* e *AtCaM*, obtida através do programa GSDS (versão 2.0). As linhas contínuas a preto representam os intrões e as caixas a amarelo representam os exões. Para a representação gráfica foram consideradas as sequências genómicas e codificantes (CDS).

Apesar da variabilidade observada ao nível da estrutura, todos os *JrCaMs* apresentam o tamanho do primeiro exão conservado com 76 pb (Tabela 9). Ao nível dos restantes exões, os quatro membros que partilham a estrutura de dois exões – *JrCaM1a*,

*JrCaM1b*, *JrCaM3a* e *JrCaM3b* – possuem o seu segundo exão composto pelo mesmo número de nucleótidos (374 pb). Os outros dois membros, que apresentam a estrutura de quatro exões – *JrCaM2* e *JrCaM4* – apresentam o tamanho conservado ao nível dos restantes três exões, com 158 pb, 81 pb e 135 pb, respetivamente. De notar que o somatório destes 3 exões corresponde a 374 pb, o mesmo tamanho do segundo exão dos genes *JrCaM* com a estrutura de dois exões, sugerindo que estes dois genes terão sofrido um processo evolutivo semelhante a partir de um exão ancestral comum, conduzindo à formação de exões com o consequente ganho de dois intrões. Eventos de ganho e perda de intrões são reportados como os eventos mais associados à evolução dos genes (Babenko et al., 2004).

Contrariamente ao elevado nível de conservação observado ao nível dos exões, os intrões apresentam um nível de variação mais elevado. Estas regiões, por serem sequências com menor importância ao nível da variação fenotípica encontram-se mais sujeitas às forças evolutivas, sendo por natureza sequências muito variáveis (Chamary & Hurst, 2004; Gaffney & Keightley, 2006). Estas variações de tamanho que ocorrem ao nível dos intrões estão relacionadas com a sua função na regulação da expressão génica, pelo facto de poderem ter integradas em si sequências regulatórias (Fiume et al., 2004). Resultados similares foram reportados em diferentes famílias génicas em diversas espécies, sendo exemplo a família de genes *AOX* (do inglês: *Alternative Oxidase*) caracterizada em cenoura (*Daucus carota* L.) com intrões que variam entre 173 e 630 pb e dos genes *PIN* caracterizada em oliveira com intrões que variam entre 66 e 6370 pb (Campos et al., 2016; Cardoso et al., 2022).

O dendrograma representado na Figura 29, que integra apenas as sequências proteicas de *JrCaMs* e *AtCaMs*, revelou a existência de um nível de similaridade superior entre sequências das duas espécies do que entre as sequências da própria espécie. Esta similaridade entre sequências de diferentes espécies é explicada pela similaridade de funções que podem desempenhar nas diferentes espécies. O envolvimento das diferentes isoformas em processos biológicos distintos, nomeadamente o desenvolvimento e a tolerância a diversas condições de *stress*, foi apontado por vários autores. São exemplos o envolvimento da *AtCaM3* na tolerância ao calor (Zhang et al., 2009; Zhou et al., 2009) e das *AtCaM1* e *AtCaM4* na tolerância à salinidade (Zhou et al., 2016).

**Tabela 9-** Informação sobre tamanho dos exões e intrões nos diferentes membros *CaM* de *Juglans regia* L., obtidos através do *software* GSDS (disponível em <https://gsds.gao-lab.org/>).

ID	Exões (pb)				Intrões (pb)		
	1	2	3	4	1	2	3
<i>JrCaM1a</i>	76	374	--	--	1193	--	--
<i>JrCaM1b</i>	76	374	--	--	1179	--	--
<i>JrCaM3a</i>	76	374	--	--	997	--	--
<i>JrCaM3b</i>	76	374	--	--	988	--	--
<i>JrCaM2</i>	76	158	81	135	1703	521	148
<i>JrCaM4</i>	76	158	81	135	2604	622	181

ID: Código identificativo da sequência

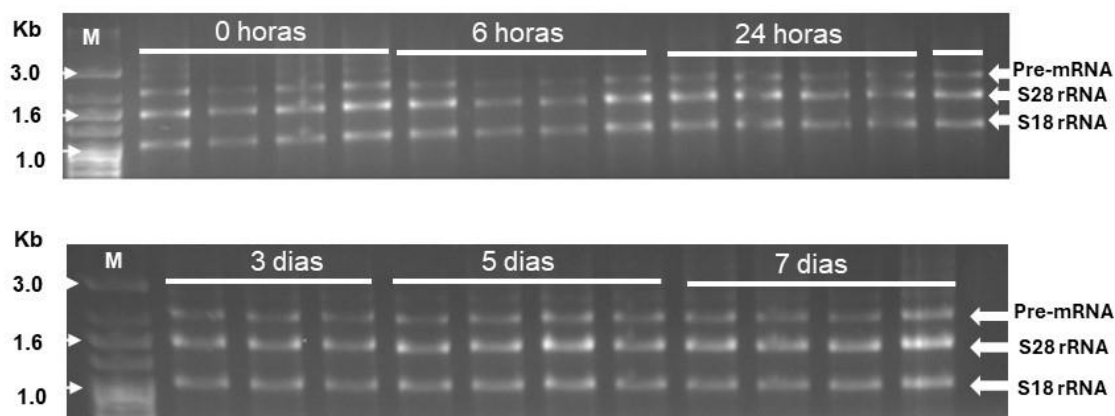
### 4.3. Análise da Expressão dos Genes *JrCaM* na Formação de Raízes Adventícias

#### 4.3.1. Determinação da concentração e análise da integridade e pureza das amostras de RNA total

Após o processo de extração do RNA total das amostras do ensaio de enraizamento realizado com os dois genótipos, procedeu-se à determinação da sua concentração bem como à análise da pureza e integridade das mesmas. Os resultados obtidos por espectrofotometria permitiram visualizar o padrão de absorbância característico dos ácidos nucleicos com uma curva sigmóide bem definida em todas as amostras (Figura Suplementar – Figura 1). Os valores de concentração variaram entre 49,1 e 309,4 ng/μL (Tabela Suplementar – Tabela 1 e 2), o que permitiu considerar a realização da reação de transcrição reversa com 0.5 μg de RNA total para todas as amostras. A avaliação da pureza das amostras revelou rácios de absorbância 260/280 que variaram entre 1.9 a 2.2 e de 260/230 que variaram entre 1.1 a 1.9, revelando alguma contaminação, ainda que pouco significativa, por proteínas ( $A_{280}$ ) e compostos orgânicos, fenóis ou sais ( $A_{230}$ ). De acordo com o Boletim Técnico da Thermo Scientific (2012), as soluções de RNA que apresentem valores de  $A_{260/280}$  próximo de 2.0 e  $A_{260/230}$  entre 2.0 e 2.2, são consideradas puras, podendo por isso ser utilizadas em trabalhos que considerem a síntese de DNA complementar (cDNA). Os valores dos rácios das absorvâncias obtidas ao estarem bastante próximos dos valores padrão permitiram seguir com o trabalho de análise de expressão génica.



Para concluir acerca da integridade do RNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose. O resultado revelou a presença das duas bandas bastante nítidas ( $\sim 1$  Kb e  $\sim 1.6$  Kb), sem arrastamento que fosse indicativo de degradação do RNA e a ausência de bandas correspondentes a DNA contaminante em todas as amostras de ambos os genótipos ‘Chandler’ e ‘Paradox’ (gel representativo visível na Figura 30). Segundo Aranda et al. (2012) a presença de duas bandas distintas é indicativa de RNA de elevada qualidade, sendo por norma a banda correspondente à subunidade 28S rRNA mais intensa que a banda correspondente a 18S rRNA. Nos organismos eucariotas, a subunidade 28S rRNA apresenta  $\sim 4,7$  Kb, enquanto a subunidade 18S rRNA apresenta  $\sim 1,8$  Kb. Em *A. thaliana*, verificou-se que as subunidades 28S e 18S de rRNA apresentavam por volta de 4 Kb e 1,6 Kb respetivamente (Keren et al., 2011). Em amostras de RNA extraídas de ‘Paradox’ foi possível observar uma banda de peso superior à banda de 28S rRNA, a qual corresponderá a transcritos presentes em elevada concentração, ou a RNA imaturo (Pre-mRNA), molécula da qual derivam as subunidades 28S e 18S (Eun, 1996), o que seria de interesse investigar futuramente por se apresentar característico do híbrido ‘Paradox’.



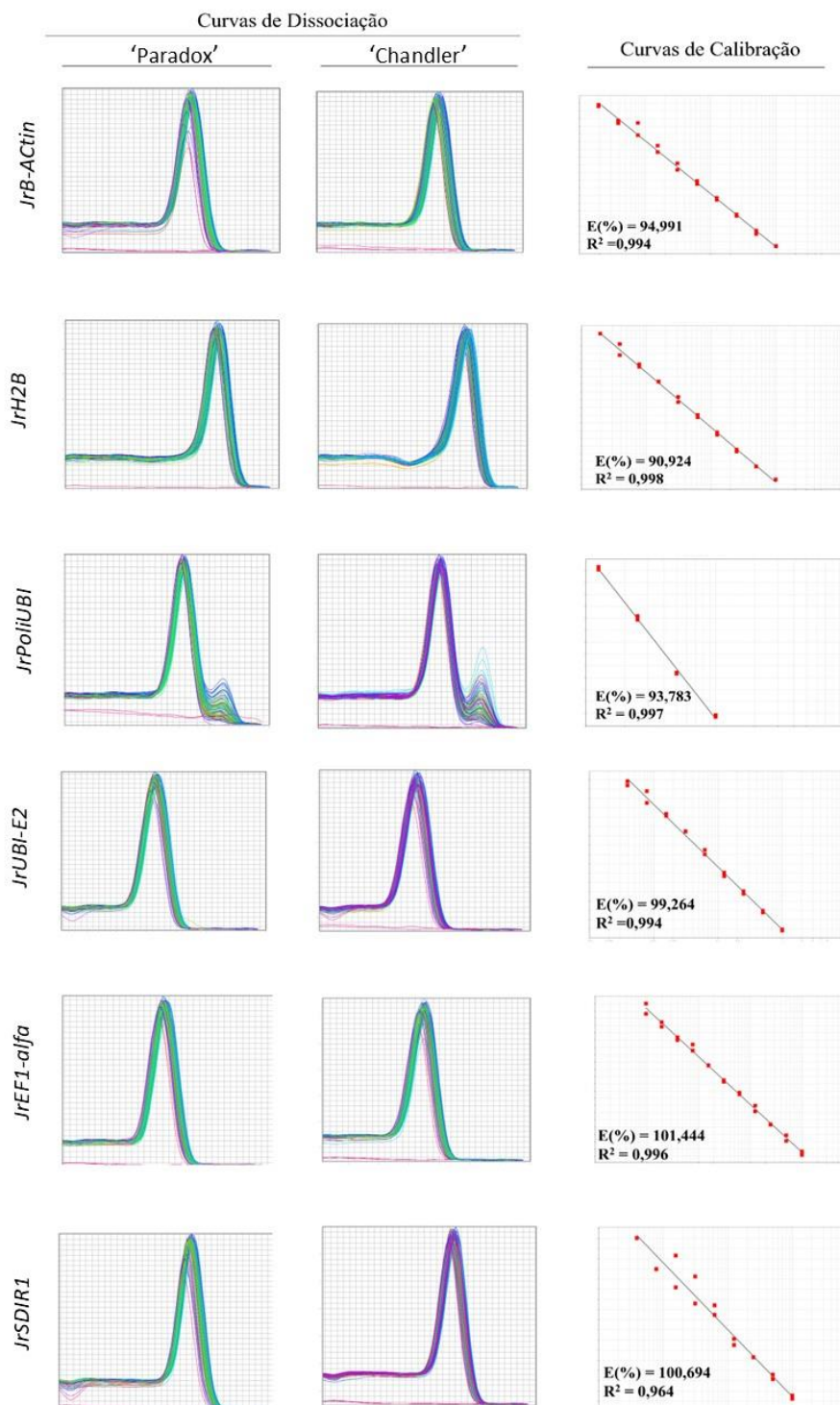
**Figura 30-** Imagem representativa dos géis de agarose obtidos após eletroforese do RNA total. Os géis correspondem às amostras não induzidas com AIB (controlo) do ensaio com o híbrido ‘Paradox’ (A). De notar as duas bandas correspondentes aos RNA das subunidades ribossomais 18S e 28S e uma de peso superior correspondente a transcritos. M: marcador molecular NZYDNA Ladder VII /NZytech, Portugal).

#### 4.3.2.1. Seleção dos genes de referência

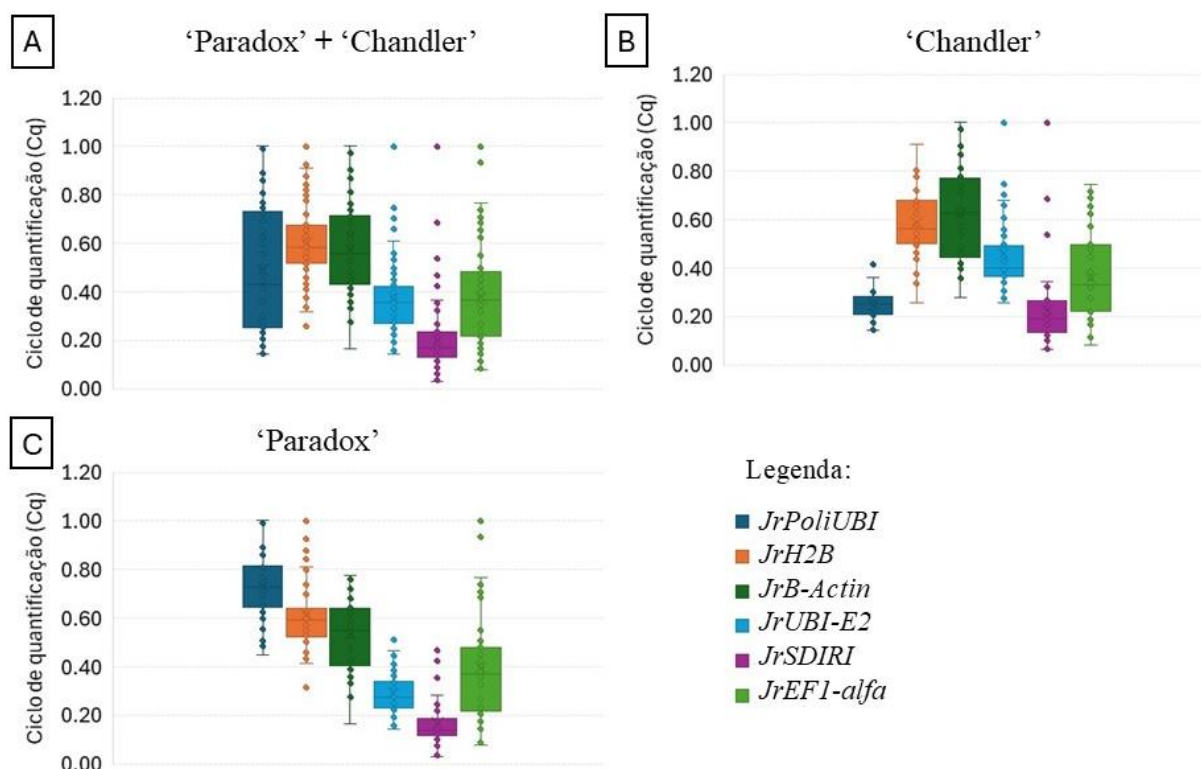
Para os seis genes candidatos a genes de referência foi avaliada a especificidade e a eficiência da reação. A eficiência ( $E\%$ ), que se traduz na síntese de duas cadeias a partir de uma cadeia molde a cada ciclo de PCR, gerando assim um aumento exponencial do número de duplas cadeias amplificadas, deve apresentar valores situados no intervalo 90% – 105% (Bio-Rad Laboratories, 2006). Para os seis genes candidatos a genes de referência foram obtidos valores dentro do intervalo referido, com o gene *JrH2B* (90,9%) a apresentar o valor de eficiência mais baixo e o gene *JrEF1-alfa* o valor mais elevado (101,4%) (figura 31). De um modo geral os valores de  $R^2$  para os seis genes foram superiores a 0,980, o que significa um ótimo ajuste dos valores de Cq das diferentes amostras em relação ao modelo linear ajustado. Apenas o gene *JrSDIR1* apresentou valores de  $R^2$  abaixo do valor de referência (0,964) (figura 31).

Relativamente à análise da especificidade, como é possível verificar na figura 31, as curvas de dissociação resultantes da análise de cada gene apresentam um pico de dissociação único, o que significa que para todas as amostras foi amplificado o mesmo fragmento, permitindo concluir que os *primers* são específicos para o respetivo gene, não se ligando a outras regiões inespecíficas e consequentemente amplificando outros fragmentos.

Os resultados obtidos da amplificação dos seis genes candidatos a genes de referência foram analisados no sentido de identificar os genes mais estáveis entre as amostras consideradas no ensaio. A figura 32 apresenta os diagramas de bigodes, representando a dispersão dos valores dos ciclos de quantificação (Cq) dos genes candidatos a genes de referência, homólogos para *J. regia*. Os valores de Cq demonstram que existe variação na expressão dos diferentes genes, quando os mesmo são analisados de forma conjunta (Figura 32-A), bem como, de forma independente em cada genótipo (Figura 32- B, C). Por exemplo, o gene *JrSIDR1* apresenta ser um dos genes mais estáveis por apresentar uma menor dispersão dos valores de Cq. Por outro lado, os genes *JrB-Actin* e *JrEF1-alfa* apresentam maior dispersão dos dados, logo, maior variabilidade entre amostras. De notar ainda que os níveis de expressão observados para o gene *JrPoliUBI* diferem em ambos os genótipos, sendo os valores de Cq mais elevados em ‘Paradox’ comparativamente a ‘Chandler’. A forma como cada um destes genótipos poderá responder aos tratamentos aplicados neste estudo (inoculação em meio com AIB e inoculação em meio de controlo), poderá ser a principal razão pela diferença observada ao nível da expressão dos genes em estudo.



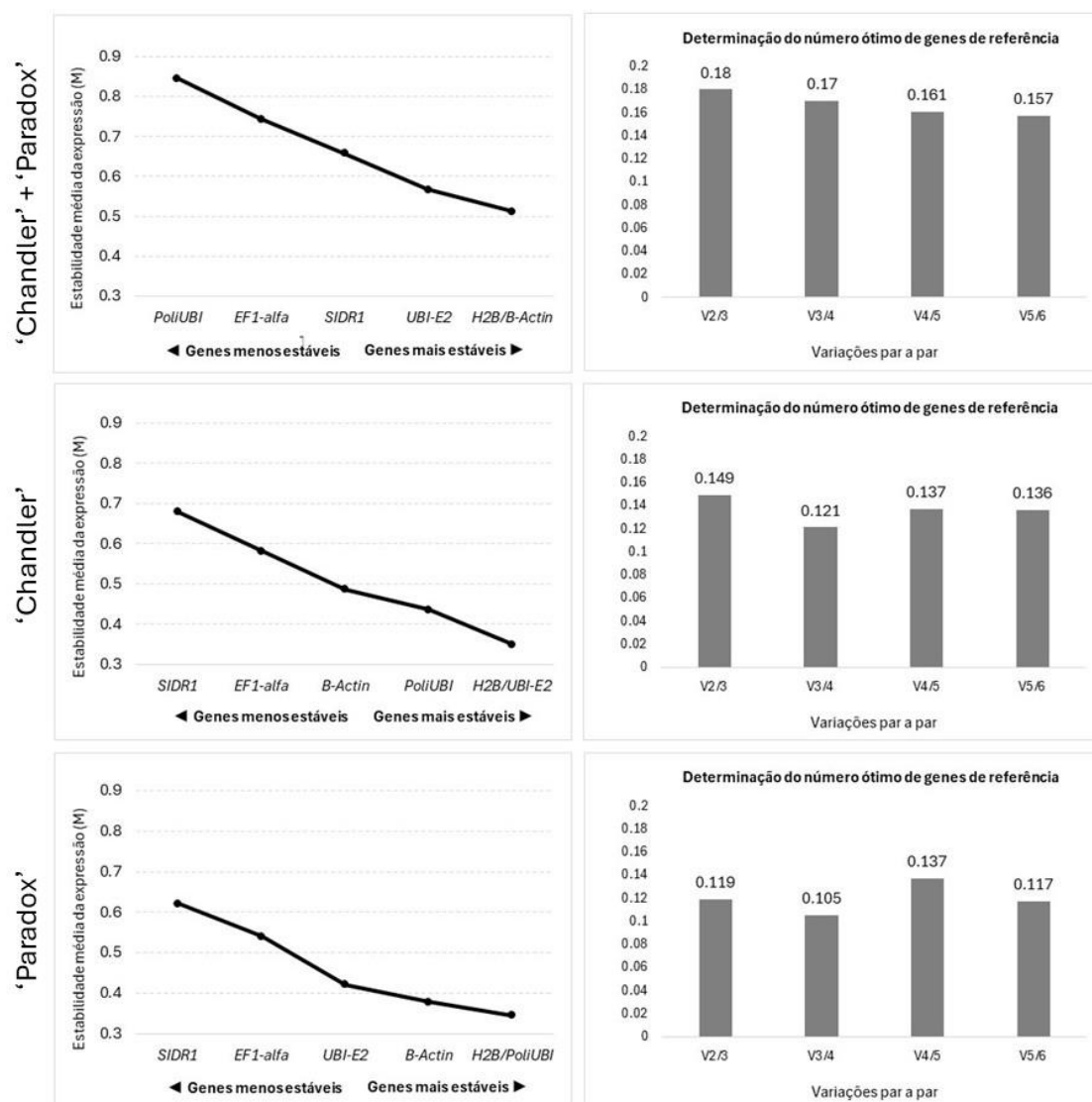
**Figura 31** - Curvas de dissociação e curvas de calibração obtidas por análise RT-qPCR dos genes candidatos a genes de referência – *JrB-Actin*, *JrH2B*, *JrPoliUBI*, *JrUBI-E2*, *JrEF1-alfa* e *JrSDIR1*. Valores da eficiência de reação ( $E\%$ ) e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), encontram-se representados, no canto inferior esquerdo do gráfico da curvas padrão de cada gene.



**Figura 32** - Diagramas de bigodes apresentando a distribuição dos valores de Cq (ciclo de quantificação) dos diferentes genes candidatos a genes de referência nos dois genótipos em estudo. (A) 'Paradox' + 'Chandler': representação dos valores de Cq integrando os valores obtidos nos dois genótipos; (B, C) 'Chandler' e 'Paradox': representação dos valores de Cq obtidos em cada genótipo separadamente.

Os valores de Cq foram transformados em valores de quantidades relativas (QR) e estes valores foram os utilizados para a análise no GeNorm (Figura 33). Este programa determina o nível de estabilidade (M) definida como a variação média de um gene específico com todos os outros genes, sendo que genes com os valores M mais baixos apresentam uma expressão mais estável (valor de M deverá ser  $\leq 1,5$ ) (Vandesompele et al., 2002). Os resultados obtidos considerando a análise dos seis genes nos dois genótipos em simultâneo ou fazendo a análise em separado para cada genótipo mostraram um valor de M inferior a 1,5. No entanto, em adição ao valor de M deve ser considerado também o valor de V, um valor resultante da análise da variação pareada de cada gene com todos os outros genes, candidatos a genes de referência, devendo este ser  $\leq 0,15$  (Vijayakumar & Sakuntala, 2024). Os resultados obtidos quando integradas os dois genótipos mostram valores de  $V > 0,15$ , não tendo sido por isso possível identificar nenhuma combinação entre os genes candidatos a genes de referência que permitisse proceder à análise dos

genes de interesse em ambos os genótipos. Na tentativa de identificar a melhor combinação entre os genes candidatos para cada genótipo foi realizado o cálculo do valor de V para cada genótipo separadamente. Desta análise foi possível obter valores de V inferiores a 0.15 para ambos os genótipos quando considerada a combinação de três genes de referência (0.121 em ‘Chandler’ e 0.105 em ‘Paradox’).



**Figura 33** – Representação dos resultados obtidos da análise GeNorm dos genes selecionados como candidatos a genes de referência. Representado à esquerda encontra-se a estabilidade dos genes candidatos a genes de referência com base no cálculo do valor de M (medida de estabilidade nos níveis de expressão génica) utilizando o software geNorm (valores de  $M < 1.5$  indicam expressão génica estável, enquanto valores de  $M > 1.5$  indicam expressão génica instável). Representado à direita está a determinação do número ideal de genes de referência com base na

análise da variação par a par (V) dos fatores de normalização dos genes candidatos a genes de referência. Esta análise permitiu identificar o número mínimo de genes de referência necessários para a normalização dos dados de RT-qPCR em cada genótipo ('Chandler' e 'Paradox') separadamente e considerando ambos os genótipos em conjunto ( $V = V_n/V_{n+1}$ , devendo V ser inferior a 0.15).

Ainda que em ambos os genótipos seja necessário considerar três genes de referência, os genes mais estáveis não são comuns, o que já era espectável uma vez que o valor de V foi superior a 0.15 quando analisados os dados em conjunto. Assim, para 'Chandler' foram considerados os genes *JrPoliUBI*, *JrH2B* e *JrUBI-E2* para o cálculo do fator de normalização, enquanto para 'Paradox', foram considerados os genes *JrPoliUBI*, *JrH2B* e *JrB-Actin*.

#### 4.3.2. Análise da expressão dos genes *JrCaM*

##### 4.3.2.1. Análise de eficiência e especificidade da reação

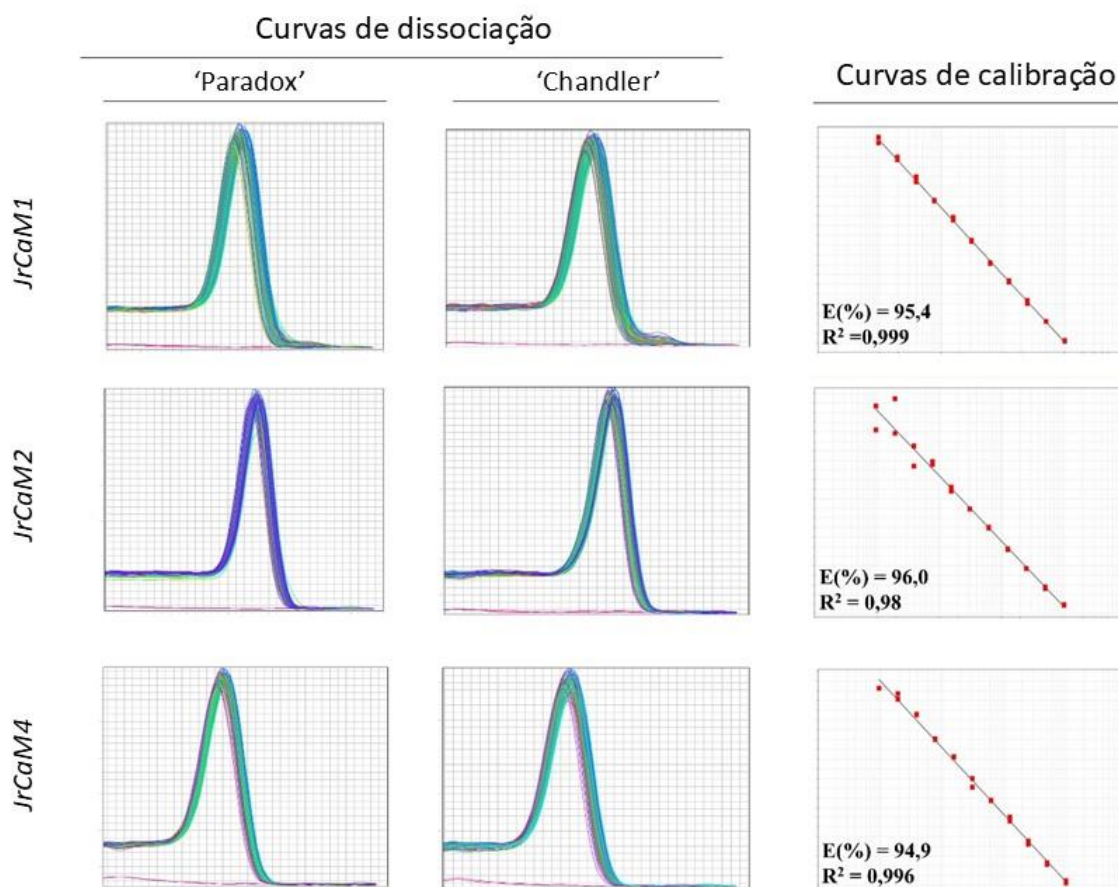
O elevado nível de semelhança entre as sequências *JrCaM1a* e *JrCaM1b* impossibilitou o desenho de *primers* específicos para cada um destas sequências, pelo que os valores de expressão apresentados para *JrCaM1* integram simultaneamente estes dois genes.

Para os genes *JrCaM3a* e *JrCaM3b* não foi possível realizar a análise da expressão génica visto que os baixos valores de Cq obtidos impossibilitaram o trabalho relativo à construção da curva padrão. Este resultado estará associado à baixa transcrição destes genes nas condições experimentais em estudo, pelo que provavelmente o seu papel no processo de EA será pouco relevante. Contrariamente, para os genes *JrCaM1*, *JrCaM2* e *JrCaM4* foi possível realizar a análise da expressão génica por RT-qPCR uma vez que os valores de Cq destes genes indicaram amplificação eficiente com níveis de transcrito mais elevados, sugerindo assim um potencial envolvimento no processo de enrizamento adventício.

A análise da curva padrão realizada para os genes *JrCaM1*, *JrCaM2* e *JrCaM4* revelou valores de *E* dentro do intervalo referido anteriormente (90 - 105%, Bio-Rad Laboratories, 2006). Foi possível verificar que os três genes *JrCaMs* apresentaram valores de *E* superiores a 90% de eficiência, com o gene *JrCaM2* a apresentar 96,0%, o gene *JrCaM1* 95,4% e o gene *JrCaM4* 94,9%. Deste modo, pode afirmar-se que, para

estes três genes *JrCaMs*, a cada ciclo de PCR, foram sintetizadas duas novas cadeias a partir da cadeia molde, aumentando assim exponencialmente o número de duplas cadeias. Os valores de  $R^2$  registrados, apresentaram ser iguais ou superiores a 0,980, para *JrCaM1*, *JrCaM2* e *JrCaM4*, com valores de 0.999, 0.98 e 0.996 respectivamente, o que significa um ótimo ajuste dos valores de  $C_q$  das diferentes amostras, em relação ao modelo linear ajustado.

Relativamente à especificidade da reação, como é possível verificar na figura 34, as curvas de dissociação resultantes das *JrCaMs*, apresentaram, da mesma forma que obtido na análise para os candidatos a genes de referência, apenas um pico de dissociação, revelando elevado nível de especificidade e consequentemente a possibilidade de os utilizar na análise do ensaio de enraizamento.



**Figura 34** - Curvas de dissociação e curvas de calibração obtidas por análise RT-qPCR dos genes *JrCaMs* - *JrCaM1*, *JrCaM2* e *JrCaM4*. Valores da eficiência de reação ( $E$ ) e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), encontram-se apresentados no canto inferior esquerdo do gráfico das curvas padrão de cada gene.

#### 4.3.2.2. Análise da expressão dos genes *JrCaM* na formação de raízes adventícias

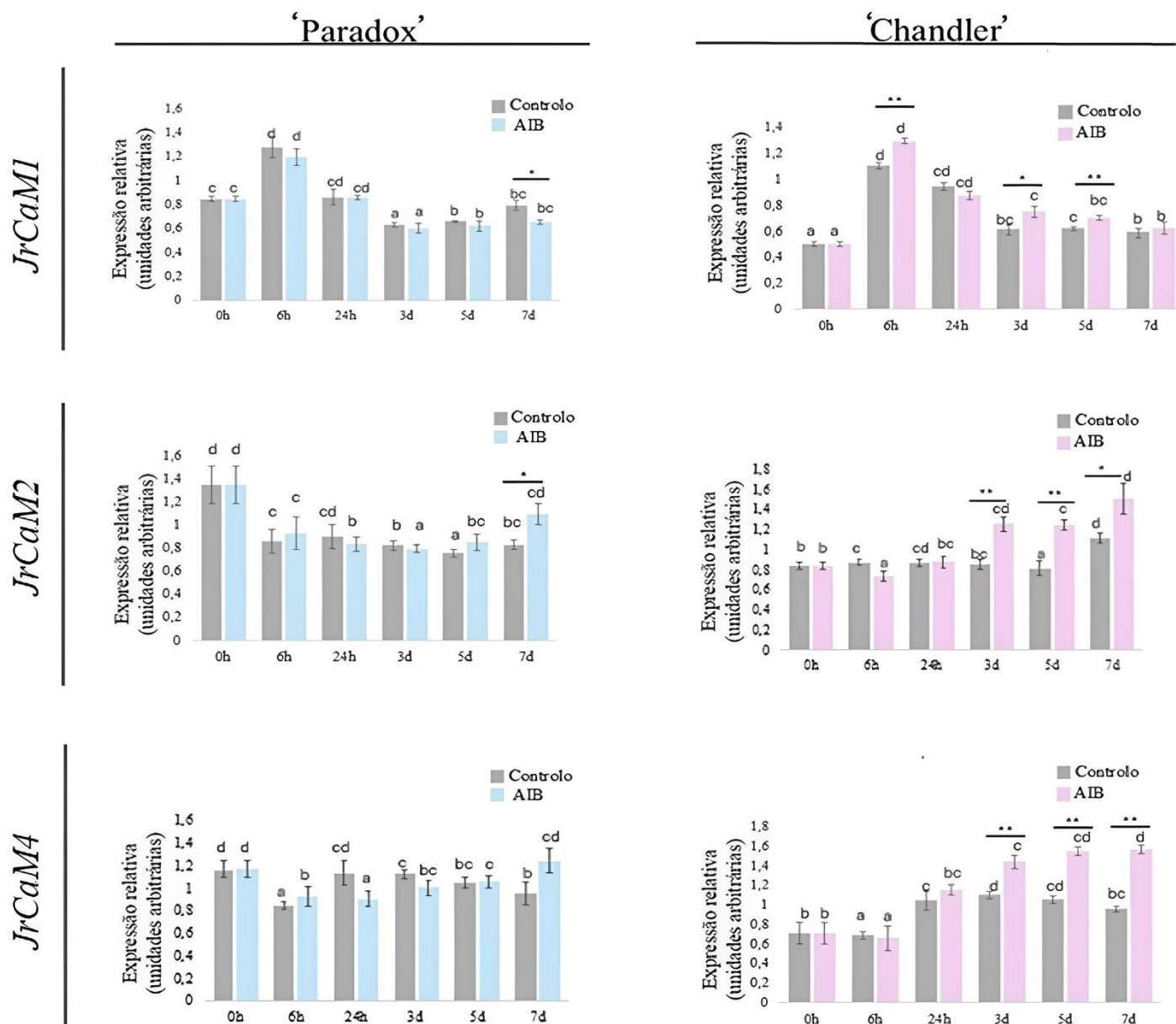
As CaMs são proteínas envolvidas na resposta a diversos *stresses* abióticos, tais como o *stress* oxidativo, exposição a metais pesados, frio, seca, temperaturas elevadas e salinidade (Zhang, W. et al., 2009; Zhou et al., 2009; Zhou et al., 2016; Chauhan et al., 2017). A análise do padrão de expressão dos diferentes *JrCaM* foi realizada nos genótipos ‘Paradox’ e ‘Chandler’ ao longo de um ensaio de enraizamento onde foram considerados para análise amostras recolhidas em diferentes momentos: 0h (imediatamente após preparação da plântula), 6h, 24h, 3d, 5d e 7d após inoculação da plântula no meio de cultura de indução do enraizamento (com AIB e sem AIB - controlo). A análise da expressão dos genes *JrCaM* permitiu verificar que três dos seis genes apresentaram uma expressão diferencial ao longo do processo de EA em ambos os genótipos (*JrCaM1*, *JrCaM2* e *JrCaM4*) (Figura 35). O gene *JrCaM1*, que integra simultaneamente os níveis de expressão dos genes *JrCaM1a* e *JrCaM1b*, apresentou-se como um gene com expressão mais precoce, de resposta mais imediata ao *stress* provocado pelo corte e pelo tratamento com auxina, e os dois genes *JrCaM2* e *JrCaM4* com uma resposta mais tardia, em particular visível na cv. ‘Chandler’, associada ao tratamento com a auxina indutora do EA. Para melhor perceção desta dinâmica de expressão dos três genes nos dois genótipos foi construído um heatmap, apresentado na figura 36.

Relativamente ao gene *JrCaM1* foi possível verificar que o padrão de expressão se apresentou similar nos dois genótipos e em ambas as condições de estudo (AIB e controlo), caracterizado por um aumento do nível de transcrito às 6h, momento em que atinge o pico máximo com diferenças significativas no genótipo ‘Chandler’, para diminuir de seguida em ambos os genótipos e condições. No genótipo ‘Paradox’ os níveis de expressão atingiram os valores mínimos aos 3d, sendo visíveis valores de expressão abaixo dos valores basais (0h), enquanto na ‘Chandler’ a diminuição foi progressiva até final do ensaio (7d), momento em que atingiu os valores mínimos (ainda significativamente superiores aos valores de expressão basal). Comparando as duas condições (AIB e controlo) verificou-se que no genótipo ‘Paradox’ esta descida da expressão no gene *JrCaM1* foi muito semelhante em ambas as condições, sendo visíveis diferenças significativas apenas aos 7d com valores ligeiramente superiores na condição controlo. Na cv. ‘Chandler’ a descida nos valores de expressão foi mais pronunciada na condição controlo comparativamente à condição AIB, sendo nessa condição visíveis diferenças significativamente inferiores aos 3d e 5d. O potencial envolvimento do gene *JrCaM1* no processo de EA foi visível apenas no genótipo ‘Chandler’, onde existem

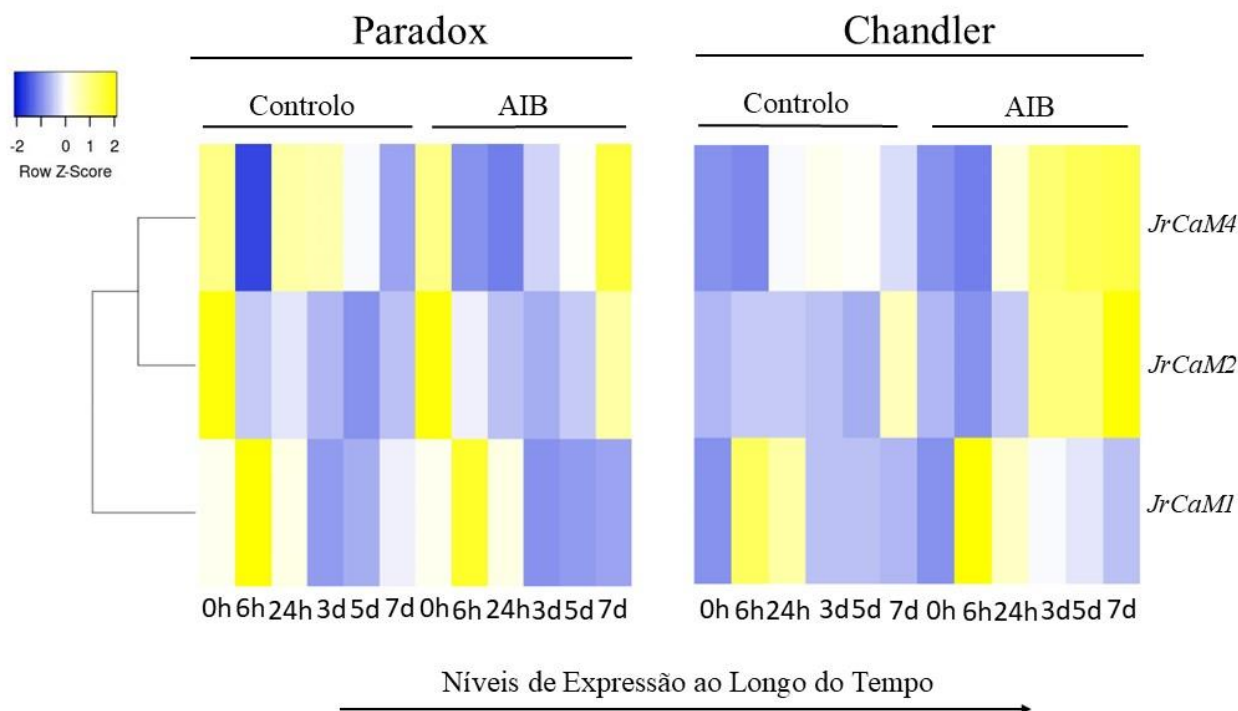


diferenças significativas logo no tempo mais precoce (6h) quando comparadas as duas condições. No híbrido ‘Paradox’ este envolvimento não é notório devido à inexistência de diferenças significativas entre AIB e controle. O pico de expressão visível às 6h em ambas condições e em ambos os genótipos é indicativo do envolvimento deste gene na resposta ao corte.

Relativamente aos genes *JrCaM2* e *JrCaM4*, contrariamente ao gene *JrCaM1*, o padrão de expressão revelou ser diferente entre os dois genótipos. Regra geral, em ‘Chandler’, em particular associado à condição AIB, foi visível um aumento progressivo da expressão destes genes com início às 24h (*JrCaM4*) e 3d (*JrCaM2*), sendo a expressão significativamente superior na condição AIB a partir dos 3d em ambos os genes, com o pico máximo visível ao final do ensaio (7d). Na condição controle a expressão não apresentou um padrão similar entre os dois genes, sendo visível no gene *JrCaM2* uma expressão relativamente constante ao longo do ensaio, com um aumento significativo apenas aos 7d, ao passo que para o *JrCaM4* foi visível um aumento significativo às 24h mantendo-se a partir deste momento relativamente constante até final do ensaio. No híbrido ‘Paradox’ o gene *JrCaM2* apresentou uma diminuição acentuada da expressão às 6h em ambas as condições (AIB e controle), mantendo-se os valores de expressão relativamente estáveis até final do ensaio, momento em que se verifica um ligeiro aumento na condição AIB resultando em diferenças significativas quando comparada a expressão nas duas condições. Relativamente ao gene *JrCaM4* foi igualmente visível uma redução da expressão às 6h, atingindo o valor mínimo apenas à 24h na condição AIB, momento em que inicia um aumento progressivo até final do ensaio, apresentando assim um padrão de expressão similar ao gene *JrCaM2* na condição AIB. Na condição controle, após atingir o valor mínimo às 6h, a expressão do gene sobe para níveis similares ao valor da expressão basal mantendo-se relativamente estável até final do ensaio.



**Figura 35-** Expressão relativa dos genes JrCaMs – *JrCaM1*, *JrCaM2* e *JrCaM4* no híbrido ‘Paradox’ e na cv. ‘Chandler’, em plântulas tratadas com AIB e sem tratamento (controle). As amostras foram recolhidas ao longo do ensaio de enraizamento (0h, 6h, 24h, 3d, 5d e 7d). Os dados correspondem à média  $\pm$  EPM. \* indica a existência de diferenças significativas entre os grupos controle e AIB. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos para cada grupo (controle e AIB). As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0.05$ . \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



**Figura 36** - Representação espaciotemporal da expressão dos genes *JrCaMs*, resultante da análise de RT-qPCR exibindo os padrões de expressão ao longo do tempo para as amostras (região basal da plântula) tratadas com AIB e amostras controlo, no híbrido ‘Paradox’ e na cv. ‘Chandler’. *Heatmap* representado à direita com árvore filogenética representada à esquerda, obtidos através do *software Heatmapper* (disponível em <http://www.heatmapper.ca/>). O intervalo de expressão ( $-2 < \text{Row Z-Score} > 2$ ) encontra-se representado para baixos níveis de expressão com a cor azul e para elevados níveis de expressão com a cor amarela.

O perfil de expressão visível em ambos os genes *JrCaM2* e *JrCaM4* num mesmo genótipo sugere que os dois genes *JrCaM* sejam co-expressos (correlação positiva significativa para  $P < 0.001$  de 0,88 na cv. ‘Chandler’ e 0,714 no híbrido ‘Paradox’). A co-expressão corresponde à similaridade de padrões de expressão de um grupo de genes quando impostas diferentes condições (Montenegro, 2022). No presente trabalho, a co-expressão destes genes é indicativo do desempenho de um papel similar no processo biológico em estudo. Por outro lado, o facto do perfil de expressão ser diferente entre genótipos é revelador de uma dependência desse mesmo fator. Na cv. ‘Chandler’ o seu envolvimento no processo de formação de raízes é evidenciado pelo aumento progressivo da expressão nas plântulas tratadas com a auxina. O seu envolvimento no processo de formação de raízes na cv. ‘Chandler’ surge evidenciado pelo aumento significativo de

ambos os genes aos 3d, momento em que foram identificadas alterações morfológicas associadas ao processo de diferenciação *de novo* das raízes.

Os resultados de expressão obtidos corroboram com a distribuição filogenética das *JrCaMs* (ponto 4.2.). A proximidade filogenética entre *JrCaM4* e *JrCaM2* está associada a um padrão de expressão similar, comportamento já reportado noutras famílias génicas (Eisen et al., 1998; Do & Choi, 2008). Similaridade na expressão, ou pelo contrário, diferenças no padrão de expressão de membros das *CaM*, foram reportados em diferentes ensaios utilizando diferentes fatores de *stress*. Dubrovina et al. (2019), analisou o envolvimento de *VaCaMs* na resposta a vários *stresses* abióticos em plântulas de *Vitis amurens*, como o défice hídrico, salinidade, alto teor de manitol, exposição a frio (4°C e 10 °C), e calor (37 °C) verificando-se que as *VaCaMs* em estudo (*VaCaM8*, *VaCaM9* e *VaCaM10*) apresentaram diferentes padrões de expressão em diferentes tempos de análise. Enquanto o gene *VaCaM8* apresentou um aumento nos níveis de expressão em resposta à salinidade em todos os tempos analisados, o gene *VaCaM9* apresentou níveis de expressão elevados em resposta ao calor, ao frio (4°C) e aos elevados níveis de manitol num único tempo de recolha, enquanto o gene *VaCaM10* apresentou níveis de expressão mais elevados para todas as condições de *stress* mas também associado a um único tempo de recolha. Estes resultados sugerem que os *VaCaMs* apresentam um papel importante na resposta aos *stresses* abióticos em *V. amurens* atuando de forma diferente consoante o estímulo aplicado.

À semelhança dos resultados apresentados para os *VaCaMs*, também os níveis de expressão de *JrCaMs* não apresentaram um padrão de expressão idêntico ao longo do tempo. O padrão de expressão apresentado pelo gene *VaCaM10* assemelha-se muito ao padrão do gene *JrCaM4* em ambos os genótipos em estudo, sendo este padrão mais representativo em ‘Chandler’ nas duas condições de tratamento. A diferença nos padrões apresentados pelos diferentes genes *JrCaMs* nos diferentes genótipos ao longo do tempo é indicativa de que estes genes são regulados de forma diferente em cada genótipo, apresentando-se mais ou menos expressos ao longo do tempo consoante a necessidade da proteína codificada relativamente ao estímulo imposto.

Um estudo realizado em *Solanum pennellii* (Shi & Du 2020) revelou também que os níveis de expressão dos genes de *SpCaMs* variam segundo a exposição da planta a diferentes condições de *stress* abiótico em diferentes órgãos, incluindo o caule. De um modo geral, os resultados obtidos demonstraram que todos os *SpCaMs* eram expressos relativamente às diferentes condições de *stress* impostas na planta, mas em diferentes

níveis de expressão. Para a exposição ao frio nenhum *SpCaM* apresentou expressão na zona do caule, verificando-se o contrário para a condição de seca e salinidade, onde a expressão de *SpCaM* foi elevada. Shi & Du (2020) reportaram ainda diferentes níveis de expressão dos *SpCaM* em resposta a diferentes reguladores de crescimento, sugerindo a existência de diferentes mecanismos de resposta, os quais poderão assemelhar-se à diferença na expressão das *JrCaM* como resposta ao AIB. Por exemplo, foi possível verificar na cv. ‘Chandler’ em amostras sujeitas ao AIB que o gene *JrCaM1* apresentou uma diminuição de expressão ao longo do tempo de inoculação, enquanto os genes *JrCaM2* e *JrCaM4* apresentaram um aumento. Estes padrões inversos sugerem a necessidade de uma inibição ou ativação dos genes ao longo do tempo quando as plântulas são sujeitas à condição AIB, provavelmente devido a diferenças ao nível da função da proteína codificada. Comparando estes resultados com os obtidos no presente trabalho, também para *JrCaM2* e *JrCaM4*, em ambos genótipos em estudo, os níveis de expressão são mais tardios no tratamento com AIB, contrariamente ao *JrCaM1* que apresenta níveis de expressão mais precoce, em ambos genótipos, para o tratamento com AIB. Estes resultados sugerem a diferença de necessidade de atuação de diferentes *JrCaMs* ao longo do tempo, visível em diferentes espécies e sob diferentes estímulos.

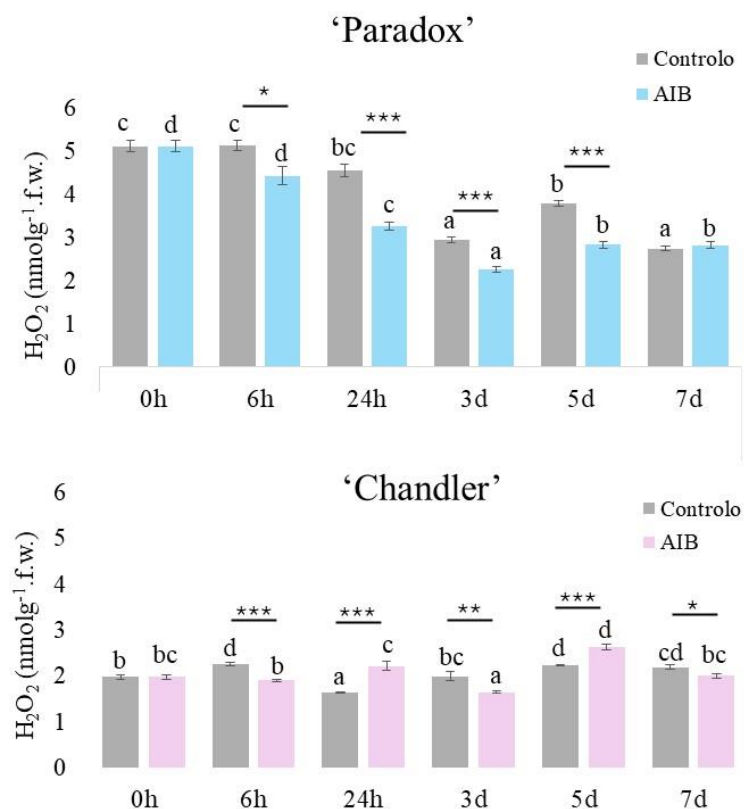
#### 4.4. Envolvimento do *Stress* Oxidativo no Enraizamento Adventício (EA)

##### 4.4.1. Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

As plantas reagem a condições de *stress* através do aumento dos níveis de ROS, nomeadamente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto molécula sinalizadora encarregue de ativar diversas vias de resposta (Del Río, 2015). Um dos objetivos do presente trabalho consistiu na avaliação do envolvimento das ROS enquanto moléculas de sinalização associadas à resposta das plantas a diversas condições de *stress*, dando destaque ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por ser a ROS mais estável e a molécula mais importante no processo de EA, em particular nas fases mais precoces por estar envolvida na resposta ao ferimento (Gechev et al., 2002; Quan et al., 2008; Li et al., 2009a; Santos Macedo et al., 2009; Li & Xue, 2010; Liao et al., 2010; She et al., 2010; Niu & Liao, 2016). As ROS são produzidas pelas células vegetais funcionando como moléculas sinalizadoras de uma resposta imediata da planta, no entanto, é imprescindível que após cumprida a sua função a célula seja capaz de restabelecer os níveis de ROS. A incapacidade de atingir a homeostase celular, mantendo

níveis elevados de ROS torna-se uma condição prejudicial para a planta conduzido em situações extremas à morte celular (Gechev et al., 2002; Wang et al., 2019; Roussos, 2023).

A quantificação dos níveis de  $H_2O_2$  ao longo do ensaio de enraizamento revelou um perfil distinto entre os dois genótipos em estudo (Figura 37). Numa primeira análise, de forma geral, foi possível observar níveis basais de  $H_2O_2$  significativamente superiores no híbrido ‘Paradox’ comparativamente ao observado na cv. ‘Chandler’. Esta diferença nos níveis basais de ROS pode estar relacionado com uma maior capacidade de indução da formação de raízes adventícias. Segundo Quan et al. (2008), o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  na planta ocorre naturalmente como resposta a um dano físico, sendo o mesmo fundamental para a formação de raízes adventícias (Li et al., 2009a; Santos Macedo et al., 2009; Li & Xue, 2010; Liao et al., 2010; She et al., 2010). Da mesma forma Liao et al. (2012), num ensaio realizado com plântulas de *Tagetes erecta* L. var. ‘Marvel’, reporta um aumento dos níveis de  $H_2O_2$  logo após imersão dos explantes numa solução de  $Ca^{2+}$ , com o nível máximo visível às 8h. De acordo com Liao et al. (2011), o  $H_2O_2$  encontra-se envolvido na indução do processo de formação de raízes adventícias induzidas na presença de AIB. No entanto, apesar do perfil de variação não estar associado a nenhum aumento, mas pelo contrário a uma descida, o fato do genótipo de fácil enraizamento demonstrar um nível significativamente superior quando comparado com o genótipo de difícil enraizamento pode ser revelador do envolvimento do  $H_2O_2$  na eficiência deste processo morfogénico.



**Figura 37** - Quantificação dos níveis de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), na região basal, de plântulas da cv. 'Chandler' e do híbrido 'Paradox', tratadas com AIB e sem tratamento (controlo) em diferentes tempos de recolha durante o ensaio (0h, 6h, 24h, 3d, 5d, 7d). Os dados correspondem à média  $\pm$  EPM. \* indica a existência de diferenças significativas entre os grupos controlo e AIB em cada tempo de recolha. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos para cada grupo (controlo ou AIB). As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0.05$ . \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Para além da diferença nos níveis basais de  $H_2O_2$ , também o perfil exibido ao longo do tempo foi muito distinto. No híbrido 'Paradox' observou-se uma descida gradual até aos 3d em ambas as condições (AIB e controlo), atingindo valores mínimos na condição AIB (2,3 nmol  $H_2O_2$  g<sup>-1</sup>.fw.) significativamente inferiores ao controlo (2,9 nmol  $H_2O_2$  g<sup>-1</sup>.fw). Em ambas as condições registou-se de seguida uma subida desses valores, atingindo valores significativamente superiores em ambos os casos (5d com 2,83 nmol  $H_2O_2$  g<sup>-1</sup>.fw na condição AIB e 3,78 nmol  $H_2O_2$  g<sup>-1</sup>.fw no controlo), mantendo-se estes contantes até final do ensaio na condição AIB ou descendo para os valores próximos aos 3d na condição controlo (2,7 nmol  $H_2O_2$  g<sup>-1</sup>.fw). Em todos os tempos de análise, à exceção

dos 7d, os níveis de  $H_2O_2$  foram significativamente superiores na condição controlo comparativamente ao tratamento com a auxina. Este nível mais elevado na condição controlo é revelador de uma associação mais predominante do  $H_2O_2$  ao *stress* provocado pelo corte.

Relativamente à cv. ‘Chandler’, o perfil de variação dos níveis de  $H_2O_2$  foi distinto do observado no híbrido ‘Paradox’, não sendo notória a descida gradual em ambas as condições. Um ligeiro aumento, com valores significativamente superiores, foi visível às 6h na condição controlo, podendo ser revelador de um possível envolvimento na resposta imediata ao corte. No entanto, da mesma forma que observado no híbrido ‘Paradox’, os valores mínimos obtidos na condição AIB foram observados aos 3d ( $1,6 \text{ nmol } H_2O_2 \text{ g}^{-1} \cdot \text{fw}$ ), com diferenças significativas quando comparados com o controlo. De seguida registou-se, da mesma forma, um aumento dos níveis de  $H_2O_2$  (5d), atingindo, no caso da condição AIB, os valores mais elevados ( $2,6 \text{ nmol } H_2O_2 \text{ g}^{-1} \cdot \text{fw}$ ), com diferenças significativas relativamente ao controlo (de  $2,2 \text{ nmol } H_2O_2 \text{ g}^{-1} \cdot \text{fw}$ ). Contrariamente ao observado no híbrido ‘Paradox’, em que os níveis de  $H_2O_2$  no controlo foram superiores aos observados na condição AIB, na cv. ‘Chandler’ os valores de  $H_2O_2$  foram significativamente superiores na condição AIB comparativamente ao controlo nos tempos 24h e 5d. No trabalho desenvolvido nesta dissertação, em ambos os genótipos, foi verificada uma descida dos níveis de  $H_2O_2$  aos 3d no tratamento com AIB com um aumento aos 5d. Num estudo anterior realizado em plântulas de nogueiras híbridas (*J. nigra*  $\times$  *J. regia*), Jay-Allemand e colegas (1992) verificaram que era fundamental um período mínimo de 5d para a indução do EA em meio suplementado com AIB ( $24.6 \mu\text{M}$ ). Este tempo de indução pode ser o mínimo necessário para que o estímulo externo conduza ao início do processo morfogénico de formação das raízes adventícias (Hand, 1994). Assim, deste modo, pode ser sugerido que aos 5d de indução com a presença da auxina indutora AIB, seja desencadeada uma via de sinalização específica do  $H_2O_2$  com a consequente formação de raízes adventícias (Kang et al., 2018; Kushwaha et al., 2019).

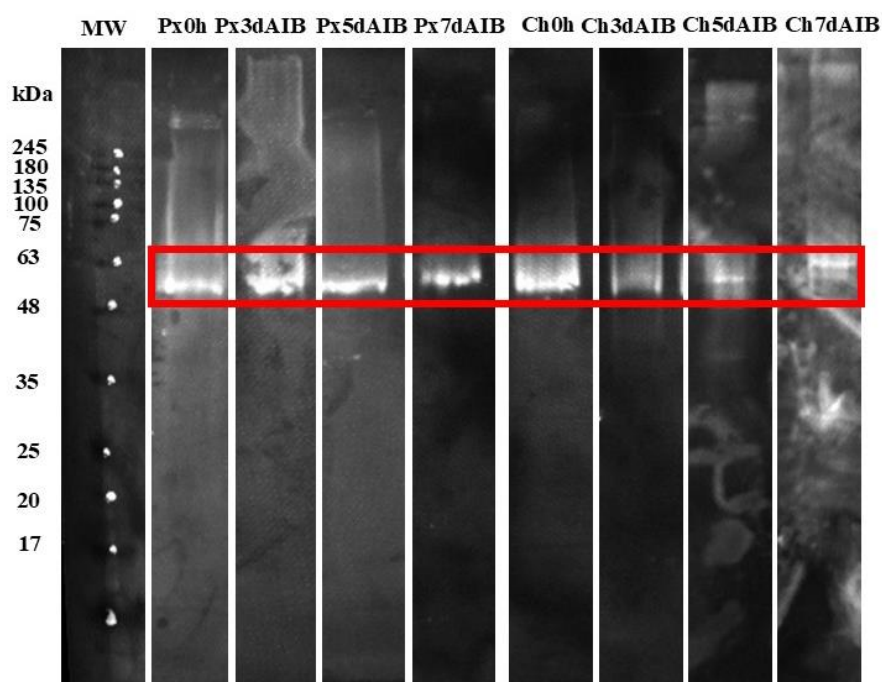
Sendo o  $H_2O_2$  uma molécula envolvida na sinalização de diversas condições de *stress* e havendo a indicação de uma relação direta entre os níveis de  $H_2O_2$  e o aumento da intensidade das condições de *stress* (Asaeda et al., 2022), seria expectável surgirem níveis mais elevados associados ao tratamento com AIB por ser uma condição que integra dois *stresses* distintos (o corte para preparação da plântula e a presença de auxina no meio de cultura), o que de fato não se verificou. Segundo Pasternak et al. (2005) e Takác et al. (2016), o  $H_2O_2$  apenas exercerá funções durante a divisão celular, na presença de auxina.



Por outro lado, o tempo de indução e a concentração de auxina exógena aplicada, são fatores que influenciam a estimulação ou inibição da diferenciação celular e, portanto, a formação de raízes (Taiz et al., 2017). Neste ensaio, para a mesma concentração de AIB, os genótipos ‘Chandler’ e ‘Paradox’ apresentaram diferenças na produção de  $H_2O_2$ , levando-nos a colocar a hipótese da dependência do genótipo. De acordo com Farias da Silva et al. (2022), as respostas ao tempo de indução e concentração de auxina são dependentes do genótipo. Dependência também relatada no ponto acima (ponto 4.3.2.2) relativo à análise da expressão dos genes das Calmodulinas (*JrCaM*) em ambos os genótipos.

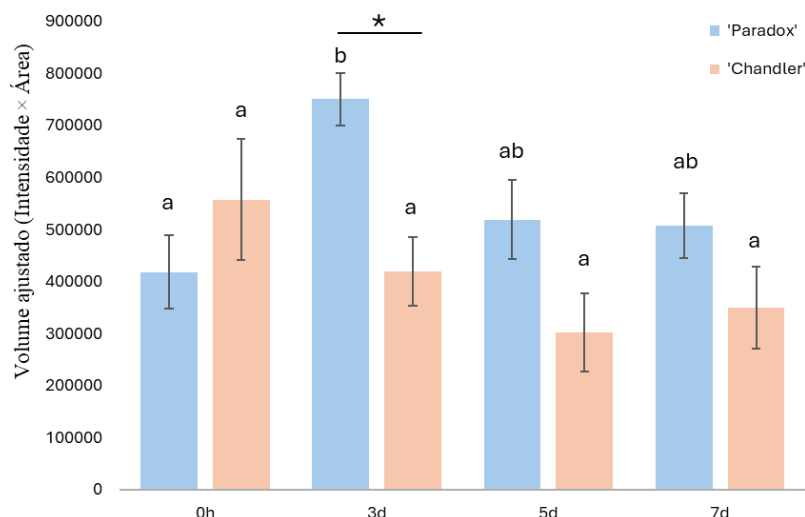
#### 4.4.2. Expressão da enzima CAT por *Western blot*

A CAT é uma enzima que promove a degradação do  $H_2O_2$  impedindo que este provoque danos irreversíveis nas células quando ocorre uma condição de *stress* (Viridi et al., 2015). Para melhor compreender a dinâmica do  $H_2O_2$  e o seu envolvimento no EA foi avaliada a expressão da CAT, uma das principais enzimas antioxidantes (Scandalios et al., 1997) com um papel crucial na proteção celular contra o *stress* oxidativo, catalisando a decomposição de duas moléculas de  $H_2O_2$  em duas moléculas de água ( $2H_2O$ ) e uma molécula de oxigénio ( $O_2$ ) (Mittler, 2002; Chelikani et al., 2004). Os resultados relativos à expressão da proteína CAT, avaliada apenas na condição AIB, revelaram a presença de uma banda com massa molecular aparente entre 48 e 63 kDa (Figura 38) em todas as amostras dos dois genótipos nos diferentes tempos de recolha considerados (0h, 3d, 5d e 7d, selecionados após análise estatística dos resultados da quantificação de  $H_2O_2$ ). Segundo várias publicações, esta proteína é descrita como um complexo enzimático que pode ser dividido em várias classes de acordo com as funções que desempenham (Bagnoli et al., 2004; Willekens et al., 1995). Estruturalmente, a CAT nativa, com massa molecular que pode variar entre 220 e 350 kDa consiste num tetrâmero formado por quatro subunidades idênticas. Cada subunidade possui uma massa molecular entre 55 e 59 kDa, sendo formada por uma cadeia polipeptídica e um grupo heme que contem um ião ferro ( $Fe^{3+}$ ), essencial para a sua atividade catalítica (Mullen & Gifford, 1993; Palma et al., 2013; Teng et al., 2016). De acordo com o marcador de massas moleculares utilizado neste trabalho, a massa molecular da banda proteica reconhecida pelo anticorpo primário Anti-CAT, (Figura 38), parece corresponder à massa molecular da CAT descrita na literatura, confirmando a identificação desta enzima.



**Figura 38-** Imagem representativa da membrana *Western blot* para a proteína Catalase (CAT) em amostras da região basal do híbrido ‘Paradox’ e da cv. ‘Chandler’. A região delimitada a vermelho define a banda da CAT, com massa molecular aparente entre 55 e 59 kDa. As diferentes amostras encontram-se devidamente identificadas na parte superior da imagem: amostras dos genótipos ‘Paradox’ (Px) e ‘Chandler’ (Ch) estabelecidas no meio de indução com a auxina AIB e recolhidas para análise em diferentes tempos (0h, 3d, 5d e 7d). À esquerda encontram-se representadas as massas moleculares (kDa) do marcador molecular utilizado (NZYA Colour Protein Marker II, nzytech).

Através da análise da figura 38 é possível observar a ausência de ligações inespecíficas ao anticorpo primário, o que indica uma elevada especificidade do anticorpo à proteína CAT e a realização do bloqueio de forma eficaz. Pode ainda ser observado que a banda correspondente à enzima CAT aparenta ser mais intensa na cv. ‘Chandler’ às 0h e aos 3d no híbrido ‘Paradox’, sugerindo que nestes tempos de recolha a sua expressão seja mais elevada. Este mesmo resultado pode ser observado no gráfico da figura 39 que mostra os valores da expressão da proteína CAT obtidos a partir da análise da intensidade das bandas correspondentes à proteína em estudo.



**Figura 39-** Expressão da proteína Catalase (CAT) em amostras provenientes da região basal do híbrido 'Paradox' e da cv. 'Chandler' ao longo dos diferentes tempos de recolha após a inoculação em meio de enraizamento com AIB (0h, 3d, 5d e 7d). Os dados correspondem à média  $\pm$  EPM. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos para cada cultivar e \* corresponde a diferenças significativas entre as duas cultivares. As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0.05$ . A densidade ótica foi obtida usando uma análise densitométrica (Bio-Rad Image Lab, versão 5.2.1). Estes valores compreendem a correção para o *background*, a qual foi aplicada para cada banda através da normalização de uma região adjacente da membrana.

De acordo com o gráfico da figura 39 observaram-se diferenças entre os dois genótipos em estudo. Com exceção das 0h, foi no híbrido 'Paradox' que se verificaram valores de expressão da proteína CAT mais elevados, sendo essas diferenças estatisticamente significativas apenas aos 3d. Por outro lado, às 0h a expressão da CAT foi mais elevada na cv. 'Chandler'.

Relativamente à expressão ao longo do tempo, o híbrido 'Paradox' apresentou valores mínimos e máximos às 0h e 3d, respetivamente, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p = 0.011$ ). A partir dos 3d, verificou-se uma diminuição significativa da expressão da CAT, mantendo-se estável entre os 5d e os 7d. Quanto à cv. 'Chandler', observaram-se valores máximos e mínimos às 0h e 5d, respetivamente, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos, nem em relação aos restantes tempos analisados.

As ROS são moléculas provenientes do metabolismo celular normal, principalmente de processos que envolvem o transporte de eletrões, como a respiração

mitocondrial e a fotossíntese. Embora desempenhem papéis importantes como moléculas sinalizadoras, o aumento excessivo da concentração de ROS pode causar danos celulares, incluindo oxidação de proteínas, de lípidos e do DNA, o que levou ao desenvolvimento, por parte dos organismos aeróbicos, de sistemas de defesa antioxidante para controlar os níveis de ROS e minimizar os seus efeitos nocivos (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013; Wang et al., 2013; Bauduin et al., 2022; Roussos, 2023; Rauf et al., 2023). Entre esses sistemas, as enzimas antioxidantes desempenham um papel muito importante na neutralização das ROS, sendo a CAT uma das enzimas mais importantes nesse contexto. Esta enzima, presente em diferentes compartimentos celulares, como os peroxissomas, o citosol, os cloroplastos e as mitocôndrias, é responsável pela eliminação do  $H_2O_2$  superproduzido, decompondo-o em água e oxigênio (Anjum et al., 2016). De acordo com os resultados obtidos nesta dissertação, tanto na cv. ‘Chandler’ como no híbrido ‘Paradox’, os níveis de  $H_2O_2$  e a expressão da CAT apresentaram um comportamento inversamente proporcional quando se comparam os diferentes tempos do ensaio de indução do enraizamento. Tanto na cv. ‘Chandler’ como no híbrido ‘Paradox’, aos valores máximos e mínimos de expressão da CAT estão associados os valores mínimos e máximos de  $H_2O_2$ , o que é um resultado espectável e está de acordo com a relação entre a atividade da enzima e a eliminação de  $H_2O_2$  (Singh & Kumar, 2019). A análise de correlação mostrou a existência de uma correlação negativa significativa ( $p=0.013$ , coeficiente de correlação de  $-0,436$ ) no híbrido ‘Paradox’. Ou seja, o valor mínimo de  $H_2O_2$  identificado aos 3d e o subsequente aumento aos 5d está inversamente correlacionado com a expressão da CAT, revelando um potencial envolvimento da enzima no restabelecimento dos níveis de  $H_2O_2$ . Os 3 d corresponde ao momento em que ocorre a inversão do padrão de expressão de dois genes *JrCaM* (*JrCaM1* e *JrCaM2*), com o aumento progressivo até final do ensaio, visível também no gene *JrCaM4* ainda que com a inversão do padrão a ocorrer mais precocemente (24h). A análise de correlação revelou uma correlação positiva forte no híbrido ‘Paradox’ ( $P<0.001$  com coeficiente de correlação de  $0,737$ ) quando correlacionados os níveis de  $H_2O_2$  e a expressão do gene *JrCaM1*.

Como referido anteriormente, o  $H_2O_2$  é uma das moléculas com um papel mais importante quando é provocado um dano físico numa planta, sendo por outro lado, promotor do EA (Quan et al., 2008; Li et al., 2009a; Santos Macedo et al., 2009; Li and Xue, 2010; Liao et al., 2010; She et al., 2010). Sabe-se também que a CAT é uma das enzimas responsáveis pela redução dos níveis de  $H_2O_2$  (Roussos, 2023). Um estudo,

realizado em várias espécies, demonstrou que a aplicação exógena de  $H_2O_2$ , pode promover a formação de raízes adventícias com a mesma eficiência como quando as plantas são induzidas apenas com auxina (Liao et al., 2009; Rugini et al., 1997; Pagnussat et al., 2003; Li & Xue, 2010). Foi demonstrado que a aplicação de inibidores de  $H_2O_2$  com papel similar à enzima CAT, anulavam a eficácia do  $H_2O_2$  aplicado e inibiam a formação de raízes adventícias (Li et al., 2007; Li et al., 2016; Niu & Liao, 2016; Niu et al., 2019). Desta forma, é perceptível o papel importante do  $H_2O_2$  e a sua participação na formação de raízes adventícias. Embora neste estudo não tenha sido aplicado  $H_2O_2$  exógeno, de acordo com esta informação presente na literatura, o  $H_2O_2$  quando em concentrações ideais nas células promove a formação dos primórdios radiculares.

Segundo a literatura, existem poucos estudos acerca do papel da CAT no processo de EA. Verificou-se em dois estudos, que a atividade da CAT se manteve estável durante a formação de raízes adventícias em *Vigna radiata* L. (Li et al., 2009a) e *Cucumis sativus* (Li et al., 2007). O trabalho realizado na presente dissertação mostra um envolvimento da CAT no processo de formação de raízes adventícias dependente do genótipo, sendo este o primeiro estudo que relaciona a expressão da proteína CAT com o processo de enraizamento em plantas de noqueira, contribuindo para melhor compreender a relação entre os níveis de  $H_2O_2$  e a expressão das enzimas antioxidantes durante o processo de enraizamento.

Por outro lado, o controlo das ROS pode ser efetuado por uma via não enzimática através da síntese de metabolitos com ação antioxidante tais como os compostos fenólicos (Gill & Tuteja, 2010; Nath et al., 2016), atuando quando ocorre um dano físico na planta de forma a inibir o aumento dos seus níveis (Jaleel et al., 2009; Steffens & Rasmussen, 2016). Sendo *J. regia* uma espécie rica em compostos fenólicos (Cordova et al., 2024) e estando estes associados ao comportamento recalcitrante nesta espécie (Jay-Allemand et al., 2001), esta poderá ser a razão para o fato da CAT apresentar valores de expressão baixos na cv. 'Chandler', podendo neste genótipo a homeostase das ROS estar associada a uma via distinta da existente no híbrido 'Paradox'. Seria de interesse explorar em trabalhos futuros o envolvimento da via não enzimática no controlo dos níveis de  $H_2O_2$  em ambos os genótipos, bem como estabelecer um ensaio de inibição da CAT de modo a validar o envolvimento desta enzima no processo de formação de raízes adventícias.

#### 4.5 – Alterações Histológicas Associadas ao Processo de Enraizamento Adventício (EA)

A realização dos cortes histológicos nas plântulas do híbrido 'Paradox' cl. Vlach permitiram a visualização das alterações a nível histológico associadas à formação dos primórdios radiculares. As amostras recolhidas às 0h, 3d, 5d, e 7d após tratamento com AIB, permitiram identificar as diferenças associadas às várias etapas do processo de formação dos primórdios radiculares formados na base do caule induzido (Figura 40).

Os cortes realizados às 0h permitiram visualizar uma organização dos tecidos, combinando os tecidos primários, de entre os quais se destaca a epiderme (Figura 40 - A), onde foi possível identificar tricomas glandulares responsáveis pela síntese de compostos voláteis, o córtex preenchido com tecido de parênquima, onde foi possível identificar algumas drusas e na zona central a medula preenchida com tecido de parênquima amilífero sendo possível identificar uma grande densidade de amiloplastos. Como tecidos secundários foram identificadas algumas camadas de súber abaixo da epiderme, com origem no câmbio cortical, o floema secundário, localizado numa posição abaxial ao anel de xilema, ambos com uma disposição radial revelando atividade do câmbio vascular (Figura 40 - B e C). Descrição semelhante foi relatada em *Acacia mearnsii*, *Ilex paraguariensis* (Oliveira et al., 2024) e *O. europaea* (Macedo et al., 2013), revelando a organização típica de caules de plantas da classe *Magnoliopsida*, evidenciando crescimento secundário resultante da atividade dos meristemas laterais, o câmbio vascular e o câmbio cortical.

A origem das raízes adventícias a partir de células do câmbio vascular ou de células de parênquima localizadas na região do córtex foi descrita em várias espécies (Lakehal & Bellini, 2019; Macedo et al., 2013). Nos cortes histológicos de 'Paradox' obtidos aos 3d em plântulas induzidas em meio com AIB foi visível um aumento da atividade celular em várias regiões entre o câmbio vascular e o floema (Figura 40 - D). Aglomerados de células de pequenas dimensões, com citoplasma denso, núcleos proeminentes e nucléolos por vezes visíveis foram identificados nessas regiões (Figura 40 - E). O aumento da atividade celular nestas regiões poderá estar relacionado com a formação de pequenos grupos de células meristemáticas, identificados também noutras espécies lenhosas entre os 3 e os 5 dias de indução com auxina, de entre as quais, *Quercus robur*, *Castanea sativa* e um híbrido de castanheiro (*C. sativa* × *C. crenata*) (Gonçalves et al., 1998; Ballester et al., 1999; Vidal et al. 2003; Vielba et al. 2020). Segundo Naija

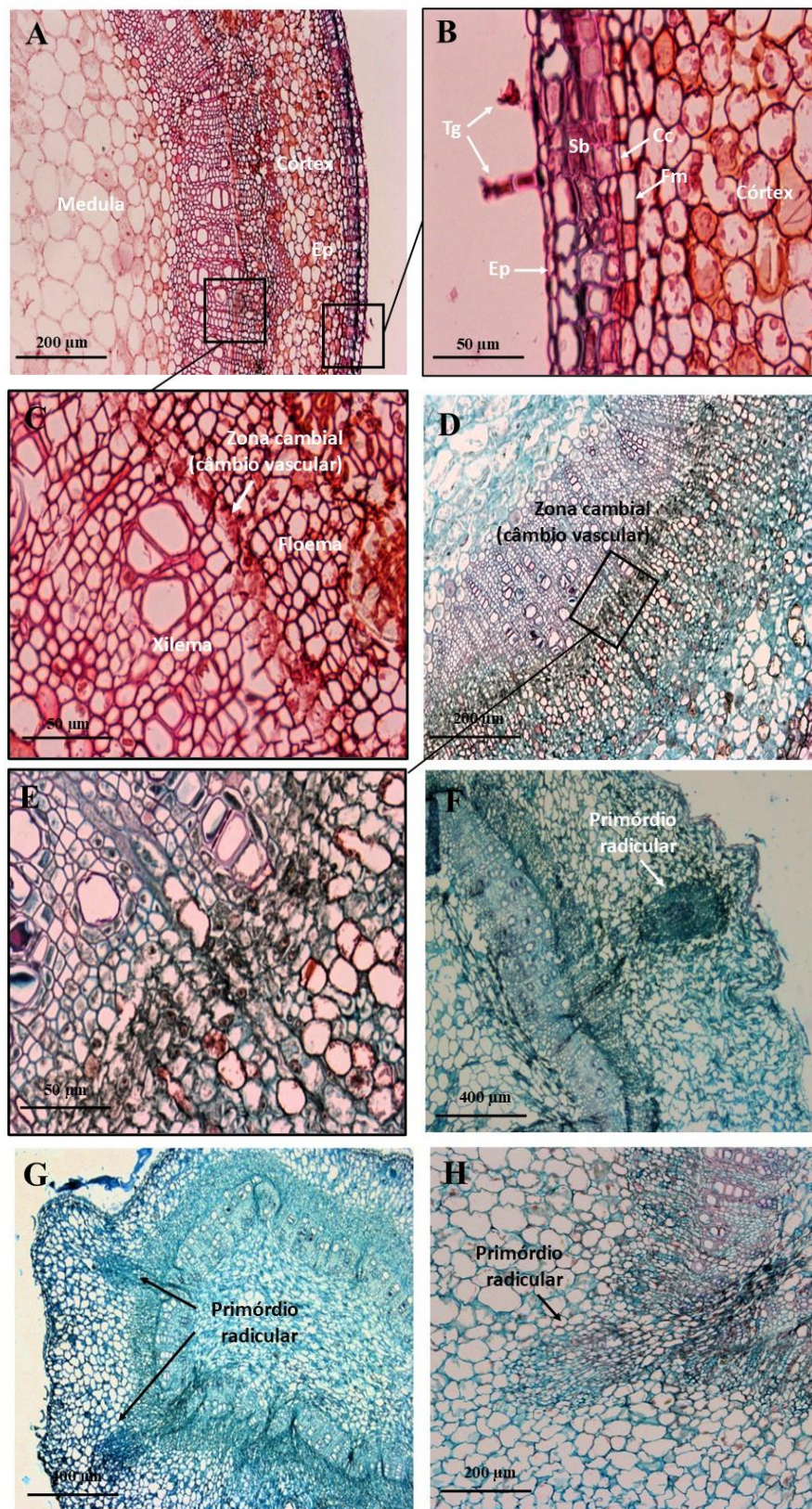
et al. (2008), os meristemóides surgem a partir de células em divisão junto à região cambial.

Em plântulas de *C. sativa* após 5d de indução em AIB, pôde verificar-se a presença de grupos de células meristemáticas de maiores dimensões na parte mais externa do floema, que deram origem a meristemóides e conseqüentemente ao primórdio radicular visível aos 6 dias (Vielba et al., 2020). Por outro lado, noutras espécies é descrita uma maior rapidez no processo de formação dos primórdios radiculares, por exemplo em *Chrysanthemum morifolium*, aos 5 dias de indução os primórdios radiculares já se encontram diferenciados (Liu et al., 2013). Embora as condições experimentais possam ser diferentes, os resultados descritos nos diversos trabalhos permitem concluir que a precocidade na formação dos meristemóides ou dos primórdios radiculares depende da espécie.

Nos cortes obtidos em ‘Paradox’ foi possível observar regiões muito mais densas e coradas junto ao câmbio vascular comparativamente aos restantes tecidos, sugerindo que o primórdio radicular tenha tido origem nesse tecido, sendo ainda possível verificar um prolongamento de células a partir das quais se irão, provavelmente, diferenciar os feixes vasculares das novas raízes. Foi possível visualizar um primórdio radicular já diferenciado aos 5d, onde foi possível verificar as ligações entre o primórdio radicular e tecidos mais centrais do caule como o câmbio e o xilema, sendo também visível uma progressão do primórdio em direção aos tecidos do córtex (Figura 40 - F).

Aos 7d foi possível observar um primórdio radicular bem definido já sendo possível ver estruturas distintas a ligarem o câmbio vascular ao primórdio radicular (Figura 40 - G). Comparativamente aos 5d, o primórdio radicular apresentou uma estrutura ligeiramente mais pontiaguda aos 7d (Figura 40 - H), o que poderá ser devido à orientação das divisões celulares numa direção específica, neste caso, em direção ao córtex. Esta descrição relativa à morfologia e evolução celular dos primórdios da raiz aos 7d é coincidente com a descrição realizada por Naija et al. (2008) ao induzir plântulas de *M. domestica* em meio suplementado com AIB.





**Figura 40-** Cortes histológicos realizados no híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’ na base da plântula recolhida em diferentes tempos (0h, 3d, 5d e 7d de tratamento com AIB). A a C: cortes histológicos realizados às 0h (antes do tratamento com AIB), sendo possível observar uma



organização dos tecidos típica das Magnoliopsidas; D e E: cortes histológicos de plântulas após 3d de indução com AIB; F: corte histológico realizado aos 5d após tratamento com AIB; G e H: corte histológico de plântulas aos 7d de indução com AIB. Tg: tricomas glandulares; Sb:súber; Fm: feloderme; Ep: epiderme; Cc: câmbio cortical.



## 5. Conclusão e Perspetivas Futuras

A formação de raízes adventícias é um processo determinante para o sucesso da propagação vegetativa de inúmeras espécies de interesse agronómico, permitindo a multiplicação de genótipos de elite com manutenção da sua uniformidade genética. Contudo, a baixa competência que algumas espécies, em particular lenhosas, apresentam para formar raízes adventícias constitui um grande obstáculo à sua propagação clonal.

Diversos genótipos pertencentes ao género *Juglans spp.* são caracterizados por elevada recalcitrância na resposta aos estímulos exógenos utilizados para a indução do EA em sistemas convencionais, nomeadamente através da utilização de estacas lenhosas ou semi-lenhosas. O estabelecimento de sistemas de propagação *in vitro*, baseados na utilização de microestacas, permitiu ultrapassar este problema em muitos genótipos, embora nem todos apresentem a mesma eficiência.

Apesar dos estudos desenvolvidos sobre o processo de EA e os mecanismos envolvidos na sua eficiência, os trabalhos realizados especificamente em noqueira (*Juglans spp.*) são ainda escassos. Neste contexto, a presente dissertação teve como objetivo aprofundar o conhecimento dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos na resposta de *Juglans* aos estímulos associados à formação de raízes adventícias, com especial foco no estudo das vias de sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  e das ROS.

O trabalho focado no envolvimento da via de sinalização envolvendo o ião  $\text{Ca}^{2+}$  permitiu identificar, seguindo uma abordagem *in silico*, seis genes codificantes para calmodulinas em *J. regia* (*JrCaMs*). Estes genes encontram-se distribuídos por quatro subfamílias (*JrCaM1* a *JrCaM4*), sendo a subfamílias *JrCaM1* e *JrCaM3* constituídas por dois membros cada, enquanto as *JrCaM2* e *JrCaM4* são representadas por apenas um gene. A maioria dos genes *JrCaM* (*JrCaM1a*, *JrCaM1b*, *JrCaM3a* e *JrCaM3b*) apresentou a estrutura típica dos genes CaM, com dois exões separados por um intrão longo (>1 kb), enquanto *JrCaM2* e *JrCaM4* apresentaram estruturas mais complexas, com quatro exões e três intrões. Apesar desta diversidade estrutural, o primeiro exão mostrou-se altamente conservado entre os *JrCaMs*, e os exões seguintes, ainda que organizados de forma distinta, mantiveram a sequência codificante conservada, sugerindo a preservação da função da proteína codificada. Este elevado nível de conservação foi constatado através da identificação de um péptido putativo composto por 149 aminoácidos e quatro domínios EF-Hand (*EF-Hand Motifs*), responsáveis pela ligação ao ião  $\text{Ca}^{2+}$ . A análise tridimensional das *JrCaMs* revelou a configuração típica das CaMs com os domínios *EF-Hand* organizados em pares (N-terminal e C-terminal). Os

parâmetros físico-químicos, como peso molecular, ponto isoelétrico (pI) e percentagem de metionina, corroboraram a identidade destas proteínas como CaMs, mesmo com pequenas variações face aos valores padrão.

A identificação da localização subcelular das JrCaMs realizada também *in silico* revelou o núcleo como localização preferencial, sugerindo a sua atuação na regulação da expressão de genes alvo, aspeto relevante no EA por envolver a reprogramação celular associada à ativação/silenciamento de genes. Neste contexto, as CaMs poderão funcionar como sensores de alterações nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , ativando fatores de transcrição que regulam genes associados à resposta ao *stress* e à indução de raízes em *J. regia*. A análise de interações proteína-proteína (via STRING) reforçou esta hipótese ao demonstrar que as JrCaMs interagem com proteínas relacionadas com processos celulares fundamentais para o enraizamento, como actinas, histonas, kinesinas e glutamina sintetase, esta última implicada na via de biossíntese de triptofano, precursor da auxina (AIA), hormona chave na formação de raízes adventícias. Assim, os dados obtidos não só confirmam a presença e conservação das calmodulinas em *J. regia*, como também sugerem o seu envolvimento funcional na sinalização via  $\text{Ca}^{2+}$  e na regulação da expressão génica mediada por auxinas.

Para melhor compreender o papel das JrCaMs durante o enraizamento, foi conduzida uma análise da expressão génica ao longo de um ensaio de enraizamento utilizando dois genótipos com comportamentos contrastantes face aos estímulos exógenos usados na indução do EA: o híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’ (*J. hindsii* × *J. regia*), de fácil enraizamento, e a cv. ‘Chandler’ de *J. regia*, de difícil enraizamento.

Esta análise foi complementada com a quantificação dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a determinação da atividade da CAT, uma enzima responsável pela homeostase do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Adicionalmente foi realizado um estudo histológico para avaliação das alterações a nível celular associadas ao processo de enraizamento, este apenas contemplando o híbrido ‘Paradox’.

As alterações histológicas observadas no genótipo ‘Paradox’, nomeadamente a formação de meristemóides e primórdios radiculares entre os 3 e os 7 dias após a indução com AIB, coincidiram com os momentos críticos identificados nas análises moleculares e bioquímicas. Aos 3 dias, ponto em que se inicia a reorganização celular na região do câmbio vascular, observou-se uma inversão no padrão de expressão dos genes *JrCaM1* e *JrCaM2*, bem como o início do aumento gradual da expressão do gene *JrCaM4*. Estes resultados sugerem o envolvimento das JrCaM como mediadoras da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$

em resposta ao corte e à aplicação da auxina, promovendo a reprogramação celular associada ao enraizamento. Simultaneamente, os níveis de  $H_2O_2$  atingiram o seu mínimo aos 3d e aumentaram novamente aos 5d, indicando o seu papel como molécula sinalizadora na fase inicial do enraizamento, sendo posteriormente regulado para evitar efeitos tóxicos. A expressão da CAT acompanha este padrão inverso, com um pico aos 3d em ‘Paradox’, coincidindo com os níveis mínimos de  $H_2O_2$ , o que sugere uma atuação eficiente do sistema antioxidante enzimático neste genótipo. Em contraste, na cv. ‘Chandler’ foi visível uma menor expressão da CAT, sugerindo a possível atuação de vias antioxidantes não enzimáticas, como os compostos fenólicos.

Em suma, os resultados obtidos permitem confirmar a hipótese inicialmente colocada, demonstrando que as diferenças na eficiência do enraizamento adventício (EA) entre os genótipos de noqueira estão diretamente associadas à capacidade de integração e regulação das vias de sinalização envolvendo espécies reativas de oxigénio ( $H_2O_2$ ) e o ião cálcio ( $Ca^{2+}$ ).

Para trabalhos futuros, será importante aprofundar a investigação sobre os mecanismos regulatórios das JrCaMs durante o EA, nomeadamente através de estudos funcionais que envolvam a manipulação genética destes genes para confirmar o seu papel específico na via de sinalização dependente de  $Ca^{2+}$ . Experiências de knockdown ou superexpressão poderão ajudar a elucidar os efeitos diretos destas proteínas na formação de raízes. Além disso, a análise detalhada da dinâmica do  $Ca^{2+}$  intracelular em resposta aos estímulos de enraizamento, através de técnicas como imagens de fluorescência em células vivas, poderá clarificar como as alterações nos níveis de  $Ca^{2+}$  são percebidas e transduzidas pelas CaM. Outro foco importante seria explorar o papel das ROS, sobretudo o  $H_2O_2$ , aprofundando a caracterização dos mecanismos antioxidantes envolvidos, incluindo a análise de outras enzimas e compostos não enzimáticos, como os fenólicos, que possam colaborar na regulação do equilíbrio redox durante o enraizamento. Ensaaios de inibição ou ativação seletiva da CAT e de outras vias antioxidantes poderão ajudar a estabelecer as relações causais entre a homeostase do  $H_2O_2$  e a competência para enraizamento. Paralelamente, a investigação histológica poderia ser complementada por técnicas avançadas, como a análise temporal detalhada da expressão de marcadores celulares, para identificar com maior precisão os eventos celulares e moleculares na

diferenciação das raízes adventícias. Finalmente, estudos comparativos entre diversos genótipos e espécies relacionadas poderão contribuir para entender a evolução e adaptação destes mecanismos de sinalização, com vista à aplicação prática na propagação clonal e melhoramento genético da noqueira, visando o desenvolvimento de protocolos mais eficientes e sustentáveis.



## 6. Referências Bibliográficas

- Adams, S., Lordan, J., Fazio, G., Bugbee, B., Francescato, P., Robinson, T. L., & Black, B. (2018). Effect of scion and graft type on transpiration, hydraulic resistance and xylem hormone profile of apples grafted on Geneva fi 41 and M.9-NICTM29 rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 227, 213–222.
- Adeva, M. M., Souto, G., Blanco, N., & Donapetry, C. (2012). Ammonium metabolism in humans. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 61(11), 1495-1511. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.07.007>.
- Adham, A. R., Zolman, B. K., Millius, A., & Bartel, B. (2005). Mutations in *Arabidopsis* acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in beta-oxidation. *The Plant Journal*, 41(6), 859–874. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02343.x>.
- AGRO.GES. (2023). *Sector study on horticulture in Portugal*. Embassy of the Kingdom of the Netherlands.
- Ahkami, A. H., Lischewski, S., Haensch, K. T., Porfirova, S., Hofmann, J., Rolletschek, H., Melzer, M., Franken, P., Hause, B., Druege, U., et al. (2009). Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: Involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist*, 181(3), 613–625.
- AJAP. (2017). Manual Boas Práticas para Culturas Emergentes- A Cultura da Noz. In Associação dos Jovens Agricultores de Portugal.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24, 1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Aleynova, O. A., Kiselev, K. V., Ogneva, Z. V., & Dubrovina, A. S. (2020). The grapevine calmodulin-like protein gene CML21 is regulated by alternative splicing and involved in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7939. <https://doi.org/10.3390/ijms21217939>.
- Almeida, C. (2017). Importância económica da noqueira para a produção de noz. *Agroforum*, 27–33.
- Almeida, C. M. de. (2020). A produção e comercialização de noz em Portugal e no contexto mundial. *Revista de Ciências Agrárias*, 43(Esp. 2), 10-16. <https://doi.org/10.19084/rca.19648>
- Al-Quraan, N. A., Locy, R. D., & Singh, N. K. (2010). Expression of calmodulin genes in wild type and calmodulin mutants of *Arabidopsis thaliana* under heat stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(8), 697-702.
- Alzohairy, A. M. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(1), 60-61.
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., Mohamed, A. A., Thangavel, P., Devi, G. D., Vasudhevan, P., Sofo, A., Khan, N. A., Misra, A. N.,



- Lukatkin, A. S., Singh, H. P., Pereira, E., & Tuteja, N. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—Representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19002–19029. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.01002.x>
- Aradhya, M. K., Potter, D., & Simon, C. J. (2006). Cladistic biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on chloroplast DNA intergenic spacer sequences. In T. J. Motley, N. Zerega, & H. Cross (Eds.), *Darwin's harvest: New approaches to the origins, evolution, and conservation of crops* (pp. 143–170). Columbia University Press. <https://doi.org/10.7312/motl13316-008>.
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366–369.
- Asaeda, T., Rahman, M., Liping, X., & Schoelynck, J. (2022). Hydrogen peroxide variation patterns as abiotic stress responses of *Egeria densa*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 855477. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.855477>
- Atkinson, J. A., Rasmussen, A., Traini, R., Voß, U., Sturrock, C., Mooney, S. J., Wells, D. M., & Bennett, M. J. (2014). Branching out in roots: Uncovering form, function, and regulation. *Plant Physiology*, 166(2), 538–550.
- Ayala, P. G., Acevedo, R. M., Luna, C. V., Rivarola, M., Acuña, C., Marcucci Poltri, S., González, A. M., & Sansberro, P. A. (2022). Transcriptome dynamics of rooting zone and leaves during in vitro adventitious root formation in *Eucalyptus nitens*. *Plants*, 11(3301). <https://doi.org/10.3390/plants11233301>
- Babenko, V. N., Rogozin, I. B., Mekhedov, S. L., & Koonin, E. V. (2004). Prevalence of intron gain over intron loss in the evolution of paralogous gene families. *Nucleic Acids Research*, 32(12), 3724–3733. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh686>.
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., & Wishart, D. S. (2016). Heatmapper: Web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W147–W153. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>.
- Bachs, O., Agell, N., & Carafoli, E. (1994). Calmodulin and calmodulin-binding proteins in the nucleus. *Cell Calcium*, 16(4), 289–296. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(94\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0143-4160(94)90092-2).

- Bagnoli, F., Danti, S., Magherini, V., Cozza, R., Innocenti, A. M., & Racchi, M. L. (2004). Molecular cloning, characterization, and expression of two catalase genes from peach. *Functional Plant Biology*, 31(4), 349–357. <https://doi.org/10.1071/FP03203>
- Bai, W. N., Yan, P. C., Zhang, B. W., Woeste, K. E., Lin, K., & Zhang, D. Y. (2017). Demographically idiosyncratic responses to climate change and rapid Pleistocene diversification of the walnut genus *Juglans* (Juglandaceae) revealed by whole-genome sequences. *New Phytologist*, 217(4), 1726–1736.
- Baichoo, S., & Ouzounis, C. A. (2017). Computational complexity of algorithms for sequence comparison, short-read assembly and genome alignment. *BioSystems*, 3734, 2–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.03.003>
- Ballester, A., San-José, M. C., Vidal, N., Fernández-Lorenzo, J. L., & Vieitez, A. M. (1999). Anatomical and biochemical events during in vitro rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Annals of Botany*, 83(6), 619–629.
- Ban, Q., Liu, T., Ning, K., Fan, J., Cui, Q., Guo, Y., & Zai, X. (2021). Effect of calcium treatment on the browning of harvested eggplant fruits and its relation to the metabolisms of reactive oxygen species (ROS) and phenolics. *Food Science & Nutrition*, 00, 1–8. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2517>.
- Baron, D., Esteves Amaro, A. C., Pina, A., & Ferreira, G. (2019). An overview of grafting re-establishment in woody fruit species. *Scientia Horticulturae*, 243, 84–91.
- Bauduin, S., Latini, M., Belleggia, I., Migliore, M., Biancucci, M., Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., Funck, D., & Trovato, M. (2022). Interplay between proline metabolism and ROS in the fine tuning of root-meristem size in *Arabidopsis*. *Plants*, 11(10), 1512. <https://doi.org/10.3390/plants11111512>
- Beghi, S., Furmanik, M., Jaminon, A., Veltrop, R., Rapp, N., Wichapong, K., Bidar, E., Buschini, A., & Schurgers, L. J. (2022). Calcium signalling in heart and vessels: Role of calmodulin and downstream calmodulin-dependent protein kinases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 16139. <https://doi.org/10.3390/ijms232416139>.
- Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: Similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 639–666.
- Bergey, D. R., Kandel, R., Tyree, B. K., Dutt, M., & Dhekney, S. A. (2014). The role of calmodulin and related proteins in plant cell function: An ever-thickening plot. *Springer Science Reviews*, 2, 145–159. <https://doi.org/10.1007/s40362-014-0025-z>
- Bernard, A., Lheureux, F., & Dirlwanger, E. (2018). Walnut: Past and future of genetic improvement. *Tree Genetics & Genomes*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1214-0>

- Berthon, J. Y., Ben Tahar, S., Gaspar, T., & Boyer, N. (1990). Rooting phases of shoots of *Sequoiadendron giganteum* in vitro and their requirements. *Plant Physiology and Biochemistry*, 28(7), 631–638.
- Berthon, J. Y., Maldiney, R., Sotta, B., Gaspar, T., & Boyer, N. (1989). Endogenous levels of plant hormones during the course of adventitious rooting in cuttings of *Sequoiadendron giganteum* in vitro. *Biochemical and Physiological Plant Pathology*, 184, 405–412.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., & Wendehenne, D. (2008). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 21–39.
- Bettinger, B. T., Gilbert, D. M., & Amberg, D. C. (2004). Actin up in the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5), 410–415. <https://doi.org/10.1038/nrm1370>
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2006). *Real-time PCR applications guide* (pp. 1-100).
- Bisbis, B., Kevers, C., Crevecoeur, M., Dommes, J., & Gaspar, T. (2003). Restart of lignification in micropropagated walnut shoots coincides with rooting induction. *Biologia Plantarum*, 47(1), 1–5. <https://doi.org/10.1023/A:1027360326886>
- Blakesley, D. (1994). Auxin metabolism and adventitious root initiation. In T. D. Davis & B. E. Haissig (Eds.), *Biology of adventitious root formation* (pp. 143–154). Plenum Press.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., & Scheel, D. (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*, 12(8), 1425–1440.
- Bollmark, M., & Eliasson, L. (1990). Ethylene accelerates the breakdown of cytokinins and thereby stimulates rooting in Norway spruce hypocotyl cuttings. *Physiologia Plantarum*, 80(4), 534–540.
- Bonga, J. M. (1982). Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In J. M. Bonga & D. J. Durzan (Eds.), *Tissue culture in forestry* (pp. 387–412). Martinus Nijhoff and Dr W. Junk Publishers.
- Boonburapong, B., & Buaboocha, T. (2007). Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biology*, 7, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-4>.
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., & Shabala, S. (2014). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1241–1257. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert430>.
- Botella, J. R., & Arteca, R. N. (1994). Differential expression of two calmodulin genes in response to physical and chemical stimuli. *Plant Molecular Biology*, 24(5), 757–766.
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W. A., & Fromm, H. (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 435–466. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144224>.

- Bourrain, L., & Navatel, J. C. (1994). Micropropagation du noyer, *Juglans regia* L. Première partie: Production in vitro. *Infos-Ctifl*, 98, 40–48.
- Brière, C., Xiong, T. C., Mazars, C., & Ranjeva, R. (2006). Autonomous regulation of free Ca<sup>2+</sup> concentrations in isolated plant cell nuclei: A mathematical analysis. *Cell Calcium*, 39(5), 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.11.005>.
- Buchner, R. P., Milliron, L., Pierce, C., & Reyes, C. (2022, março). *Walnut news: Walnut management considerations - Spring 2022*. University of California Cooperative Extension, Tehama County. Disponível em <https://www.sacvalleyorchards.com>.
- Caboni, E., & Lauri, P. (1995). Effetto di fattori chimici, fisici e trasformazione localizzata sulla radicazione in vitro di noce. *Italus Hortus*, 4, 49–53.
- Cabral, E. (2008). Caracterização Molecular de variedades de noqueira (*Juglans regia* L.) portuguesas. Universidade do Porto.
- Câmara, C. R. S., & Schlegel, V. (2016). A review on the potential human health benefits of the black walnut: A comparison with the English walnuts and other tree nuts. *International Journal of Food Properties*, 19(10), 2175–2189. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1114951>
- Campos, M. D., Campos, C., Nogales, A., & Cardoso, H. (2021). Carrot AOX2a transcript profile responds to growth and chilling exposure. *Plants*, 10(11), 2369. <https://doi.org/10.3390/plants10112369>.
- Campos, M. D., Nogales, A., Cardoso, H. G., Kumar, S. R., Nobre, T., Sathishkumar, R., & Arnholdt-Schmitt, B. (2016). Stress-induced accumulation of DcAOX1 and DcAOX2a transcripts coincides with a critical time point for structural biomass prediction in carrot primary cultures (*Daucus carota* L.). *Frontiers in Genetics*, 7, 1. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00001>.
- Caprile, J., & Grattan, S. (2006). Evaluation of the salt tolerance of walnut rootstocks. *HortScience*, 41, 1040A. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.4.1040A>.
- Cardoso, H., Campos, C., Grzebelus, D., Egas, C., & Peixe, A. (2022). Understanding the role of PIN auxin carrier genes under biotic and abiotic stresses in *Olea europaea* L. *Biology*, 11(1040). <https://doi.org/10.3390/biology11071040>
- Carvalho, A. M., Morales, R., & Morales, R. (2010). Persistence of wild food and wild medicinal plant knowledge in a northeastern region of Portugal. In M. Prado-de Santayana, A. Pieroni, & R. Puri (Eds.), *Ethnobotany in the New Europe: People, health and wild plant resources* (pp. 147–172). Berghahn Books.
- Cassells, A. C. (2003). Micropropagation. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (p. 1353). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227050-9/00214-3>.

- CE (2006) - Commission Decision 2006/257/EC on the nomenclature of cosmetic ingredients. Comissão Europeia. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32006D0257>
- CE (2019) - *Trade Helpdesk*. Comissão Europeia. <http://exporthelp.europa.eu>.
- Chamary, J. V., & Hurst, L. D. (2004). Similar rates but different modes of sequence evolution in introns and at exonic silent sites in rodents: Evidence for selectively driven codon usage. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 1014–1023. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh087>
- Chandra, A., Thungapathra, M., & Upadhyaya, K. C. (1994). Molecular cloning and characterization of a calmodulin gene from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 3, 31–35. <https://doi.org/10.1007/BF03321945>.
- Chattopadhyaya, R., Meador, W. E., Means, A. R., & Quirocho, F. A. (1992). Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 228(4), 1177–1192.
- Chauhan, A., Sharma, D., Kumar, R., Shiwani, K., & Sharma, N. (2021). Recent trends in propagation of forest and horticultural crops (pp. 270–281). In S. Beura (Prof. Dr.), S. Rout (Dr.), S. Nayak (Dr.), K. Pradhan (Dr.), & N. Khare (Dr.) (Eds.), *Recent trends in propagation of forest and horticultural crops*. Taran Publication.
- Chauhan, J., Singhal, R. K., Chaudhary, S., & Sodani, R. (2017). Calmodulin in plant responses to abiotic stresses and signalling. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 5(6), 1122–1131.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>.
- Chen, F., Chen, J., Wang, Z., Zhang, J., Li, X., Lin, M., Song, Y., & Zhang, L. (2019). Genomics: Cracking the mysteries of walnuts. *Journal of Genetics*, 98(33).
- Chen, M., & Shen, X. (2007). Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(3), 326–330. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.009>
- Chenevard, D., Jay-Allemand, C., Gendraud, M., & Frossard, J. S. (1995). The effect of sucrose on the development of hybrid walnut microcuttings (*Juglans nigra* × *Juglans regia*): Consequences on their survival during acclimatization. *Annales des Sciences Forestières*, 52(2), 165–175.
- Cheon, W., Kim, Y. S., Lee, S. G., Jeon, Y. H., & Chun, I. J. (2013). First report of branch dieback of walnut caused by *Neofusicoccum parvum* in Korea. *Plant Disease*, 97(8), 1114.
- Choi, Y. J., Cho, E. K., Lee, S. I., Lim, C. O., Gal, S. W., et al. (1996). Developmentally regulated expression of the rice calmodulin promoter in transgenic tobacco plants. *Molecular Cells*, 6, 541–546.

- Coggeshall, M. V., & Beineke, W. F. (1997). Black walnut vegetative propagation: The challenge continues. In *Proceedings of the 5th Black Walnut Symposium*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experiment Station.
- Collinge, M., & Trewavas, A. J. (1989). The location of calmodulin in the pea plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 264(15), 8865–8872.
- Cookson, S. J., Clemente Moreno, M. J., Hevin, C., Nyamba Mendome, L. Z., Magnin, N., Trossat-Magnin, C., & Ollat, N. (2014). Heterografting with nonself rootstocks induces genes involved in stress responses at the graft interface when compared with autografted controls. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2473–2481. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru145>
- Cordova, I. W., Oludemi, T., Vieira, V., Pires, T. C. S. P., Pinho, S. P., Barros, L., & Ferreira, O. (2024). Extraction of phenolic compounds from *Juglans regia* L. leaves using aqueous solutions of eutectic solvents. *Separation and Purification Technology*, 354, 129214. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.129214>.
- Corneliussen, B., Holm, M., Waltersson, Y., Onions, J., Thornell, A., & Grundström, T. (1994). Calcium/calmodulin inhibition of basic helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature*, 368(6473), 760–764. <https://doi.org/10.1038/368760a0>.
- Cornu, D., & Chaix, C. (1981). Multiplication par culture *in vitro* de merisiers adultes (*Prunus avium*): Application à un large éventail de clones. In *Proceedings of the IUFRO Section S2 01 5 International Workshop “In Vitro” for Tree Species* (pp. 71–79). Fontainebleau, France.
- Cornu, D., & Jay-Allemand, C. (1989). Micropropagation of hybrid walnut trees (*Juglans nigra* × *Juglans regia*) through culture and multiplication of embryos. *Annales des Sciences Forestières*, 46, 113–116.
- Cornu, D., Riffaud, J. L., & Capelli, P. (1981). *In vitro* propagation of wild cherry tree (*Prunus avium* L.). In *Proceedings of the IUFRO Section S2 01 5 International Workshop “In Vitro” for Tree Species* (pp. 133–134). Fontainebleau, France.
- Corrêa, L. d. R., Paim, D. C., Schwambach, J., & Fett-Neto, A. G. (2005). Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Growth Regulation*, 45(1), 63–73.
- Cosmulescu, S., Trandafir, I., & Nour, V. (2014). Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (*Juglans regia*) leaves. *Pharmacognosy Magazine*, 52, 575–580.
- Creelman, R. A., Tierney, M. L., & Mullet, J. E. (1992). Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), 4938–4941.



- Crow, J. F. (1998). 90 years ago: The beginning of hybrid maize. *Genetics*, 148, 923–928.
- Da Costa, C. T., de Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. S., & Fetto Neto, A. G. (2013). When stress and development go hand in hand: Main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 4, 133. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00133>
- Damodaran, S., & Strader, L. C. (2019). Indole 3-butyric acid metabolism and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 851. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00851>
- Dandekar, A., Leslie, C., & McGranahan, G. (2005). *Juglans regia* walnut. In R. E. Litz (Ed.), *Biotechnology of fruit and nut crops* (Biotechnology in Agriculture, 29). The Doyle Foundation.
- Darwin, C., & Darwin, F. (1880). *The power of movement in plants*. John Murray.
- Davies, P. J. (Ed.). (1995). *Plant hormones* (pp. 13-38). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- De Klerk, G. J., & Ter Brugge, J. (1992). Factors affecting adventitious root formation in microcuttings of *Malus*. *Agronomie*, 12(7), 747–755.
- De Klerk, G. J., Guan, H., Huisman, P., & Marinova, S. (2011). Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus* ‘Jork 9’. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 175–185.
- De Klerk, G. J., Van der Krieken, W., & De Jong, J. C. (1999). The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35(3), 189–199.
- De Klerk, G.-J. (2002). Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In Vitro Cell. Developmental Biology - Plant*, 38(5), 415–422.
- Del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(9), 2827–2837. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv099>
- Delarue, M., Prinsen, E., Onckelen, H. V., Caboche, M., & Bellini, C. (1998). Sur2 mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *The Plant Journal*, 14, 603–611.
- Della Rovere, F., Fattorini, L., D’Angeli, S., Veloccia, A., Del Duca, S., Cai, G., et al. (2015). *Arabidopsis* SHR and SCR transcription factors and AUX1 auxin influx carrier control the switch between adventitious rooting and xylogenesis *in planta* and in *in vitro* cultured thin cell layers. *Annals of Botany*, 115(4), 617–628.
- Della Rovere, F., Fattorini, L., D’Angeli, S., Veloccia, A., Falasca, G., & Altamura, M. (2013). Auxin and cytokinin control formation of the quiescent centre in the adventitious root apex of *Arabidopsis*. *Annals of Botany*, 112(8), 1395–1407.
- Della Rovere, F., Fattorini, L., Ronzan, M., Falasca, G., & Altamura, M. M. (2016). The quiescent centre and the stem cell niche in the adventitious roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant*

- Signaling & Behavior*, 11(5), e1176660.  
<https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1176660>
- Díaz-Sala, C. (2019). Molecular dissection of the regenerative capacity of forest tree species: Special focus on conifers. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1943.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01943>.
- Dietz, K. J., Turkan, I., & Krieger-Liszkay, A. (2016). Redox- and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast. *Plant Physiology*, 171(3), 1541–1550. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00375>.
- Do, J. H., & Choi, D. K. (2008). Clustering approaches to identifying gene expression patterns from DNA microarray data. *Molecules and Cells*, 25(2), 279–288.
- Dodd, A. N., Kudla, J., & Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 593–620.
- Dode, L. A. (1906). Contribution à l'étude du genre *Juglans*. *Bulletin de la Société Dendrologique de France*, 2, 67–97.
- Dode, L. A. (1909a). Contribution à l'étude du genre *Juglans*. *Bulletin de la Société Dendrologique de France*, 11, 140–166.
- Dode, L. A. (1909b). Contribution à l'étude du genre *Juglans*. *Bulletin de la Société Dendrologique de France*, 13, 165–213.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Gruselle, R., Meier-Dinkel, A., Jay-Allemand, C., & Gaspar, T. (2004). Practical factors controlling in vitro adventitious root formation from walnut shoot microcuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(2), 198–203.
- Dong, P., Yuan, L., Wang, Q., & Gu, R. (2007). Factors affecting rooting of in vitro shoots of walnut cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(2), 223–226. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512223>.
- dos Remedios, C. G. (1981). Lanthanide ion probes of calcium binding sites on cellular membrane. *Cell Calcium*, 2(1), 29–51.
- Driver, J. A. (1986). *Method for acclimatizing and propagating plant tissue culture shoots* (U.S. Patent No. 4,612,725). U.S. Patent and Trademark Office.
- Driver, J., & Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19(4), 507–509.
- Druege, U., & Kadner, R. (2008). Response of post-storage carbohydrate levels in *Pelargonium* cuttings to reduced air temperature during rooting and the relationship with leaf senescence and adventitious root formation. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2), 126–135.
- Druege, U., Franken, P., Lischewski, S., Ahkami, A. H., Zerche, S., Hause, B., & Hajirezaei, M. R. (2014). Transcriptomic analysis reveals ethylene as stimulator and auxin as regulator



- of adventitious root formation in petunia cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 5, 494. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00494>
- Druege, U., Hilo, A., Pérez-Pérez, J. M., Klopotek, Y., Acosta, M., Shahinnia, F., Zerche, S., Franken, P., & Hajirezaei, M. R. (2019). Molecular and physiological control of adventitious rooting in cuttings: Phytohormone action meets resource allocation. *Annals of Botany*, 123(6), 929–949. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy234>
- Druege, U., Zerche, S., & Kadner, R. (2004). Nitrogen- and storage-affected carbohydrate partitioning in high-light-adapted *Pelargonium* cuttings in relation to survival and adventitious root formation under low light. *Annals of Botany*, 94(6), 831–842.
- Druege, U., Zerche, S., Kadner, R., & Ernst, M. (2000). Relation between nitrogen status, carbohydrate distribution and subsequent rooting of *Chrysanthemum* cuttings as affected by pre-harvest nitrogen supply and cold storage. *Annals of Botany*, 85(6), 687–701.
- Dubrovina, A. S., Aleynova, O. A., Ogneva, Z. V., Suprun, A. R., Ananov, A. A., & Kiselev, K. V. (2019). The effect of abiotic stress conditions on expression of calmodulin (CaM) and calmodulin-like (CML) genes in wild-growing grapevine *Vitis amurensis*. *Plants*, 8(12), 602. <https://doi.org/10.3390/plants8120602>.
- Durzan, D. J. (1984). Special problems: Adult vs. juvenile explants. In W. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato, & Y. Yamada (Eds.), *Handbook of plant cell culture, crop species* (Chap. 17, pp. 471–503). MacMillan Publishing Company.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14863–14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14863>.
- Ermel, F. F., Vizoso, S., Charpentier, J. P., Jay-Allemand, C., Catesson, A. M., & Couée, I. (2000). Mechanisms of primordium formation during adventitious root development from walnut cotyledon explants. *Planta*, 211, 563–574.
- Ertürk, Ü., Mert, C., Soylu, A., Akça, Y., & Okay, Y. (2014). Evaluation of some domestic and foreign walnut cultivars in the conditions of Bursa, Turkey. *Acta Horticulturae*, 1050, 123–130.
- Esau, K. (1953). Differentiation in shoot and root axes. In W. E. Loomis (Ed.), *Growth and differentiation in plants* (pp. 69-100). Iowa State College Press.
- Eun, H. M. (1996). *Enzymes and nucleic acids: General principles*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012243740-3/50004-1>.
- Evers, P. W., Donkers, J., Prat, A., & Vermeer, E. (Eds.). (1988). *Micropropagation of forest trees through tissue culture*. Pudoc, Wageningen.
- Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M., & Kailis, S. G. (2004). *Olive propagation manual*. CSIRO Publishing.

- Falasca, G., & Altamura, M. M. (2003). Histological analysis of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh seedlings. *Plant Biosystems*, 137, 265–273.
- Fan, S., Meng, Y., Song, M., Pang, C., Wei, H., Liu, J., Zhan, X., Lan, J., Feng, C., Zhang, S., & Yu, S. (2014). Quantitative phosphoproteomics analysis of nitric oxide-responsive phosphoproteins in cotton leaf. *PLoS ONE*, 9(4), e94261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094261>
- Farias da Silva, M. K., Siqueira, D. P., Weiss de Carvalho, G. C. M., Silva, R. D., Martins da Rocha Silva, R., & Barroso, D. G. (2022). Hydrogen peroxide enhanced indole-3-butyric acid effects on *Cordia trichotoma* adventitious rooting. *Rhizosphere*, 22, 100533.
- Farinha, D., Mendes, M., Barroso, J. M., Peixe, A., Dias, A., & Rato, A. E. (2023). Physiological parameters that contribute to Kernel Shrivell in walnuts. *Revista da Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal*, 46(2), 125-134. <https://doi.org/10.19084/rca.31322>
- Fattorini, L., Velocchia, A., Della Rovere, F., D'Angeli, S., Falasca, G., & Altamura, M. M. (2017). Indole-3-butyric acid promotes adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana* thin cell layers by conversion into indole-3-acetic acid and stimulation of anthranilate synthase activity. *BMC Plant Biology*, 17, 121. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1071-x>
- Fiume, E., Christou, P., Giani, S., & Breviario, D. (2004). Introns are key regulatory elements of rice tubulin expression. *Planta*, 218(4), 693–703.
- Flasiński, M., & Hąc-Wydro, K. (2014). Natural vs synthetic auxin: Studies on the interactions between plant hormones and biological membrane lipids. *Environmental Research*, 133, 123–134.
- Florestas.pt. (2022). *Noz portuguesa: uma década de expansão*. Florestas.pt. <https://florestas.pt/valorizar/noz-portuguesa-em-expansao-na-ultima-decada/>
- Fogaça, C. M., & Fett-Neto, A. G. (2005). Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of Eucalyptus species differing in recalcitrance. *Plant Growth Regulation*, 45, 1–10.
- Forsén, S., Linse, S., Drakenberg, T., Kordel, J., Akke, M., Sellers, P., Johansson, C., Thulin, E., Andersson, I., Brodin, P., et al. (1991). Ca<sup>2+</sup> binding in proteins of the calmodulin superfamily: Cooperativity, electrostatic contributions, and molecular mechanisms. *Ciba Foundation Symposium*, 161, 222–236.
- Frederickson Matika, D. E., & Loake, G. J. (2014). Redox regulation in plant immune function. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(9), 1373–1388. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5679>.
- Frick, E. M., & Strader, L. C. (2018). Roles for IBA-derived auxin in plant development. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 169–177. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx298>

- Frohnmeier, H., Loyall, L., Blatt, M. R., & Grabov, A. (1999). Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant Journal*, 20(2), 109–117.
- Gaffney, D. J., & Keightley, P. D. (2006). Genomic selective constraints in murid noncoding DNA. *PLoS Genetics*, 2(10), e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020204>
- Gandev, S. (2014). State-of-the-art and problems of walnut propagation methods. *Agrozanje*, 15(1), 95-103. <https://doi.org/10.7251/AGREN1401095G>
- Garmendia, M. F., & Navarro, C. (2013). *Juglans L.* In S. Castroviejo (Coord.), *Flora Iberica IX*. Real Jardín Botánico, CSIC.
- Gaspar, T., Kevers, C., & Hausman, J.-F. (1997). Indissociable chief factors in the inductive phase of adventitious rooting. In A. Altman & P. Waisel (Eds.), *Biology of root formation and development* (pp. 95-103). Plenum Press.
- Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J. F., & Ripetti, V. (1994). Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In P. J. Lumsden, J. R. Nicholas, & W. J. Davies (Eds.), *Physiology, growth and development of plants in culture* (pp. 289–298). Kluwer Academic Publishers.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 32, 272–289.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571-607). Humana Press.
- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., & Minkov, I. (2002). Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(5), 708–714.
- Geiss, G., Gutierrez, L., & Bellini, C. (2009). Adventitious root formation: New insights and perspectives. In T. Beeckman (Ed.), *Annual plant reviews: Root development* (Vol. 37, pp. 127–156). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444310023.ch5>.
- Germain, E., & Sarraquigne, J. P. (2004). *Inventory of walnut research, germplasm and references*. FAO. Disponível em <https://www.fao.org/4/y5704e/y5704e03.htm>
- Germain, E., Prunet, J.-P., & Garcin, A. (1999). *Le noyer: Monographie*. Ctifl.
- Gianfagna, T. (1995). Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops. In P. J. Davies (Ed.), *Plant hormones* (pp. 751-773). Kluwer Academic Publishers.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>.

- Gilroy, S., & Trewavas, A. (2001). Signal processing and transduction in plant cells: The end of the beginning. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(4), 307–314.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J. P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J. C., & et al. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455, 189–194.
- Gonçalves, J. C., Diogo, G., & Amancio, S. (1998). In vitro propagation of chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*, 72(3–4), 265–275.
- Gong, M., van der Luit, A. H., Knight, M. R., & Trewavas, A. J. (1998). Heat-shock-induced changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiology*, 116(1), 429–437.
- Gong, W., Niu, L., Wang, C., Wei, L., Pan, Y., & Liao, W. (2022). Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-induced adventitious rooting in cucumber under cadmium stress. *Journal of Plant Biology*, 65(1), 43–52.
- Gonin, M., Bergounoux, V., Nguyen, T. D., Gantet, P., & Champion, A. (2019). What makes adventitious roots? *Plants*, 8(7), 240. <https://doi.org/10.3390/plants8070240>.
- González, A., Casares, A., Sánchez, T. R., & Rodríguez, R. (1991). Adventitious root induction in *Corylus avellana* L. cotyledon. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 27(2), 125–131.
- GPP. (2007). Noz. Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral.
- Gribble, K. D., Conroy, J. P., Holford, P., & Milham, P. J. (2002). In vitro uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation. *Australian Journal of Botany*, 50(6), 713–723. <https://doi.org/10.1071/BT02018>.
- Gross, E., Sevier, C. S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C. A., Thorpe, C., & Fass, D. (2006). Generating disulfides enzymatically: Reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 299–304. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506448103>.
- Gruselle, R., & Boxus, P. (1990). Walnut micropropagation. *Acta Horticulturae*, 284, 45–52.
- Gruselle, R., Badia, N., & Boxus, P. (1987). Walnut micropropagation: First results. *Acta Horticulturae*, 212, 511–515.
- Grygorczyk, C., & Grygorczyk, R. (1998). A  $\text{Ca}^{2+}$ - and voltage-dependent cation channel in the nuclear envelope of red beet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1375(1–2), 117–130. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(98\)00142-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(98)00142-4).
- Guo, W., Chen, J., Li, J., Huang, J., Wang, Z., & Lim, K. J. (2020). Portal of Juglandaceae: A comprehensive platform for Juglandaceae study. *Horticulture Research*, 7(1), 35.

- Gupta, S., Sahoo, G., & Wani, A. M. (2022). *Propagation of forest tree species by vegetative propagation*. ARAN Publication.
- Hackett, W. P. (1985). Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Horticultural Reviews*, 7, 109–155.
- Hackett, W., McKenna, J., Burchell, T., & Leslie, C. (2000). Stock plant manipulation to enhance rooting and nursery survival of walnut cuttings. *Walnut Research Reports*, USA, 109–114.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>.
- Hammond, J. B., & Kruger, N. J. (1988). The Bradford method for protein quantitation. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 3, pp. 25–32).
- Han, S., Han, X., Qi, C., Guo, F., Yin, J., Liu, Y., & Zhu, Y. (2024). Genome-wide identification of DUF668 gene family and expression analysis under *Fusarium solani*, chilling, and waterlogging stresses in *Zingiber officinale*. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 929. <https://doi.org/10.3390/ijms25020929>
- Hand, P. (1994). Biochemical and Molecular Markers of Cellular Competence for Adventitious Rooting.
- Harper, J. F., Breton, G., & Harmon, A. (2005). Plants, symbiosis, and parasites: A calcium signaling connection. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(7), 555–566.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. L. (Eds.). (1997). *Plant propagation: Principles and practices* (6th ed.). Prentice-Hall.
- Hassankhah, A., Vahdati, K., Lotfi, M., Mirmasoumi, M., Preece, J., & Assareh, M. H. (2014). Effects of ventilation and sucrose concentrations on the growth and plantlet anatomy of micropropagated Persian walnut plants. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 1(2), 111–120.
- Hausman, J. F. (1993). Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised in vitro. *Plant Growth Regulation*, 13(3), 263–268.
- Hayashi, K., Arai, K., Aoi, Y., Tanaka, Y., Hira, H., Guo, R., Hu, Y., Ge, C., Zhao, Y., Kasahara, H., ... & Fukui, K. (2021). The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications*, 12, 6752.
- He, W., Wang, Y., Chen, Q., Sun, B., Tang, H. R., Pan, D. M., & Wang, X. R. (2018). Dissection of the mechanism for compatible and incompatible graft combinations of *Citrus grandis* (L.) Osbeck (Hongmian Miyou). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 505. <https://doi.org/10.3390/ijms19020505>

- Heloir, M.-C., Kevers, C., Hausman, J.-F., & Gaspar, T. (1996). Changes in the concentrations of auxins and polyamines during rooting of in-vitro-propagated walnut shoots. *Tree Physiology*, 16(5), 515–519. <https://doi.org/10.1093/treephys/16.5.515>.
- Hoad, S. P., & Leakey, R. R. B. (1996). Effects of pre-severance light quality on the vegetative propagation of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden: Cutting morphology, gas exchange, and carbohydrate status during rooting. *Trees*, 10(6), 317–324.
- Hochholdinger, F., Woll, K., Sauer, M., & Dembinsky, D. (2004). Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific developmental programmes. *Annals of Botany*, 93(4), 359–368.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), 585–587. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm259>
- Hrabovský, M., Randáková, Z., Rendeková, A., & Mičieta, K. (2017). Classification of fruits of vascular plants: News in morphology and Slovak nomenclature. *Acta Botanica Universitatis Comenianae*, 52, 71–83.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296–1297. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>
- Huang, A., Wang, Y., Liu, Y., Wang, G., & She, X. (2020). Reactive oxygen species regulate auxin levels to mediate adventitious root induction in *Arabidopsis* hypocotyl cuttings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(7), 912–926.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzländer, M., Belt, K., & Millar, A. H. (2016). The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. *Plant Physiology*, 171(3), 1551–1559. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00166>.
- Hurst, V., Shimada, K., & Gasser, S. M. (2019). Nuclear actin and actin-binding proteins in DNA repair. *Trends in Cell Biology*, 29(6), 462–476. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.02.010>
- Husen, A. (2008). Stock-plant etiolation causes drifts in total soluble sugars and anthraquinones, and promotes adventitious root formation in teak (*Tectona grandis* L. f.) coppice shoots. *Plant Growth Regulation*, 54(1), 13–21.
- Husen, A., & Pal, M. (2007). Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. *New Forests*, 33(3), 309–323.



- INE. (2022). Estatísticas Agrícolas 2021. In Instituto Nacional de Estatística, I. P. Adams, S., Lordan, J., Fazio, G., Bugbee, B., Francescato, P., Robinson, T. L., & Black, B. (2018). Effect of scion and graft type on transpiration, hydraulic resistance and xylem hormone profile of apples grafted on Geneva fi 41 and M.9-NICTM29 rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 227, 213–222.
- Instituto Nacional de Estatística. (2021). *Estatísticas agrícolas - 2020*. Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISBN 978-989-25-0572-5. Disponível em <https://www.ine.pt>
- International Nut and Dried Fruit Council. (2023). *Nuts & Dried Fruits Statistical Yearbook 2022/23*. International Nut and Dried Fruit Council.
- Iqbal, M., & Singh, K. K. (2020). Propagation of temperate fruit crops. *Innovative Agriculture and Botany*, 119-135.
- Jacquetnet, S., & Moneret-Vautrin, D. A. (2007). Classification botanique des fruits à coque. *Revue Française d'Allergologie*, 47, 487–491.
- Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inès, J., Al-Juburi, H., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., & Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(3), 427–436.
- Jarvis, B. C. (1986). The rooting inductive phase: A consensus on the necessary biochemical events leading to the initiation of cell divisions and formation of root primordia. *Journal of Plant Growth Regulation*, 5(2), 118-123.
- Jasik, J., & Klerk, G. J. D. (1997). Anatomical and ultrastructural examination of adventitious root formation in stem slices of apple. *Biologia Plantarum*, 39(1), 79–90.
- Jay-Allemand, C., Bruant, B., Burtin, P., Fady, B., Lefevre, F., & Germain, E. (2001). Genetics of phenolic compounds in walnut: Qualitative and quantitative variations among cultivars. *Acta Horticulturae*, 544, 73–81. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.544.7>
- Jay-Allemand, C., Capelli, P., & Cornu, D. (1992). Root development of in vitro hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium. *Scientia Horticulturae*, 51(3), 335-342.
- Jaynes, R. A. (1969). *Handbook of North American nut trees*. Northern Nut Growers Association.
- Jimenes, I. M., Mayer, N. A., Dias, C. T. S., Scarpere Filho, J. A., & da Silva, S. R. (2018). Influence of clonal rootstocks on leaf nutrient content, vigor, and productivity of young Sunraycer nectarine trees. *Scientia Horticulturae*, 235, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.075>
- Junho, C. V. C., Caio-Silva, W., Trentin-Sonoda, M., & Carneiro-Ramos, M. S. (2020). An overview of the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase in cardiorenal syndrome. *Frontiers in Physiology*, 11, 735. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00735>.

- Kadota, M., & Niimi, Y. (2004). Influences of carbon sources and their concentrations on shoot proliferation and rooting of 'Hosui' Japanese pear. *HortScience*, 39(7), 1681–1683. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.7.1681>.
- Kang, W., Wang, L.-Y., Li, R., Zhang, C.-C., Wu, L.-Y., Li, H.-L., & Cheng, H. (2018). Endogenous nitric oxide and hydrogen peroxide detection in indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation in *Camellia sinensis*. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(11), 2273–2280.
- Kaur, R., Kumar, K., Sharma, D. R., Sharma, S. D., & Sharma, N. (2006). *Scientia Horticulturae*, 109, 385.
- Kepenek, K. (1994). In *Proceedings of the 24th International Horticultural Congress, Kyoto*, Abstract 0-7-1.
- Kepenek, K., & Kolagasid, Z. (2016). Micropropagation of walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Physica Polonica A*, 130(1).
- Keren, I., Abudraham, S., Shaya, F., & Ostersetzer-Biran, O. (2011). An optimized method for the analysis of plant mitochondria RNAs by Northern-blotting. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, 21, 34-42.
- Kevers, C., Hausman, J. F., Faivre-Rampant, O., Evers, D., & Gaspar, T. (1997). Hormonal control of adventitious rooting: Progress and questions. *Journal of Applied Botany*, 71, 71–79.
- Kim, M. C., Chung, W. S., Yun, D.-J., & Cho, M. J. (2009). Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular Plant*, 2(1), 13–21. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn091>.
- Kirca, S., Yarılgac, T., Kirca, L., & Bak, T. (2014). Study on the selection of walnut (*Juglans regia* L.) in Trabzon. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 1, 835–841.
- Klopotek, Y., Haensch, K. T., Hause, B., Hajirezaei, M. R., & Druege, U. (2010). Dark exposure of petunia cuttings strongly improves adventitious root formation and enhances carbohydrate availability during rooting in the light. *Journal of Plant Physiology*, 167(6), 547–554.
- Knight, M. R., Campbell, A. K., Smith, S. M., & Trevaas, A. J. (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 352(6338), 524–526.
- Koepfli, J. B., Thimann, K. V., & Went, F. W. (1938). Phytohormones: Structure and physiological activity. *Journal of Biological Chemistry*, 122, 209–220.
- Kohlen, W., Charnikhova, T., Lammers, M., Pollina, T., Tóth, P., Haider, I., Pozo, M. J., de Maagd, R. A., Ruyter-Spira, C., Bouwmeester, H. J., & et al. (2012). The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 (SlCCD8) regulates rhizosphere



- signaling, plant architecture, and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytologist*, 196(2), 535–547.
- Koornneef, M., & Meinke, D. (2010). Arabidopsis: A rich harvest 10 years after completion of the genome sequence. *The Plant Journal*, 61(6), 909–921.
- Korasick, D. A., Enders, T. A., & Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2541–2555.
- Kornova, K., Stephanova, A., & Terzijsky, D. (1993). In vitro culture of immature embryos and cotyledons of *Juglans regia* L.: Morphological and anatomical analyses of some regenerants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 7, 34–39.
- Kretsinger, R. H., & Nockolds, C. E. (1973). Carp muscle calcium-binding protein: II. Structure determination and general description. *Journal of Biological Chemistry*, 248(9), 3313–3326.
- Kuniyuki, A., & Forde, H. (1985). Walnut propagation. In D. Ramos (Ed.), *Walnut orchard management* (pp. 38–46). Publication 21410, University of California.
- Kurepin, L., Haslam, T., Lopez-Villalobos, A., Oinam, G., & Yeung, E. (2011). Adventitious root formation in ornamental plants: II. The role of plant growth regulators. *Propagation of Ornamental Plants*, 11, 161–171.
- Kuroha, T., Kato, H., Asami, T., Yoshida, S., Kamada, H., & Satoh, S. (2002). A trans-zeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*, 53(371), 2193–2200.
- Kuroha, T., Ueguchi, C., & Satoh, S. (2005). The defect of Arabidopsis histidine kinase genes leads to retarded vascular system of hypocotyls and the accumulation of auxin resulting in the inhibition of lateral root formation and induction of adventitious root formation. *Plant Cell Physiology*, 46(S1), S48.
- Kushwaha, B. K., Singh, S., Tripathi, D. K., Sharma, S., Prasad, S. M., Chauhan, D. K., Kumar, V., & Singh, V. P. (2019). New adventitious root formation and primary root biomass accumulation are regulated by nitric oxide and reactive oxygen species in rice seedlings under arsenate stress. *Journal of Hazardous Materials*, 361, 134–140.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lakehal, A., & Bellini, C. (2019). Control of adventitious root formation: Insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiologia Plantarum*, 165(1), 90–100.
- Lanteri, M. L., Pagnussat, G. C., & Lamattina, L. (2006). Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1341–1351.

- Larson-Johnson, K. (2016). Phylogenetic investigation of the complex evolutionary history of dispersal mode and diversification rates across living and fossil Fagales. *New Phytologist*, 209(2), 418–435.
- Lavy, M., & Estelle, M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development*, 143(18), 3226–3229. <https://doi.org/10.1242/dev.131870>.
- Lebedev, V. G., Korobova, A. V., Shendel, G. V., Kudoyarova, G. R., & Shestibratov, K. A. (2018). Effect of glutamine synthetase gene overexpression in birch (*Betula pubescens*) plants on auxin content and rooting *in vitro*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 480, 143–145. <https://doi.org/10.1134/S1607672918030043>
- Leslie, C. A., Hackett, W. P., & McGranahan, G. H. (2009). Improved rooting methods for walnut (*Juglans*) microshoots. *Acta Horticulturae*, 861, 365–372.
- Leslie, C. A., Hackett, W. P., Bujazha, D., Hirbod, S., & McGranahan, G. H. (2006). Adventitious rooting and clonal plant production of hybrid walnut (*Juglans*) rootstock selections. In M. E. Malvoti & D. Avanzato (Eds.), *Proceedings of the Vth International Walnut Symposium* (Acta Horticulturae, 705, pp. 325–328).
- Leslie, C., & McGranahan, G. (1992). High-tech and micropropagation II. In J. M. Widholm, J. Kumlehn, & T. Nagata (Eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Vol. 18, Ch. I.7, p. 136). Springer.
- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, 52(78–82).
- Lewis, D. R., Negi, S., Sukumar, P., & Muday, G. K. (2011). Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development*, 138(16), 3485–3495.
- Li, M. Y., Cao, Z. Y., Shen, W. B., & Cui, J. (2011). Molecular cloning and expression of a cucumber (*Cucumis sativus* L.) heme oxygenase-1 gene, CsHO1, which is involved in adventitious root formation. *Gene*, 486(1), 47–55.
- Li, S. W., & Xue, L. G. (2010). The interaction between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO, Ca<sup>2+</sup>, cGMP, and MAPKs during adventitious rooting in mung bean seedlings. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(2), 142–148.
- Li, S. W., Leng, Y., & Shi, R. F. (2017). Transcriptomic profiling provides molecular insights into hydrogen peroxide-induced adventitious rooting in mung bean seedlings. *BMC Genomics*, 18, 188.
- Li, S., Xue, L., Xu, S., Feng, H., & An, L. (2007). Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. *Plant Growth Regulation*, 52, 173–180.

- Li, S.-W., Xue, L., Xu, S., Feng, H., & An, L. (2009a). Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 65(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.06.004>.
- Li, S.-W., Xue, L., Xu, S., Feng, H., & An, L. (2009b). Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Botanical Review*, 75(2), 230–247.
- Li, X.-P., Xu, Q.-Q., Liao, W.-B., Ma, Z.-J., Xu, X.-T., Wang, M., Ren, P.-J., Niu, L.-J., Jin, X., & Zhu, Y.-C. (2016). Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced adventitious rooting in cucumber (*Cucumis sativus* L.) under drought stress. *Journal of Plant Biology*, 59, 536–548.
- Liao, W. B., Huang, G. B., Yu, J. H., Zhang, M. L., & Shi, X. L. (2011). Nitric oxide and hydrogen peroxide are involved in indole-3-butyric acid-induced adventitious root development in marigold. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 86(2), 159–165.
- Liao, W. B., Xiao, H. L., & Zhang, M. L. (2010). Effect of nitric oxide and hydrogen peroxide on adventitious root development from cuttings of ground-cover Chrysanthemum and associated biochemical changes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(4), 338–348.
- Liao, W., Xiao, H., & Zhang, M. (2009). Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in adventitious root development of marigold. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(6), 1279–1289.
- Liao, W.-B., Zhang, M.-L., Huang, G.-B., & Yu, J.-H. (2012).  $\text{Ca}^{2+}$  and CaM are involved in  $\text{NO}$ - and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced adventitious root development in marigold. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 253–264. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9235-7>.
- Licea-Moreno, R. J. (2016). *Biotecnología forestal aplicada a la producción de madera de nogal* [Tese de doutorado, Universidad Politécnica de Madrid]. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2295.1927>.
- Licea-Moreno, R. J., Contreras, A., Morales, A. V., Urban, I., Daquinta, M., & Gomez, L. (2015). Improved walnut mass micropropagation through the combined use of phloroglucinol and FeEDDHA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123(1), 143–154. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0822-3>.
- Licea-Moreno, R. J., Morales, A. V., Daquinta Gradaille, M., & Gómez, L. (2012). *Towards scaling-up the micropropagation of Juglans major (Torrey) Heller var. 209 × J. regia L., a hybrid walnut of commercial interest*. In IUFRO Working Party 2.09.02 Conference: Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management, Brno, Czech Republic.
- Linse, S., & Forsén, S. (1995). Determinants that govern high-affinity calcium binding. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, 30, 89–151.

- Liu, F., He, Y., & Li, D. (2024). Own-rooted walnut propagule of four walnut (*Juglans*) rootstocks and main cultivated cultivar Liaoning 1 acquirement through layering under field conditions. *HortScience*, 59(1), 99–104.
- Liu, R., Chen, S., Jiang, J., Zhu, L., Zheng, C., Han, S., Gu, J., Sun, J., Li, H., Wang, H., Song, A., & Chen, F. (2013). Proteomic changes in the base of chrysanthemum cuttings during adventitious root formation. *BMC Genomics*, 14(1), 919. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-919>
- Liu, W., Li, W., He, Q., Daud, M. K., Chen, J., & Zhu, S. (2014). Genome-wide survey and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in *Gossypium raimondii*. *PLoS ONE*, 9(6), e98189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098189>.
- Liu, X., Barkawi, L., Gardner, G., & Cohen, J. D. (2012). Transport of indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid in *Arabidopsis* hypocotyls using stable isotope labeling. *Plant Physiology*, 158(4), 1988–2000. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191288>.
- Liu, Y., Chen, W., Liu, L., Su, Y., Li, Y., Jia, W., Jiao, B., Wang, J., Yang, F., Dong, F., Chai, J., Zhao, H., Lv, M., Li, Y., & Zhou, S. (2022). Genome-wide identification and expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Signaling & Behavior*, 17(1), e2013646. <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.2013646>.
- Lovell, P. H., & White, J. (1986). Anatomical changes during adventitious root formation. In M. B. Jackson (Ed.), *New root formation in plants and cuttings* (pp. 111–140). Springer.
- Ludwig-Müller, J., & Epstein, E. (1991). Occurrence and in vivo biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiology*, 97(2), 765–770. <https://doi.org/10.1104/pp.97.2.765>.
- Ludwig-Müller, J., Sass, S., Sutter, E. G., Wodner, M., & Epstein, E. (1993). Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 13(2), 179–187. <https://doi.org/10.1007/BF00024260>.
- Luna, C. M., Pastori, G. M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S., & Foyer, C. H. (2005). Drought controls on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 417–423. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri039>.
- Luo, M., You, F. M., Li, P., Wang, J., Zhu, T., Dandekar, A. M., et al. (2015). Synteny analysis in Rosids with a walnut physical map reveals slow genome evolution in long-lived woody perennials. *BMC Genomics*, 16, 707.
- Mable, B. K., Alexandrou, M. A., & Taylor, M. I. (2011). Genome duplication in amphibians and fish: An extended synthesis. *Journal of Zoology*, 284(3), 151–182.
- Macedo, E., Vieira, C., Carrizo, D., Porfirio, S., Hegewald, H., Arnholdt-Schmitt, B., Calado, M., & Peixe, A. (2013). Adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.) microshoots:

- Anatomical evaluation and associated biochemical changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 88(1), 53–59.
- Man, H., Pollmann, S., Weiler, E. W., & Kirby, E. G. (2011). *Título do artigo. Journal of Experimental Botany*, 62, 4423–4431.
- Manning, W. E. (1978). The classification within the Juglandaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 65(4), 1058–1087.
- Manos, P. S., Soltis, P. S., Soltis, D. E., Manchester, S. R., Oh, S.-H., Bell, C. D., Dilcher, D. L., & Stone, D. E. (2007). Phylogeny of extant and fossil Juglandaceae inferred from the integration of molecular and morphological data sets. *Systematic Biology*, 56(3), 412–430. <https://doi.org/10.1080/10635150701408523>.
- Marketing Agrícola. (2017). *Produção e comercialização de noz*. <https://marketingagricola.pt/producao-e-comercializacao-de-noz/>.
- Martínez-Ballesta, M. C. (2010). Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 112–118.
- Martínez-Ballesta, M. C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C., & Carvajal, M. (2010). Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 112–118.
- Martínez-García, P. J., Crepeau, M. W., Puiu, D., Gonzalez-Ibeas, D., Whalen, J., Stevens, K. A., et al. (2016). The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols. *The Plant Journal*, 87(5), 507–532.
- Matthes, M. S., Best, N. B., Robil, J. M., Malcomber, S., Gallavotti, A., & McSteen, P. (2019). Auxin EvoDevo: Conservation and diversification of genes regulating auxin biosynthesis, transport, and signaling. *Molecular Plant*, 12(2), 298–320.
- Mazars, C., Bourque, S., Mithofer, A., Pugin, A., & Ranjeva, R. (2009). Calcium homeostasis in plant cell nuclei. *New Phytologist*, 181(2), 261–274.
- Mazars, C., Thuleau, P., Lamotte, O., & Bourque, S. (2010). Crosstalk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Molecular Plant*, 3(4), 706–718.
- McCormack, E., & Braam, J. (2003). Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis. *New Phytologist*, 159(3), 585–598.
- McCormack, E., Tsai, Y.-C., & Braam, J. (2005). Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs. *Trends in Plant Science*, 10(8), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.07.001>.
- McGranahan, G. H., & Catlin, P. B. (1987). Juglans rootstocks. In R. C. Rom & R. F. Carlson (Eds.), *Rootstocks for fruit crops* (pp. 411–450). John Wiley and Sons.

- McGranahan, G. H., Driver, J. A., & Tulecke, W. (1987). Tissue culture of *Juglans*. In J. M. Bonga & D. J. Durzan (Eds.), *Cell and tissue culture in forestry* (Vols. 24–26, pp. 261–271). Springer.
- McGranahan, G. H., Leslie, C. A., & Driver, J. A. (1988). In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. *HortScience*, 23(1), 220.
- McGranahan, G., & Leslie, C. (2009). Breeding walnuts (*Juglans regia*). In *Breeding plantation tree crops: Temperate species* (pp. 249–273). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-71203-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-0-387-71203-1_8).
- Mehdi-Tounsi, H., Chelli-Chaabouni, A., Mahjoub-Boujnah, D., & Boukhris, M. (2017). Long-term field response of pistachio to irrigation water salinity. *Agricultural Water Management*, 185, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.02.003>
- Miralles, F., & Visa, N. (2006). Actin in transcription and transcription regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(3), 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.04.009>.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(10), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9).
- Miyaji, N., & Fujimoto, R. (2018). Hybrid vigor: Importance of epigenetic processes and consequences for breeding. *Advances in Botanical Research*, 88, 1–28. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2018.10.001>.
- Mohanta, T. K., Kumar, P., & Bae, H. (2017). Genomics and evolutionary aspect of calcium signaling event in calmodulin and calmodulin-like proteins in plants. *BMC Plant Biology*, 17, 38. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0989-3>.
- Mohanta, T. K., Yadav, D., Khan, A. L., Hashem, A., Abd\_Allah, E. F., & Al-Harrasi, A. (2019). Molecular players of EF-hand containing calcium signaling event in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1476. <https://doi.org/10.3390/ijms20061476>.
- Moldenke, H. N., & Moldenke, A. L. (1952). *Plants of the Bible*. Chronica Botanica Co.
- Moncousin, C. (1991). Rooting of in vitro cuttings. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *High-tech and micropropagation I. Biotechnology in agriculture and forestry* (Vol. 17, pp. 231–261). Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8_14).
- Moncrief, N. D., Kretsinger, R. H., & Goodman, M. (1990). Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 30(6), 522–562.
- Montenegro, J. D. (2022). Gene co-expression network analysis. In D. Edwards (Ed.), *Plant bioinformatics* (Vol. 2443, pp. 387–404). Humana. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2067-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2067-0_19).
- Monteuuis, O. (2000). Propagating teak by cuttings and microcuttings. In *Proceedings of the international seminar on site, technology and productivity of teak plantations* (FORSPA Publication N°24/2000, Teaknet Publication N°3, pp. 209–222).

- Monteuuis, O. (2017). Vegetatively propagating forest trees. *Proceedings of the 4th Conference of the IUFRO Working Unit 2.09.02*, La Plata, Argentina.
- Morales-Orellana, R. J., Winkelmann, T., Bettin, A., & Rath, T. (2022). Stimulation of adventitious root formation by laser wounding in rose cuttings: A matter of energy and pattern. *Frontiers in Plant Science*, 13, Article 1009085. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009085>
- Mu, X. Y., Tong, L., Sun, M., Zhu, Y. X., Wen, J., Lin, Q. W., & Liu, B. (2020). Phylogeny and divergence time estimation of the walnut family (*Juglandaceae*) based on nuclear RAD-Seq and chloroplast genome data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 147, 106802. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106802>
- Mu, X.-Y., Sun, M., Yang, P.-F., & Lin, Q.-W. (2017). Unveiling the identity of Wenwan walnuts and phylogenetic relationships of Asian *Juglans* species using restriction site-associated DNA-sequencing. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1708. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01708>.
- Mudge, K., Janick, J., Scofield, S., & Goldschmidt, E. E. (2009). *A history of grafting*. John Wiley & Sons.
- Mullen, R. T., & Gifford, D. J. (1993). Purification and characterization of catalase from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) megagametophytes. *Plant Physiology*, 103(2), 477–483. <https://doi.org/10.1104/pp.103.2.477>.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Muto, S., & Hirosawa, T. (1987). Inhibition of adventitious root growth in *Tradescantia* by calmodulin antagonists and calcium inhibitors. *Plant Cell Physiology*, 28(8), 1569–1574.
- Nadeem, F., Hanif, M. A., Majeed, M. I., & Mushtaq, Z. (2018). Role of macronutrients and micronutrients in the growth and development of plants and prevention of deleterious plant diseases – A comprehensive review. *Journal of Plant Nutrition*, 41(19), 2464–2480.
- Naija, S., Elloumi, N., Jbir, N., Ammar, S., & Kevers, C. (2008). Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. *Comptes Rendus Biologies*, 331(7), 518–525.
- Nath, M., Bhatt, D., Prasad, R., Gill, S. S., Anjum, N. A., & Tuteja, N. (2016). Reactive oxygen species generation-scavenging and signaling during plant-Arbuscular Mycorrhizal and *Piriformospora indica* interaction under stress condition. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1574. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01574>
- Nathan, C., & Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: An immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 349–361.



- National Human Genome Research Institute. (2024). *Histone*. Genome.gov. Retrieved February 26, 2024, from <https://www.genome.gov/genetics-glossary/histone>.
- Native Plant Trust. (2024). *Juglans cinerea* (butternut). Go Botany. Recuperado em <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/juglans/cinerea/>
- Navatel, J. C., & Bourrain, L. (2001). Plant production of walnut *Juglans regia* L. by in vitro multiplication. *Acta Horticulturae*, 544, 465–471.
- Naz, M., Afzal, M. R., Raza, M. A., Pandey, S., Qi, S., Dai, Z., & Du, D. (2024). Calcium (Ca<sup>2+</sup>) signaling in plants: A plant stress perspective. *South African Journal of Botany*, 169, 464–485. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.04.047>.
- Nelson, M. R., & Chazin, W. J. (1998a). Calmodulin as a calcium sensor. In L. J. Van Eldik & M. D. Watterson (Eds.), *Calmodulin and signal transduction* (pp. 17–64). Academic Press.
- Nelson, M. R., & Chazin, W. J. (1998b). Structures of EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding proteins: Diversity in the organization, packing, and response to Ca<sup>2+</sup> binding. *BioMetals*, 11(4), 297–318.
- News-Medical. (2024, fevereiro 26). *What is Kinesin?* Recuperado de <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Kinesin.aspx>
- Ning, D.-L., Wu, T., Xiao, L.-J., Ma, T., Fang, W.-L., Dong, R.-Q., & Cao, F.-L. (2020). Chromosomal-level assembly of *Juglans sigillata* genome using Nanopore, BioNano, and Hi-C analysis. *GigaScience*, 9(1), 1–9.
- Niu, L., & Liao, W. (2016). Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: Crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in Plant Science*, 7, 230.
- Niu, L., Yu, J., Liao, W., Xie, J., Yu, J., Lv, J., Xiao, X., Hu, L., & Wu, Y. (2019). Proteomic investigation of S-nitrosylated proteins during NO-induced adventitious rooting of cucumber. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5363. <https://doi.org/10.3390/ijms20215363>.
- Noceda, C., Peixe, A., & Arnholdt-Schmitt, B. (2022). Selection of reference genes for transcription studies considering co-regulation and average transcriptional stability: Case study on adventitious root induction in olive (*Olea europaea* L.) microshoots. *Agronomy*, 12, 3201. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123201>.
- Oh, S.-A., Kwak, J. M., Kwun, I. C., & Nam, H. G. (1996). Rapid and transient induction of calmodulin-encoding gene(s) of *Brassica napus* by a touch stimulus. *Plant Cell Reports*, 15(7), 586–590.
- Oinam, G., Yeung, E., Kurepin, L., Haslam, T., & Lopez-Villalobos, A. (2011). Adventitious root formation in ornamental plants: I. General overview and recent successes. *Propagation of Ornamental Plants*, 11, 78–90.
- Okamoto, H., Tanaka, Y., & Sakai, S. (1995). Molecular cloning and analysis of the cDNA for an auxin-regulated calmodulin gene. *Plant Cell Physiology*, 36(12), 1531–1539.



- Oliveira, J. M. S., Bisognin, D. A., Muniz, M. F. B., Gazzana, D., & Santos, M. M. (2024). *Histological study of adventitious rooting in Acacia mearnsii and Ilex paraguariensis mini-cuttings: Insights into the so-called anatomical barrier*. *Rodriguésia*, 75, e01402023. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202475034>.
- Osterc, G., & Štampar, F. (2011). Differences in endo/exogenous auxin profile in cuttings of different physiological ages. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2088–2092.
- Pacurar, D. I., Perrone, I., & Bellini, C. (2014). Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia Plantarum*.
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., & Lamattina, L. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology*, 132(3), 1241–1248.
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., Lombardo, M. C., & Lamattina, L. (2004). Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiology*, 135(1), 279–286.
- Palma, J. M., Gupta, D. K., & Corpas, F. J. (2013). Metalloenzymes involved in the metabolism of reactive oxygen species and heavy metal stress. In D. K. Gupta, F. J. Corpas, & J. M. Palma (Eds.), *Heavy metal stress in plants* (pp. 1–17). Springer.
- Palomares, J. I. S. (2008). *Frutos secos en Cantabria: La nuez y la avellana. Investigación y experimentación*. CIFA.
- Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., & Jansen, M. A. K. (2005). Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular levels. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1991–2001. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri196>.
- Pauly, N., Knight, M. R., Thuleau, P., Graziana, A., Muto, S., Ranjeva, R., & Mazars, C. (2001). The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium*, 30(5), 413–421. <https://doi.org/10.1054/ceca.2001.0250>.
- Payghamzadeh, K., & Kazemitabar, S. K. (2011). In vitro propagation of walnut: A review. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 290–311.
- Peer, W. A., Blakeslee, J. J., Yang, H., & Murphy, A. S. (2011). Seven things we think we know about auxin transport. *Molecular Plant*, 4(4), 487–504. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr034>.
- Pei, D., & Gu, R. S. (2002). Shoot rooting in vitro for walnut cultivars. *Scientia Silvae Sinicae*, 38, 32–37.
- Pei, D., Yuan, L., Wang, Q., & Gu, R. (2007). Factors affecting rooting of in vitro shoots of walnut cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(2), 223–226. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512223>

- Peixe, A., Alpendre, P., Barroso, J., Carlos, R., & Soto, M. G. (2015). New strategies for in vitro rooting and plantlet acclimatization of the 'Paradox' (*Juglans regia* × *Juglans hindsii*) rootstock. *Acta Horticulturae*, 1083, 287-294.
- Pelicano, S. (2022). Frutos secos estão mais fortes que nunca no país. *Vida Rural*, 18-21.
- Percipalle, P., & Visa, N. (2006). Molecular functions of nuclear actin in transcription. *Journal of Cell Biology*, 172(7), 967-971. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512083>.
- Persechini, A., Moncrief, N. D., & Kretsinger, R. H. (1989). *Trends in Neurosciences*, 12(9), 462-467.
- Petrášek, J., & Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136(15), 2675-2688. <https://doi.org/10.1242/dev.030353>.
- Pinney, K., Labavitch, J., & Polito, V. (1998). In D. E. Ramos (Ed.), *Walnut production manual* (pp. 139-146). University of California, Division of Agriculture and Natural Resources.
- Podwyszynska, M. (2003). *Rooting of Micropropagated Shoots*. Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland. Em *Cell, Tissue and Organ Culture* (pp. 66). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00127-0>.
- Pollard, T. D. (2008). Nine unanswered questions about cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 216(10), 3007-3016. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612068>.
- Porfirio, S., Calado, M. L., Noceda, C., Cabrita, M. J., Silva, M. G., Azadi, P., & Peixe, A. (2016a). Tracking biochemical changes during adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 204, 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.029>
- Porfirio, S., Gomes da Silva, M. D. R., Cabrita, M. J., Azadi, P., & Peixe, A. (2016b). Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*, 198, 207-226.
- Porfirio, S., Gomes da Silva, M. D. R., Peixe, A., Cabrita, M. J., & Azadi, P. (2016c). Current analytical methods for plant auxin quantification: A review. *Analytica Chimica Acta*, 902, 8-21.
- Porter, W. L., & Thimann, K. V. (1965). Molecular requirements for auxin action. I. Halogenated indoles and indoleacetic acid. *Phytochemistry*, 4, 229-243.
- Price, A. H., Taylor, A., Ripley, S. J., Griffiths, A., Trewavas, A. J., & Knight, M. R. (1994). Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell*, 6(9), 1301-1310.
- Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W., & Li, H. Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(1), 2-18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x>.
- Quiala, E., Cañal, M. J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Villedor, L., de Feria, M., & Barbón, R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of

- teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109, 223–234.
- Rabier, C.-E., Ta, T., & Ané, C. (2013). Detecting and locating whole genome duplications on a phylogeny: A probabilistic approach. *Molecular Biology and Evolution*, 31(3), 750–762.
- Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: Backgrounds and uses in plant production. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 845–872. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>
- Ragonezi, C., Klimaszewska, K., Castro, M. R., Lima, M., de Oliveira, P., & Zavattieri, M. A. J. T. (2010). Adventitious rooting of conifers: Influence of physical and chemical factors. *Trees*, 24(6), 975–992.
- Ramírez-Carvajal, G. A., Morse, A. M., Dervinis, C., & Davis, J. M. (2009). The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in *Populus*. *Plant Physiology*, 150(2), 759–771.
- Ramírez-Gil, J. G., Ramelli, E. G., & Osorio, J. G. M. (2017). Economic impact of the avocado (cv. Hass) wilt disease complex in Antioquia, Colombia, crops under different technological management levels. *Crop Protection*, 101, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.023>
- Ramos, A., & Valério, F. (2017). A importância dos hábitos de frutificação da noqueira na implantação do pomar. *Agroforum: Revista Da Escola Superior Agrária de Castelo Branco*, 7–16.
- Ranty, B., Aldon, D., Cotellet, V., Galaud, J.-P., Thuleau, P., & Mazars, C. (2016). Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 327. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00327>
- Rashotte, A. M., Poupart, J., Waddell, C. S., & Muday, G. K. (2003). Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(2), 761–772. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022582>.
- Rasmussen, A., Hosseini, S. A., Hajirezaei, M.-R., Druege, U., & Geelen, D. (2015). Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 66(5), 1437–1452.
- Rasmussen, A., Mason, M. G., De Cuyper, C., Brewer, P. B., Herold, S., Agusti, J., Geelen, D., Greb, T., Goormachtig, S., Beeckman, T., & et al. (2012). Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and pea. *Plant Physiology*, 158(4), 1976–1987.
- Rauf, A., Khalil, A. A., Awadallah, S., Khan, S. A., Abu-Izneid, T., Kamran, M., Hemeg, H. A., Mubarak, M. S., Khalid, A., & Wilairatana, P. (2023). Reactive oxygen species in biological systems: Pathways, associated diseases, and potential inhibitors—A review. *Food Science & Nutrition*, 12, 675–693.

- Reddy, A. S., Ali, G. S., & Celesnik, H. (2011). Coping with stresses: Roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell*, 23(6), 2010–2032.
- Reil, W. O., Leslie, C. A., Forde, H. I., & McKenna, J. R. (1998). Propagation. In D. E. Ramos (Ed.), *Walnut production manual* (Publication 3373). University of California, Division of Agricultural and Natural Resources.
- Relf, D., & Ball, E. (2009). *Propagation by cuttings, layering, and division*. Virginia Cooperative Extension, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Revilla, M. A., Majada, J., & Rodriguez, R. (1989). Walnut (*Juglans regia* L.) micropropagation. *Annals of Forest Science*, 46, 149–151.
- Ribeiro, H., Ribeiro, A., Pires, R., Cruz, J., Cardoso, H., Barroso, J. M., & Peixe, A. (2022). Ex vitro rooting and simultaneous micrografting of the walnut hybrid rootstock ‘Paradox’ (*Juglans hindsii* × *Juglans regia*) cl. ‘Vlach’. *Agronomy*, 12, 595. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030595>.
- Ríos Leal, D., Sánchez-Olate, M., Avilés, F., Materan, M. E., Uribe, M., Hasbún, R., & Rodríguez, R. (2007). Micropropagation of *Juglans regia* L. In S. M. Jain & H. Häggman (Eds.), *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits* (pp. 381–390). Springer.
- Roberts, D. M., Lukas, T. J., & Watterson, D. M. (1986). Structure, function and mechanism of action of calmodulin. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, 4, 311–339.
- Rose, G. D., Geselowitz, A. R., Lesser, G. J., Lee, R. H., & Zehfus, M. H. (1985). Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science*, 229(4716), 834–838.
- Roussos, P. A. (2023). Adventitious root formation in plants: The implication of hydrogen peroxide and nitric oxide. *Antioxidants*, 12, 862. <https://doi.org/10.3390/antiox12040862>
- Rugini, E., Di Francesco, G., Muganu, M., Astolfi, S., & Caricato, G. (1997). The effects of polyamines and hydrogen peroxide on root formation in olive and the role of polyamines as an early marker for rooting ability. In A. Altman & Y. Waisel (Eds.), *Biology of root formation and development* (Vol. 65, pp. 65–73). Springer.
- Růžička, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská, R., Beeckman, T., Friml, J., & Benková, E. (2007). Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell*, 19(6), 2197–2212.
- Saadat, Y. A., & Hennerty, M. J. (2001). The effects of different in vitro and ex vitro treatments on the rooting performance of Persian walnut (*Juglans regia* L.) microshoots. In E. Germain & D. Calvi (Eds.), *Proceedings of the IV International Walnut Symposium* (Acta Horticulturae, 544, pp. 473–480).
- Sandalio, L. M., & Romero-Puertas, M. C. (2015). Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Annals of Botany*, 116(4), 475–485. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv074>.

- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*, 14(Suppl 1), S401–S417.
- Santner, A., & Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 459, 1071–1078.
- Santos Macedo, E., Cardoso, H. G., Hernández, A., Peixe, A. A., Polidoros, A., Ferreira, A., Cordeiro, A., & Arnholdt-Schmitt, B. (2009). Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. *Physiologia Plantarum*, 137(4), 532–552.
- Santos Macedo, E., Sircar, D., Cardoso, H. G., Peixe, A., & Arnholdt-Schmitt, B. (2012). Involvement of alternative oxidase (AOX) in adventitious rooting of *Olea europaea* L. microshoots is linked to adaptive phenylpropanoid and lignin metabolism. *Plant Cell Reports*, 31(9), 1581–1590. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1272-6>.
- Scandalios, J. G., Guan, L. M., & Polidoros, A. (1997). In J. G. Scandalios (Ed.), *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses* (pp. 343–406). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schilmiller, A. L., & Howe, G. A. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 369–377.
- Schippers, J. H., Foyer, C. H., & van Dongen, J. T. (2016). Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance, and flowering. *Current Opinion in Plant Biology*, 29, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.11.009>.
- Schlicht, M., Ludwig-Müller, J., Burbach, C., Volkmann, D., & Baluška, F. (2013). Indole-3-butyric acid induces lateral root formation via peroxisome-derived indole-3-acetic acid and nitric oxide. *New Phytologist*, 200(2), 473–482. <https://doi.org/10.1111/nph.12377>
- Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., & Waner, D. (2001). Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 627–658.
- Schuetz, M., Benske, A., Smith, R. A., Watanabe, Y., Tobimatsu, Y., Ralph, J., Demura, T., Ellis, B., & Samuels, A. L. (2014). Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. *Plant Physiology*, 166(2), 798–807.
- Sebastiani, L., & Tognetti, R. (2004). Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in *Olea europaea* L. (cvs ‘Frantoio’ and ‘Gentile di Larino’) cuttings. *Scientia Horticulturae*, 100(1–4), 75–82.
- She, X. P., Huang, A. X., & Ren, Y. (2010). Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase involved in adventitious root formation in mung bean hypocotyl cuttings. *Australian Journal of Botany*, 58(8), 656–662.

- Shi, J., & Du, X. (2020). Identification, characterization and expression analysis of calmodulin and calmodulin-like proteins in *Solanum pennellii*. *Scientific Reports*, 10, 7474. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64178-y>.
- Shiu, S. H., & Bleecker, A. B. (2003). Expansion of the receptor-like kinase/pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132(1), 530–543.
- Simon, S., & Petrášek, J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180(3), 454–460.
- Singh, P., & Kumar, S. (2019). Microbial enzyme in food biotechnology. Em *Enzymes in Food Biotechnology* (Cap. 2, pp. 19–28). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00002-5>.
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118–131.
- Snedden, W. A., & Fromm, H. (2001). Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist*, 151(1), 35–66. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00154.x>.
- Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C., & Suza, W. (2005). Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell*, 17(2), 616–627.
- Steffens, B., & Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, 170(2), 603–617.
- Steffens, J. C., Harel, E., & Hunt, M. D. (1994). Polyphenol oxidase. In B. E. Ellis (Ed.), *Genetic engineering of plant secondary metabolism* (pp. 275–312). Plenum Press.
- Stepanova, A. N., Hoyt, J. M., Hamilton, A. A., & Alonso, J. M. (2005). A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene insensitive mutants in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(8), 2230–2242. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033365>.
- Stevens, K. A., Woeste, K., Chakraborty, S., Crepeau, M. W., Leslie, C. A., Martínez-García, P. J., et al. (2018). Genomic variation among and within six *Juglans* species. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8, 2153–2165.
- Stonehouse, W. (2011). The effects of walnuts (*Juglans regia*) on the characteristics of the metabolic syndrome. In *Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention* (pp. 1141–1148).
- Strader, L. C., Culler, A. H., Cohen, J. D., & Bartel, B. (2010). Conversion of endogenous indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid drives cell expansion in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 153(4), 1577–1586.
- Strader, L. C., Wheeler, D. L., Christensen, S. E., Berens, J. C., Cohen, J. D., Rampey, R. A., & Bartel, B. (2011). Multiple facets of *Arabidopsis* seedling development require indole-3-butyric acid-derived auxin. *The Plant Cell*, 23(3), 984–999.



- Sukumar, P., Legué, V., Vayssières, A., Martin, F., Tuskan, G. A., & Kalluri, U. C. (2013). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. *Plant, Cell & Environment*, 36(5), 909–919. <https://doi.org/10.1111/pce.12036>.
- Supriya N. (2024). *Micropropagation Technique*. Biology Reader. Disponível em <https://biologyreader.com/micropropagation-technique.html>.
- Adams, S., Lordan, J., Fazio, G., Bugbee, B., Francescato, P., Robinson, T. L., & Black, B. (2018). Effect of scion and graft type on transpiration, hydraulic resistance and xylem hormone profile of apples grafted on Geneva fi 41 and M.9-NICTM29 rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 227, 213–222.
- Swarup, K., Benkova, E., Swarup, R., Casimiro, I., Peret, B., Yang, Y., ... & Bennett, M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, 10(8), 946–954. <https://doi.org/10.1038/ncb1754>.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.
- Szymanski, D. B., Liao, B., & Zielinski, R. E. (1996). Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the Arabidopsis CaM-3 gene promoter. *The Plant Cell*, 8(7), 1266–1273.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* (5th ed.). Sinauer Associates.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & et al. (2017). *Fisiologia vegetal*. Artmed.
- Takác, T., Obert, B., Rolčík, J., & Samaj, J. S. (2016). Improvement of adventitious root formation in flax using hydrogen peroxide. *Nature Biotechnology*, 33, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.02.008>.
- Takemoto-Kimura, S., Suzuki, K., Horigane, S. I., Kamijo, S., Inoue, M., Sakamoto, M., Fujii, H., & Bito, H. (2017). Calmodulin kinases: Essential regulators in health and disease. *Journal of Neurochemistry*, 141(6), 808–818. <https://doi.org/10.1111/jnc.14020>.
- Takezawa, D., Liu, Z. H., An, G., & Poovaiah, B. W. (1995). Calmodulin gene family in potato: Developmental and touch-induced expression of the mRNA encoding a novel isoform. *Plant Molecular Biology*, 27, 693–703.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

- Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I. A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., & Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, 446(7136), 640–645. <https://doi.org/10.1038/nature05731>.
- Tehraniifar, A., Tabar, S. M., Selahvarzi, Y., Balandary, A., & Kharrazi, M. (2014). Biochemical changes in barberries during adventitious root formation: The role of indole-3-butyric acid and hydrogen peroxide. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(3), 477–485.
- Teng, X. L., Chen, N., & Xiao, X. G. (2016). Identification of a catalase-phenol oxidase in betalain biosynthesis in red amaranth (*Amaranthus cruentus*). *Frontiers in Plant Science*, 6, 1228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01228>.
- Terranova, R., Pereira, C. F., Du Roure, C., Merckenschlager, M., & Fisher, A. G. (2006). Acquisition and extinction of gene expression programs are separable events in heterokaryon reprogramming. *Journal of Cell Science*, 119, 2065–2072.
- The Arabidopsis Information Resource. (2024). *Arabidopsis* (TAIR).
- Thermo Fisher Scientific. (2009). *NanoDrop Spectrophotometers: 260/280 and 260/230 ratios* (Rev. 3/09) [Technical Bulletin T042]. Wilmington, DE: Thermo Fisher Scientific.
- Thermo Fisher Scientific. (2024). *Agarose gel electrophoresis of RNA*. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/rna-protocol/agarose-gel-electrophoresis-of-rna.html>.
- Thirupathaiah, G., Devi, A., & Tanuja, P. (2024). *Propagation*. In *Recent Advances in Sapota Production and Post-Harvest Management* (Capítulo 11).
- Torkaman, J., Vaziri, M., Sandberg, D., & Mohammadi Limaiei, S. (2018). Relationship between branch-scar parameters and knot features of oriental beech (*Fagus orientalis* Libsky). *Wood Material Science & Engineering*, 13(2), 117–120.
- Totally Wild UK. (2022, February 14). *Walnut (Juglans regia) Identification*. Retrieved from <https://totallywilduk.co.uk/2022/02/14/walnut-juglans-regia-identification/>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354.
- Tsutsui, H., Yanagisawa, N., Kawakatsu, Y., Ikematsu, S., Sawai, Y., Tabata, R., Arata, H., Higashiyama, T., & Notaguchi, M. (2024). *Micrografting device for testing systemic signaling in Arabidopsis*. *The Plant Journal*.
- Tu, B. P., & Weissman, J. S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. *Journal of Cell Biology*, 164(3), 341–346. <https://doi.org/10.1083/jcb.200311055>.
- Tuan, P. N., Meier-Dinkel, A., Höltnen, A. M., Wenzlitschke, I., & Winkelmann, T. (2017). Factors affecting shoot multiplication and rooting of walnut (*Juglans regia* L.) in vitro. In M. Beruto & E. A. Ozudogru (Eds.), *Acta Horticulturae* (Vol. 1155, pp. 77-82).



- Tuteja, N., & Mahajan, S. (2007). Calcium signaling network in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 2(2), 79–85. <https://doi.org/10.4161/psb.2.2.4176>.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., & et al. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455, 195–200.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), W71–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>.
- Uzunova, V. V., Quareshy, M., Del Genio, C. I., & Napier, R. M. (2016). Tomographic docking suggests the mechanism of auxin receptor TIR1 selectivity. *Open Biology*, 6(12), 160139. <https://doi.org/10.1098/rsob.160139>.
- Vahdati, K. (2003). *Nursery management and grafting of walnut* (p. 113). Tehran, Iran: Khaniran Publisher.
- Vahdati, K., Leslie, C., Zamani, Z., & McGranahan, G. (2004). Rooting and acclimatization of in vitro-grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars. *HORTSCIENCE*, 39(2), 324–327.
- Vahdati, K., Najafian Ashrafi, E., Ebrahimzadeh, H., & Mirmasoumi, M. (2009). Improved micropropagation of walnut (*Juglans regia* L.) on media optimized for growth based upon mineral content of walnut seed. *Acta Horticulturae*, 839, 117–124. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.13>.
- Vahdati, K., Rezaee, R., Grigorian, V., Valizadeh, M., & Motallebi Azar, A. (2008). Rooting ability of Persian walnut as affected by seedling vigour in response to stool layering. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 83(3), 334–338. <https://doi.org/10.1080/14620316.2008.11512388>.
- Vahdati, K., Sadeghi-Majd, R., Sestras, A. F., Licea-Moreno, R. J., Peixe, A., & Sestras, R. E. (2022). Clonal propagation of walnuts (*Juglans* spp.): A review on evolution from traditional techniques to application of biotechnology. *Plants*, 11(23), 3040. <https://doi.org/10.3390/plants11223040>
- Vahdati, K., Sarikhani, S., Arab, M. M., Leslie, C. A., Dandekar, A. M., Aletà, N., Bielsa, B., Gradziel, T. M., Montesinos, Á., Rubio-Cabetas, M. J., Sideli, G. M., Serdar, Ü., Akyüz, B., Beccaro, G. L., Donno, D., Rovira, M., Ferguson, L., Akbari, M., Sheikhi, A., ... & Mehlenbacher, S. A. (2021). Advances in rootstock breeding of nut trees: Objectives and strategies. *Plants*, 10(11), 2234. <https://doi.org/10.3390/plants10112234>.
- Van Breusegem, F., & Dat, J. F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141(2), 384–390. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078295>.
- Van Den Berk Nurseries. (2024). *Juglans regia* (English walnut). Van Den Berk Nurseries. <https://www.vdberk.com/trees/juglans-regia/>.

- Vandelle, E., Vannozzi, A., Wong, D., Danzi, D., Digby, A.-M., Dal Santo, S., & Astegno, A. (2018). Identification, characterization, and expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes in grapevine (*Vitis vinifera*) reveal likely roles in stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.003>.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), 1–12.
- Vantard, M., Lambert, A.-M., De Mey, J., Picquot, P., & Van Eldik, L. J. (1985). Characterization and immunocytological distribution of calmodulin in higher plant endosperm cells: Localization in the mitotic apparatus. *Journal of Cell Biology*, 101(2), 488–499. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.2.488>.
- Verstraeten, I., Schotte, S., & Geelen, D. (2014). Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 495. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00495>.
- Vidal, N., Arellano, G., San-José, M. C., Vieitez, A., & Ballester, A. (2003). Developmental stages during the rooting of in-vitro-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. *Tree Physiology*, 23(18), 1247–1254. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.18.1247>.
- Vidoz, M. L., Loreti, E., Mensuali, A., Alpi, A., & Perata, P. (2010). Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *The Plant Journal*, 63, 551–562.
- Vielba, J. M., Vidal, N., San José, M. C., Rico, S., & Sánchez, C. (2020). Recent advances in adventitious root formation in chestnut. *Plants*, 9(11), 1543. <https://doi.org/10.3390/plants9111543>.
- Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P. B., & Friml, J. (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science*, 12(4), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.03.006>.
- Vijayakumar, S., & Sakuntala, M. (2024). Validation of reference gene stability for normalization of RT-qPCR in *Phytophthora capsici* Leonian during its interaction with *Piper nigrum* L. *Scientific Reports*, 14, 7331.
- Virdi, A. S., Singh, S., & Singh, P. (2015). Abiotic stress responses in plants: Roles of calmodulin-regulated proteins. *Frontiers in Plant Science*, 6, 809. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00809>.
- Vu, D., Vo, P., Coggeshall, M., & Lin, C. H. (2018). Identification and characterization of phenolic compounds in black walnut kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(17), 4503–4511.

- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>.
- Wang, B., Bian, B., Wang, C., Li, C., Fang, H., Zhang, J., Huang, D., Huo, J., & Liao, W. (2019). Hydrogen gas promotes adventitious rooting in cucumber under cadmium stress. *PLoS ONE*, 14(4), e0212639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212639>.
- Wang, N., Zhong, X., Song, X., Gu, X., Lai, W., Xie, Y., Peng, X., & Yang, G. (2017). Molecular and biochemical characterization of calmodulin from *Echinococcus granulosus*. *Parasites & Vectors*, 10, 597. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2545-2>.
- Wang, Y., Loake, G., & Chu, C. (2013). Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, 4, 314. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00314>.
- Warschefsky, E. J., Klein, L. L., Frank, M. H., Chitwood, D. H., Londo, J. P., von Wettberg, E. J. B., & Miller, A. J. (2016). Rootstocks: Diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes. *Trends in Plant Science*, 21(5), 418–437.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth, and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6), 1021–1058.
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I., & Miersch, O. (2006). The wound response in tomato: Role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 297–306.
- Watillon, B., Kettmann, R., Boxus, P., & Burny, A. (1992). Cloning and characterization of an apple (*Malus domestica* (L.) Borkh) calmodulin gene. *Plant Science*, 82, 201–212.
- White, P. J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1–2), 171–189. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00137-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00137-1).
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M., & Van Camp, W. (1995). Catalases in plants. *Molecular Breeding*, 1(3), 207–228.
- Williams, R. L. (1999). Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1441(2–3), 255–267. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00150-X](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00150-X).
- Winkelmann, T. (2013). Recent advances in propagation of woody plants. *Acta Horticulturae*, 990, 375–381. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2013.990.47>.
- Woodward, A. W., & Bartel, B. K. (2005). Title of the article. *Annals of Botany*, 95(5), 707–735.
- Woodworth, R. H. (1930). Meiosis of microsporogenesis in the Juglandaceae. *American Journal of Botany*, 17(9), 863–869. <https://doi.org/10.2307/2435868>.

- Wu, F., Gao, Y., Yang, W., Sui, N., & Zhu, J. (2022). Biological functions of strigolactones and their crosstalk with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 13, 821563. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.821563>.
- Xiang, X. G., Wang, W., Li, R. Q., Lin, L., Liu, Y., Zhou, Z. K., Li, Z. Y., & Chen, Z. D. (2014). Large-scale phylogenetic analyses reveal Fagalean diversification promoted by the interplay of diaspores and environments in the Paleogene. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 16(2), 101–110.
- Xie, H. T., Wan, Z. Y., Li, S., & Zhang, Y. (2014). Spatiotemporal production of reactive oxygen species by NADPH oxidase is critical for tapetal programmed cell death and pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26(5), 2007–2023. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125427>.
- Xiong, T. C., Jauneau, A., Ranjeva, R., & Mazars, C. (2004). Isolated plant nuclei as mechanical and thermal sensors involved in calcium signalling. *The Plant Journal*, 40(1), 12–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02184.x>.
- Yang, T. B., Segal, G., Abbo, S., Feldman, M., & Fromm, H. (1996). Characterization of the calmodulin gene family in wheat: Structure, chromosomal location, and evolutionary aspects. *Molecular and General Genetics*, 252, 684–694.
- Yang, T., & Poovaiah, B. W. (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), 4097–4102. <https://doi.org/10.1073/pnas.052564899>.
- Yang, T., & Poovaiah, B. W. (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*, 8(11), 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.09.004>.
- Yang, Y., Xu, R., Ma, C., Vlot, A. C., Klessig, D. F., & Pichersky, E. (2008). Inactive methyl indole-3-acetic acid ester can be hydrolyzed and activated by several esterases belonging to the AtMES esterase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147(3), 1034–1045.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
- Yegizbayeva, T. K., García-García, S., Yausheva, T. V., Kairova, M., Apushev, A. K., Oleichenko, S. N., & Licea-Moreno, R. J. (2021). Unraveling factors affecting micropropagation of four Persian walnut varieties. *Agronomy*, 11, 1417. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071417>.
- Zarrouk, O., Testillano, P. S., Risueño, M. C., Moreno, A. A., & Gogorcena, Y. (2010). Changes in cell/tissue organization and peroxidase activity as markers for early detection of graft incompatibility in peach/plum combinations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(1), 9–17.

- Zeng, H., Xu, L., Singh, A., Wang, H., Du, L., & Poovaiah, B. W. (2015). Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 6, 600. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00600>.
- Zeng, H., Zhang, Y., Yang, X., & Zhang, H. (2017). Analysis of EF-hand proteins in the soybean genome suggests their potential roles in environmental and nutritional stress signaling. *Frontiers in Plant Science*, 8, 877. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00877>.
- Zeng, J., Dong, Z., Wu, H., Tian, Z., & Zhao, Z. (2017). Redox regulation of plant stem cell fate. *EMBO Journal*, 36(20), 2844–2855. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695955>.
- Zeven, A. C., & Zhukovsky, P. M. (1975). *Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity excluding ornamentals, forest trees, and lower plants*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation.
- Zhang, H., Tang, J., Liu, X. P., Wang, Y., Yu, W., Peng, W. Y., Fang, F., Ma, D. F., Wei, Z. J., & Hu, L. Y. (2009). Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana*, and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(10), 1086–1094.
- Zhang, J. S., Zhou, S. F., Wang, Q., Guo, J. N., Liang, H. M., Deng, J. B., & He, W. Y. (2016a). Gastrodin suppresses BACE1 expression under oxidative stress condition via inhibition of the PKR/eIF2 $\alpha$  pathway in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 325, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.024>.
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016b). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>.
- Zhang, J., Zhang, W., Ji, F., Qiu, J., Song, X., Bu, D., Pan, G., Ma, Q., Chen, J., Huang, R., Chang, Y., & Pei, D. (2020). A high-quality walnut genome assembly reveals extensive gene expression divergences after whole-genome duplication. *Plant Biotechnology Journal*, 18(9), 1845–1848.
- Zhang, Q., Ree, R. H., Salamin, N., Xing, Y., & Silvestro, D. (2021). Fossil-informed models reveal a boreotropical origin and divergent evolutionary trajectories in the walnut family (*Juglandaceae*). *Systematic Biology*. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syab030>.
- Zhang, W., Zhou, R. G., Gao, Y. J., Zheng, S. Z., Xu, P., Zhang, S. Q., & others. (2009). Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(4), 1773–1784. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133744>.
- Zhang, X., Cheng, X., Yu, L., Yang, J., Calvo, R., Patnaik, S., Hu, X., Gao, Q., Yang, M., Lawas, M., Dellling, M., Marugan, J., Ferrer, M., & Xu, H. (2016c). MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nature Communications*, 7(1), 12109. <https://doi.org/10.1038/ncomms12109>.

- Zhang, X., Tian, J., Li, S., Liu, Y., Feng, T., Wang, Y., Li, Y., Huang, X., & Li, D. (2022). Characterization of the Calmodulin/Calmodulin-like Protein (CAM/CML) Family in *Ginkgo biloba*, and the Influence of an Ectopically Expressed *GbCML* Gene (*Gb\_30819*) on Seedling and Fruit Development of Transgenic *Arabidopsis*. *Plants*, 11(1506). <https://doi.org/10.3390/plants11111506>.
- Zhao, Y., Liu, W., Xu, Y.-P., Cao, J.-Y., Braam, J., & Cai, X.-Z. (2013). Genome-wide identification and functional analyses of calmodulin genes in Solanaceous species. *BMC Plant Biology*, 13, 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-70>.
- Zhou, H., Hu, Y., Ebrahimi, A., Liu, P., Woeste, K., Zhao, P., & Zhang, S. (2021). Whole genome-based insights into the phylogeny and evolution of the Juglandaceae. *BMC Ecology and Evolution*, 21, 191.
- Zhou, K., Jerszurki, D., Sadka, A., Shlizerman, L., Rachmilevitch, S., & Ephrath, J. (2018). Effects of photoselective netting on root growth and development of young grafted orange trees under semi-arid climate. *Scientia Horticulturae*, 238, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.054>.
- Zhou, R. G., Li, B., Liu, H. T., & Sun, D. Y. (2009). Progress in the participation of  $\text{Ca}^{2+}$ –calmodulin in heat shock signal transduction. *Progress in Natural Science*, 19(10), 1201–1208. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.12.011>.
- Zhou, S., Jia, L., Chu, H., Wu, D., Peng, X., Liu, X., & et al. (2016). *Arabidopsis CaM1 and CaM4 promote nitric oxide production and salt resistance by inhibiting S-nitrosogluthathione reductase via direct binding*. *PLOS Genetics*, 12(9), e1006255. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006255>.
- Zhou, X., Zheng, W., Li, Y., Pearce, R., Zhang, C., Bell, E. W., Zhang, G., & Zhang, Y. (2022). I-TASSER-MTD: A deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 17, 2326–2353.
- Zielinski, R. E. (1998). Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 697–725.
- Zilkah, S., Zamiri, N., & Ziv, M. (2006). Putrescine and hydrogen peroxide improve the rooting of GF-677 rootstock in woody cuttings and tissue culture shoots. *Acta Horticulturae*, 713, 331–337. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.713.48>.
- Zimmerman, P. W., & Hitchcock, A. E. (1933). Initiation and stimulation of adventitious roots caused by unsaturated hydrocarbon gases. *Contributions from the Boyce Thompson Institute*, 5, 351–369.
- Zimmerman, P. W., & Wilcoxon, F. (1935). Several chemical growth substances which cause initiation of root and other responses in plants. *Contributions from the Boyce Thompson Institute*, 7, 209.

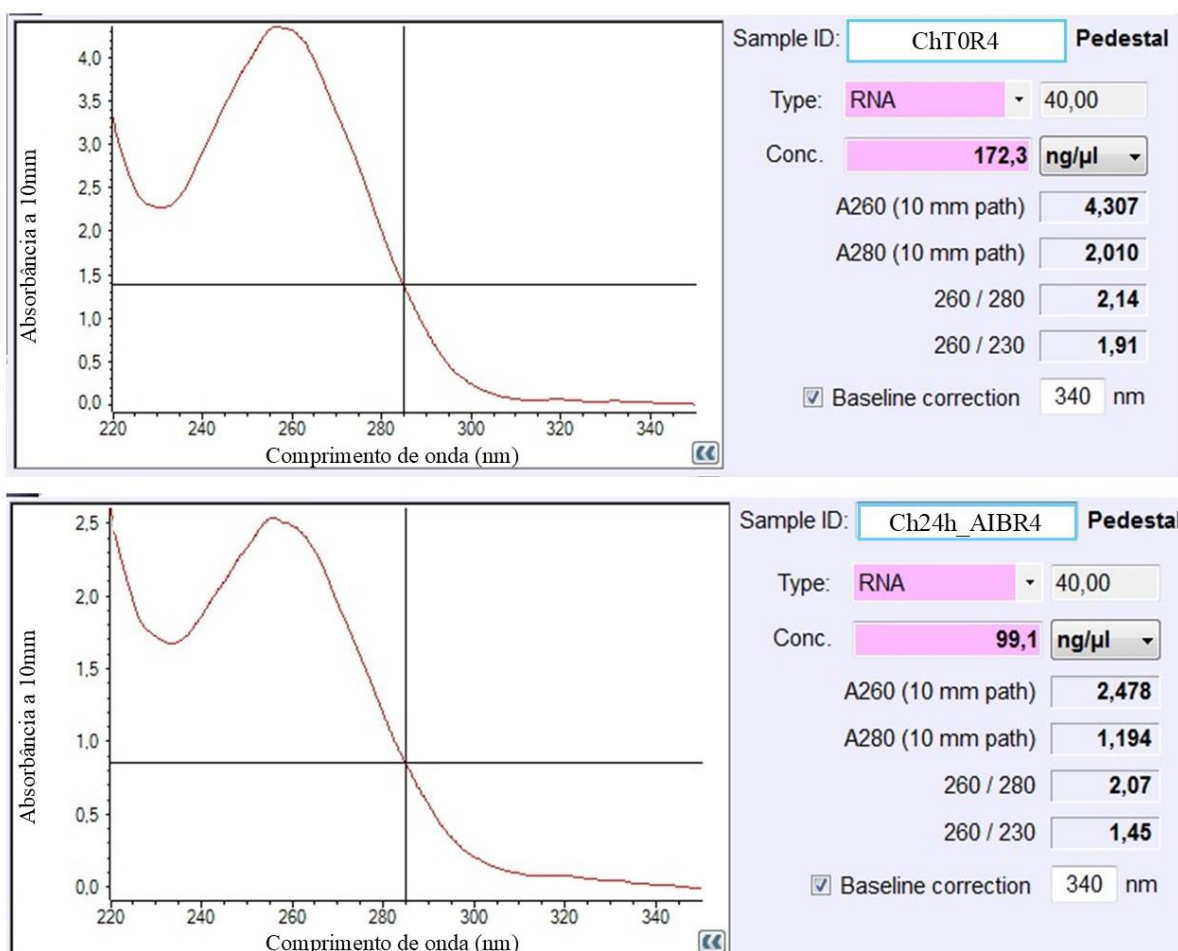
- Zolman, B. K., Martinez, N., Millius, A., Adham, A. R., & Bartel, B. (2008). Identification and characterization of *Arabidopsis* indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes. *Genetics*, 180(1), 237–251. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.090399>.
- Zolman, B. K., Nyberg, M., & Bartel, B. (2007). IBR3, a novel peroxisomal acyl-CoA dehydrogenase-like protein required for indole-3-butyric acid response. *Plant Molecular Biology*, 64(1), 59–72. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9134-2>.
- Zolman, B. K., Yoder, A., & Bartel, B. (2000). Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics*, 156(3), 1323–1337.





## 7. Apêndices





**Figura 1** – Padrões exemplificativos das absorbâncias obtidas nas amostras de RNA total. Imagens obtidas através do software de um espectrofotômetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific).

**Tabela 1** – Valores de concentração das amostras de RNA extraídas nos diferentes tempos de recolha durante o ensaio de enraizamento na cv. ‘Chandler’ (*Juglans regia*).

<b>‘Chandler’ (<i>Juglans regia</i>)</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Concentração</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>µg/µl</b>	<b>Volume para 0,5ng</b>	<b>Volume de H<sub>2</sub>O adicionado</b>
ChT0_R1	80,52	2,128	1,7	0,081	6,2	8,8
ChT0_R2	115,84	2,147	1,6	0,116	4,3	10,7
ChT0_R3	124,04	2,159	1,8	0,124	4,0	11,0
ChT0_R4	171,84	2,165	1,9	0,172	2,9	12,1
Ch6hCT_R1	91,12	2,161	1,7	0,091	5,5	9,5
Ch6hCT_R2	107,68	2,121	1,6	0,108	4,6	10,4
Ch6hCT_R3	80,16	2,148	1,7	0,080	6,2	8,8
Ch6hCT_R4	79,56	2,155	1,7	0,080	6,3	8,7
Ch6hAIB_R1	78,52	2,131	1,5	0,079	6,4	8,6
Ch6hAIB_R2	112,4	2,085	1,7	0,112	4,4	10,6
Ch6hAIB_R3	104,6	2,147	1,6	0,105	4,8	10,2
Ch6hAIB_R4	112,56	2,113	1,4	0,113	4,4	10,6
Ch24hCT_R1	112,84	2,129	1,6	0,113	4,4	10,6
Ch24hCT_R2	117,36	2,084	1,6	0,117	4,3	10,7
Ch24hCT_R3	102,48	2,073	1,6	0,102	4,9	10,1
Ch24hCT_R4	149,24	2,138	1,7	0,149	3,4	11,6
Ch24hAIB_R1	116,92	2,145	1,8	0,117	4,3	10,7
Ch24hAIB_R2	92,76	2,110	1,6	0,093	5,4	9,6
Ch24hAIB_R3	128,44	2,084	1,5	0,128	3,9	11,1
Ch24hAIB_R4	100,8	2,045	1,4	0,101	5,0	10,0
Ch3dCT_R1	81,28	2,126	1,5	0,081	6,2	8,8
Ch3dCT_R2	93,96	2,116	1,6	0,094	5,3	9,7
Ch3dCT_R3	86,52	2,168	1,6	0,087	5,8	9,2
Ch3dCT_R4	112,76	2,112	1,7	0,113	4,4	10,6
Ch3dAIB_R1	91,8	2,113	1,5	0,092	5,4	9,6
Ch3dAIB_R2	93,76	2,121	1,6	0,094	5,3	9,7
Ch3dAIB_R3	103,68	2,176	1,7	0,104	4,8	10,2
Ch3dAIB_R4	182,16	2,171	1,9	0,182	2,7	12,3
Ch5dCT_R1	68,04	2,113	1,5	0,068	7,3	7,7
Ch5dCT_R2	167,16	1,857	1,1	0,167	3,0	12,0
Ch5dCT_R3	81,24	2,107	1,7	0,081	6,2	8,8
Ch5dCT_R4	91,72	2,117	1,5	0,092	5,5	9,5
Ch5dAIB_R1	90,92	2,122	1,7	0,091	5,5	9,5
Ch5dAIB_R2	100,68	2,137	1,6	0,101	5,0	10,0
Ch5dAIB_R3	94,76	2,089	1,6	0,095	5,3	9,7
Ch5dAIB_R4	111,68	2,123	1,8	0,112	4,5	10,5
Ch7dCT_R1	124,84	2,129	1,7	0,125	4,0	11,0
Ch7dCT_R2	129,28	2,114	1,7	0,129	3,9	11,1
Ch7dCT_R3	122,52	2,139	1,6	0,123	4,1	10,9
Ch7dCT_R4	147,52	2,052	1,5	0,148	3,4	11,6
Ch7dAIB_R1	178,32	2,151	1,8	0,178	2,8	12,2
Ch7dAIB_R2	179,2	2,137	1,7	0,179	2,8	12,2
Ch7dAIB_R3	141,92	2,156	1,8	0,142	3,5	11,5
Ch7dAIB_R4	154,44	2,134	1,8	0,154	3,2	11,8

**Tabela 2** – Valores de concentração das amostras de RNA extraídas nos diferentes tempos de recolha durante o ensaio de enraizamento no híbrido 'Paradox' cl. 'Vlach' (*Juglans hindsii* × *Juglans regia*).

<b>'Paradox' cl. 'Vlach' (<i>Juglans hindsii</i> × <i>Juglans regia</i>)</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Concentração</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>µg/µl</b>	<b>Volume para 0,5ng</b>	<b>Volume de H<sub>2</sub>O adicionado</b>
ChT0_R1	151,7	2,160	1,7	0,152	3,3	11,7
ChT0_R2	92,8	2,180	1,6	0,093	5,4	9,6
ChT0_R3	214,2	2,160	1,9	0,214	2,3	12,7
ChT0_R4	163,6	2,110	1,5	0,164	3,1	11,9
Ch6hCT_R1	132,5	2,130	1,8	0,133	3,8	11,2
Ch6hCT_R2	89,8	2,100	1,6	0,090	5,6	9,4
Ch6hCT_R3	136,4	2,100	1,7	0,136	3,7	11,3
Ch6hCT_R4	118,1	2,080	1,5	0,118	4,2	10,8
Ch6hAIB_R1	144,8	2,160	1,9	0,145	3,5	11,5
Ch6hAIB_R2	76,1	2,110	1,6	0,076	6,6	8,4
Ch6hAIB_R3	75,3	2,120	1,7	0,075	6,6	8,4
Ch6hAIB_R4	140,1	2,120	1,7	0,140	3,6	11,4
Ch24hCT_R1	106,5	2,140	1,6	0,107	4,7	10,3
Ch24hCT_R2	117,1	2,160	1,9	0,117	4,3	10,7
Ch24hCT_R3	122,8	2,080	1,5	0,123	4,1	10,9
Ch24hCT_R4	95,5	2,140	1,8	0,096	5,2	9,8
Ch24hAIB_R1	138,7	2,140	1,86	0,139	3,6	11,4
Ch24hAIB_R2	140,6	2,100	1,7	0,141	3,6	11,4
Ch24hAIB_R3	117,2	2,140	1,8	0,117	4,3	10,7
Ch24hAIB_R4	131,1	2,120	1,7	0,131	3,8	11,2
Ch3dCT_R1	135,7	2,180	1,8	0,136	3,7	11,3
Ch3dCT_R2	121,9	2,190	1,9	0,122	4,1	10,9
Ch3dCT_R3	114,5	2,090	1,4	0,115	4,4	10,6
Ch3dCT_R4	131,2	2,170	1,8	0,131	3,8	11,2
Ch3dAIB_R1	131	2,110	1,5	0,131	3,8	11,2
Ch3dAIB_R2	129,7	2,120	1,6	0,130	3,9	11,1
Ch3dAIB_R3	152,7	2,180	1,9	0,153	3,3	11,7
Ch3dAIB_R4	130,5	2,180	1,9	0,131	3,8	11,2
Ch5dCT_R1	105,4	2,130	1,6	0,105	4,7	10,3
Ch5dCT_R2	101,3	2,140	1,6	0,101	4,9	10,1
Ch5dCT_R3	127,3	2,130	1,7	0,127	3,9	11,1
Ch5dCT_R4	145,8	2,130	1,7	0,146	3,4	11,6
Ch5dAIB_R1	164,5	2,150	1,9	0,165	3,0	12,0
Ch5dAIB_R2	208,1	2,100	1,6	0,208	2,4	12,6
Ch5dAIB_R3	204,9	2,140	1,9	0,205	2,4	12,6
Ch5dAIB_R4	177,4	2,100	1,7	0,177	2,8	12,2
Ch7dCT_R1	129,7	2,130	1,8	0,130	3,9	11,1
Ch7dCT_R2	214	2,110	1,7	0,214	2,3	12,7
Ch7dCT_R3	130,7	2,090	1,6	0,131	3,8	11,2
Ch7dCT_R4	200,6	2,120	1,7	0,201	2,5	12,5
Ch7dAIB_R1	195	2,120	1,8	0,195	2,6	12,4
Ch7dAIB_R2	171,3	2,150	1,9	0,171	2,9	12,1
Ch7dAIB_R3	309,4	2,070	1,6	0,309	1,6	13,4
Ch7dAIB_R4						