

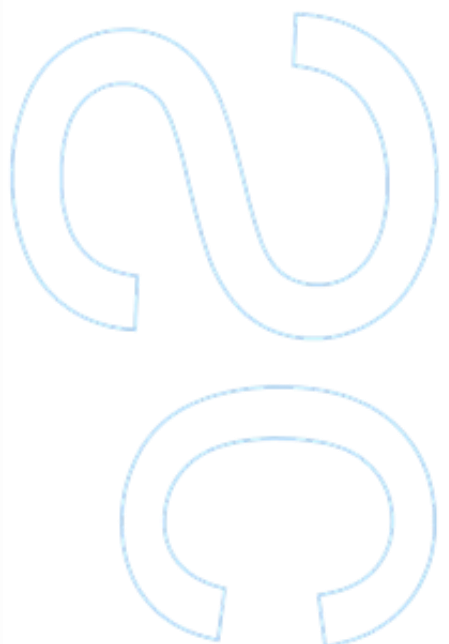


Uso de ferramentas biotecnológicas para a valorização de *Corema album*: Micropropagação

Vanessa Filipa do Rego Temporão Alves
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Biologia Celular e Molecular
2019

Uso de ferramentas biotecnológicas para a
valorização de *Corema album*:
Micropropagação

Vanessa Filipa do Rego Temporão Alves





Uso de ferramentas biotecnológicas para a valorização de *Corema album*: Micropropagação

Vanessa Filipa do Rego Temporão Alves

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia

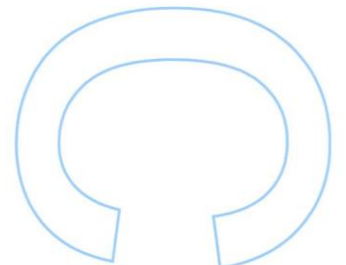
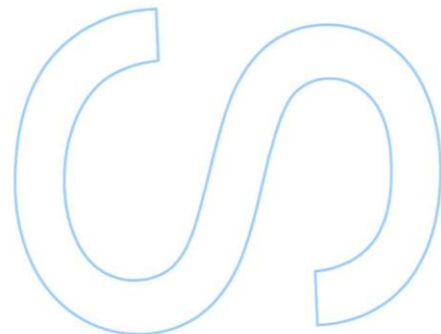
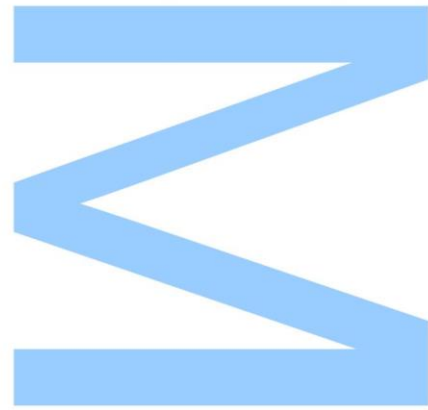
2019

Orientador

José Carlos Dias Duarte Gonçalves, Professor Coordenador, IPCB

Coorientador

Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora Catedrática,
FCUP

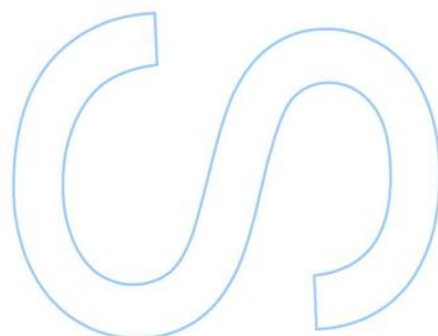
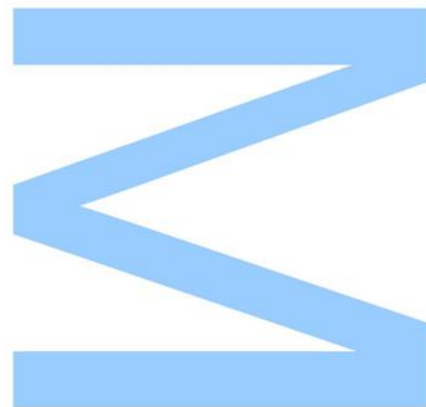




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Agradecimentos

Após a finalização deste trabalho, chegou a altura de agradecer, a quem de alguma forma, contribui para a sua realização.

Gostaria de agradecer a toda a equipa do Centro de Biotecnologia da Plantas da Beira Interior, em particular ao Doutor José Carlos Gonçalves, por ter aceitado ser meu orientador e me ter ajudado no desenvolvimento de todo o trabalho relacionado com a micropropagação.

Agradecer também ao Doutor João Loureiro, à Doutora Celeste Dias e à Doutora Maria Castro por me terem auxiliado no desenvolvimento da técnica de citometria de fluxo.

À professora Conceição Santos o meu muito obrigada por toda a ajuda disponibilizada durante a dissertação.

Um agradecimento especial a toda a equipa do IB₂Lab, em particular o Nuno, que apesar de estar sempre atarefado, se prontificou a ajudar em tudo o que foi preciso.

À Daniela, que me acompanhou durante toda esta etapa, por vezes difícil, e que esteve presente em todos os momentos de dificuldade, mas também em todos os momentos de sucesso.

Aos meus amigos da invicta que à sua maneira contribuíram para esta dissertação, acalmando-me nos momentos de maior aflição e animando-me nos jantares da casa do povo, do Lusiada, nas festas da faculdade e em todos os outros eventos em que marcamos presença.

Aos meus amigos da terrinha, especialmente à Carolina, Sofia, Ariana, Carina, Cristina, Fábio e Miguéis que mesmo à distância estiverem presentes.

Por último, mas não menos importante, a toda a minha família, sobretudo aos meus pais e ao meu avô que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida.

Resumo

Corema album (Ericaceae), comumente conhecida como camarinha, é um arbusto dioico endêmico da Costa Atlântica da Península Ibérica, cuja distribuição se encontra limitada a ambientes costeiros, como dunas de areia e áreas rochosas. Esta espécie tem despertado um interesse crescente relacionado com a utilização dos seus frutos como alimento e devido às suas potencialidades medicinais. No entanto, a regressão do seu *habitat* natural conjuntamente com a dificuldade de regeneração desta espécie, colocam a camarinha em perigo de extinção. Foi objetivo deste trabalho valorizar esta espécie usando a cultura *in vitro* como abordagem biotecnológica. Para a multiplicação da camarinha, o meio WPM suplementado com 2 mg/L 2iP + 1 mg/L Cin apresentou os melhores resultados. A utilização de 2 mg/L AIB, associado à mistura de perlite e vermiculite foi a combinação mais favorável para o enraizamento *ex vitro*. As plantas aclimatizadas apresentaram uma sobrevivência de 100%. Este protocolo de micropropagação mostrou-se robusto, possibilitando a regeneração não convencional da camarinha. Em paralelo, testou-se a eficiência dos biorreatores de imersão temporária na multiplicação de rebentos em larga escala. Apesar dos melhores resultados, os rebentos formados apresentaram mais anomalias comparativamente à metodologia tradicional.

A ocorrência de possíveis variações somaclonais durante o processo de micropropagação foi analisada através da técnica de citometria de fluxo, que descartou a existência de alterações na ploidia e permitiu a validação deste protocolo de micropropagação como eficaz para a produção de plantas *true-to-type* de *Corema album*.

Apesar das inúmeras vantagens associadas à micropropagação, este é um processo indutor de stresse, que conduz à produção excessiva de espécies reativas de oxigénio, que podem causar stresse oxidativo e gerar danos irreversíveis. Através do estudo do seu estado oxidativo, *Corema album* demonstrou um desenvolvimento dos mecanismos antioxidantes que asseguraram a sua sobrevivência durante a fase de aclimatização. Através da comparação com a planta de campo, as plantas aclimatizadas de *Corema album* mostraram um desenvolvimento dos mecanismos antioxidantes diferente, em geral com uma menor atividade enzimática e com uma menor acumulação de compostos fenólicos, embora seja esperado um desenvolvimento semelhante destes mecanismos quando transferidas para campo, como resposta às condições ambientais.

Abstract

Corema album (Ericaceae), commonly known as camarinha, is an endemic dioecious shrub of the Iberian Atlantic Coast, whose distribution is limited to coastal environments such as sand dunes and rocky areas. This species has aroused a growing interest among the population and the scientific community, related to the use of its fruits as food and due to the medicinal potentialities. However, the regression of its natural *habitat* together with the difficulty of natural regeneration put the shrub in danger of extinction. The objective of this work was to valorize camarinha using *in vitro* culture as a biotechnological approach. The most effective condition for multiplication phase was WPM with 2 mg/L 2iP + 1 mg/L. The use of 2 mg/L IBA combined with perlite and vermiculite mixture was the most favorable combination for *ex vitro* rooting. Acclimatized plants had a 100% survival. This micropropagation protocol proved to be robust and allows the unconventional regeneration of *Corema album*. In parallel, the efficiency of the temporary immersion bioreactors in the large-scale shoot multiplication was tested. Despite the best results, the shoots formed presented more anomalies compared to the traditional methodology.

The occurrence of possible somaclonal variations during the micropropagation process was analyzed by flow cytometry, which ruled out ploidy alterations and allowed the validation of this micropropagation protocol as effective to produce *true-to-type* *Corema album* plants.

Despite the numerous advantages associated with micropropagation, this is a stress-inducing process that leads to excessive production of reactive oxygen species that can cause oxidative stress and irreversible damage. By studying its oxidative state, *Corema album* demonstrated a development of antioxidant mechanisms that ensured its survival during the acclimatization phase. By comparison with field plant, *Corema album* acclimatized plants showed a different development of antioxidant mechanisms, generally with lower enzymatic activity and less accumulation of phenolic compounds, although a similar development of these mechanisms is expected when transferred to field as a response to environmental conditions.

Palavras-chave

Camarinha; micropropagação; biorreatores; citometria de fluxo; espécies reativas de oxigénio; mecanismos antioxidantes.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract	III
Palavras-chave	IV
Índice de figuras	VII
Índice de tabelas.....	IX
Lista de abreviaturas.....	XI
Introdução.....	1
1. Importância das plantas	1
1.1. Contextualização medicinal	1
2. <i>Corema album</i> : uma espécie com interesse medicinal pouco explorada	2
2.1. Taxonomia.....	2
2.2. Distribuição geográfica e ecologia	3
2.3. Descrição vegetativa – flores e frutos	4
3. Metabolismo vegetal	5
3.1. Metabolismo de <i>Corema album</i> : compostos de interesse medicinal	7
4. Abordagens biotecnológicas para a propagação de espécies vegetais	8
4.1. Princípios básicos de micropropagação.....	8
4.2. Importância do meio de cultura.....	9
4.3. Importância das condições de cultura	11
4.4. Fases da micropropagação.....	11
4.4.1. Seleção do <i>stock</i> /plantas de elite	12
4.4.2. Estabelecimento em cultura asséptica	12
4.4.3. Multiplicação e alongamento	13
4.4.4. Enraizamento	13
4.4.5. Aclimatização	14
4.5. Potencialidades da micropropagação de <i>Corema album</i>	16
5. Produção em larga escala: uso e vantagens de biorreatores na produção de plantas	17
5.1. Biorreatores de imersão temporária	18
6. Análise de estabilidade de ploidia em material micropropagado.....	19
6.1. Aplicação da citometria de fluxo à análise de ploidia	19

6.2. Princípios da citometria de fluxo	20
7. Fisiologia da planta micropropagada: destaque para o estado oxidativo	21
7.1. Produção de espécies reativas de oxigénio	22
7.2. Eliminação de espécies reativas de oxigénio	24
7.2.1. Antioxidantes enzimáticos	24
7.2.2. Antioxidantes não enzimáticos	25
Objetivos.....	28
Materiais e Métodos.....	29
1. Micropropagação.....	29
1.1. Material vegetal	29
1.2. Aumento e manutenção da população <i>stock</i> de <i>Corema album</i>	29
1.3. Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i>	30
1.3.1. Multiplicação em meio de cultura gelificado.....	30
1.3.2. Multiplicação em biorreatores de imersão temporária.....	32
1.4. Ensaio de enraizamento.....	33
1.4.1. Enraizamento <i>in vitro</i>	34
1.4.2. Enraizamento <i>ex vitro</i> e pré-aclimatização	36
1.5. Aclimatização.....	38
2. Análise da estabilidade de ploidia das plantas micropropagadas	38
2.1. Material vegetal	38
2.2. Processamento da amostra e análise no citómetro de fluxo	38
3. Estado oxidativo de plantas micropropagadas	39
3.1. Material vegetal	39
3.2. Quantificação de espécies reativas de oxigénio.....	40
3.2.1. Quantificação anião superóxido	40
3.2.2. Quantificação peróxido de hidrogénio	40
3.3. Atividade enzimática	41
3.3.1. Extração do material vegetal	41
3.3.2. Quantificação proteínas totais solúveis	41
3.3.4. Determinação da atividade da ascorbato peroxidase	42
3.3.5. Determinação da atividade da catalase	43
3.3.6. Determinação da atividade da guaiacol peroxidase.....	43
3.4. Atividade não enzimática	44
3.4.1. Quantificação do conteúdo total de fenóis	44
3.4.2. Determinação da atividade antiradicalar.....	44
4. Análise estatística	45
Resultados.....	47
1. Micropropagação.....	47

1.1 Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i>	47
1.1.1. Identificação da melhor condição de multiplicação em meio gelificado... 47	
1.1.2. Identificação das melhores condições de cultura para a multiplicação em biorreatores de imersão temporária..... 50	
1.1.3. Multiplicação em meio gelificado vs biorreatores de imersão temporária 52	
1.2. Ensaio de enraizamento..... 53	
1.2.1. Identificação das melhores condições de enraizamento <i>in vitro</i> 53	
1.2.2. Identificação das melhores condições de enraizamento <i>ex vitro</i> e aclimatização 58	
2. Análise da estabilidade de ploidia das plantas micropropagadas	61
3. Avaliação do estado oxidativo das plantas micropropagadas	62
3.1. Espécies reativas de oxigénio..... 62	
3.1.1. Níveis de superóxido 62	
3.1.2. Níveis de peróxido de hidrogénio 63	
3.2. Atividade enzimática 64	
3.2.1. Proteínas totais solúveis..... 64	
3.2.2. Atividade superóxido dismutase 65	
3.2.3. Atividade ascorbato peroxidase..... 65	
3.2.4. Atividade catalase 66	
3.2.5. Atividade guaiacol peroxidase 67	
3.3. Atividade não enzimática 67	
3.3.1. Conteúdo total de fenóis..... 67	
3.3.2. Atividade antiradicalar 68	
Discussão	69
1. Micropropagação..... 69	
2. Estabilidade de ploidia das plantas micropropagadas 77	
3. Estado oxidativo das plantas micropropagadas..... 78	
Conclusões e perspetivas futuras	82
Referências bibliográficas	85

Índice de figuras

Figura 1: Planta feminina de <i>Corema album</i> em frutificação. Retirado de: Costa (2011).	5
Figura 2: Esquema representativo das vias metabólicas envolvidas na formação das três classes principais de metabolitos secundários. Cada uma das vias está assinalada com os números 1, 2 ou 3. Retirado de: Ramawat et al. (2009).....	6
Figura 3: Principais fases de micropropagação (Fase 0, I, II, III e IV). A fase 0, corresponde à seleção do <i>stock</i> vegetal, fase I ao estabelecimento da planta <i>in vitro</i> , fase II à multiplicação e alongamento, a fase III ao enraizamento <i>in vitro</i> ou <i>ex vitro</i> do material aclimatizado na fase IV. Adaptado de Hartman et al. (2011)	16
Figura 4: Esquema representativo de um BIT, demonstrado a transferência do meio e o movimento do ar entre o reservatório do meio de cultura e o reservatório contendo o material vegetal. Retirado de: Lima et al. (2012).....	19
Figura 5: Esquema representativo do princípio básico da citometria de fluxo, evidenciado os três componentes principais de um citómetro de fluxo: componente fluidica, componente ótica e componente eletrónica. Retirado de: Adan et al. (2017). 21	
Figura 6: Efeito da concentração elevada de ERO ao nível dos lípidos, proteínas e ADN. Retirado de: Sarma et al. (2012)	22
Figura 7: Planta feminina de <i>Corema album</i> em período de frutificação, representativa do local onde o material vegetal foi recolhido.	29
Figura 8: Esquema representativo das diferentes condições de multiplicação. Cada condição é representada por 5 frascos, cada um contendo 7 rebentos, totalizando 35 rebentos por tratamento.....	32
Figura 9: Representação de alguns dos tratamentos testados na multiplicação de <i>Corema album</i> . Em todas as imagens (A, B e C) o regulador de crescimento 2iP é utilizado na concentração de 2mg/L e a BAP (A), mT (B) e Cin (C) na concentração de 1 mg/L. Em C, encontra-se representada uma das réplicas do tratamento T17, que apresenta os resultados mais favoráveis para a multiplicação desta espécie	50
Figura 10: Rebento em estado de vitrificação, umas das principais problemáticas associadas à cultura em biorreatores.	52
Figura 11: Comparação da fase de multiplicação de <i>Corema album</i> em biorreator e frasco de cultura, com informações relativas ao número de novos rebentos (>5mm) (A) e ao comprimento dos rebentos (mm) (B). Os resultados estão representados em valor médio \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).	53
Figura 12: Alongamento dos rebentos não enraizados (A e B). Em B observa-se um rebento saudável, com sinais de oxidação na porção basal.....	56
Figura 13: Processo de enraizamento nos 2 tipos de substratos testados. (A) Perlite + Vermiculite (1:1, v:v); (B) <i>Jiffys</i>	58

- Figura 14:** Rebentos de *Corema album* enraizados em substrato P+V, após a indução com 0,2 % AIB, a combinação mais promissora para o desenvolvimento radicular desta espécie. (A barra representa 25 mm)..... 60
- Figura 15:** Transferência de rebentos enraizados *ex vitro* para vasos com a mistura perlite + turfa+ substrato comercial (1:2:1, v:v:v) (A). Rebroto enraizado *ex vitro*, com aspeto vigoroso (B)..... 61
- Figura 16:** Histogramas de citometria de fluxo representativos da intensidade da fluorescência relativa do iodeto de propídio obtidos após a análise simultânea de núcleos isolados de uma referência padrão (*Solanum lycopersicum*) e de plantas de campo (A-C) ou plantas micropropagadas (D-F) de *Corema album*. Em todos os histogramas (A, B, C, D, E e F), (1) corresponde à fase G0/G1 de *Corema album* e (2) à fase G0/G1 de *Solanum lycopersicum*. (3) representa a fase G2 da espécie padrão. A seta vermelha aponta para a região da fase G2 de *Corema album*. 62
- Figura 17:** Níveis $O_2^{\cdot -}$ nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$)..... 63
- Figura 18:** Níveis de H_2O_2 nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). 64
- Figura 19:** Conteúdo de proteínas totais solúveis nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). 64
- Figura 20:** Atividade da SOD nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). 65
- Figura 21:** Atividade da APX nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. ns representa a ausência de diferenças significativas. 66
- Figura 22:** Atividade da CAT nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. ns representa a ausência de diferenças significativas. 66
- Figura 23:** Atividade da GPX nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). 67
- Figura 24:** Conteúdo total de fenóis nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). 68
- Figura 25:** Atividade antiradicalar nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$). 68

Figura 26: Resumo do protocolo otimizado para a micropropagação de *Corema album*.
 84

Índice de tabelas

Tabela 1: Exemplos de espécies vegetais com propriedades medicinais e do seu valor no mercado. Retirado de: Rao & Ravishankar (2002). 2

Tabela 2: Principais constituintes do meio de cultura vegetal. 11

Tabela 3: Principais antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos utilizados na eliminação de ERO, com informação relativa à sua função e localização subcelular. Retirado de: Das & Roychoudhury (2014). 27

Tabela 4: Formulação do meio WPM (Lloyd & McCown 1980), com informação relativa aos seus constituintes e respetivas concentrações. 30

Tabela 5: Representação das diferentes condições de multiplicação, com informação relativa à combinação dos reguladores de crescimento e respetivas concentrações. A verde está assinalada a combinação de reguladores de crescimento usada até ao momento para a multiplicação de *Corema album*: 2 mg/L 2iP + 1 mg/L BAP. 31

Tabela 6: Representação das diferentes condições de multiplicação em sistemas BIT, com informação relativa à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, duração e frequência do período de imersão e arejamento e presença ou ausência de rede. 33

Tabela 7: Representação das diferentes condições de enraizamento *in vitro*, com informação relativa à modalidade de enraizamento, auxinas utilizadas e respetivas concentrações. 35

Tabela 8: Representação das diferentes condições de enraizamento *in vitro*, com informação relativa à fase de indução e à fase de expressão radicular. 36

Tabela 9: Representação das diferentes condições de enraizamento *ex vitro*, com informação relativa à concentração do regulador de crescimento AIB, assim como ao tipo de substrato utilizado. 38

Tabela 10: Diluições dos extratos da planta de campo e da planta micropropagada de *Corema album* em metanol, utilizados na quantificação da atividade antiradicalar. 45

Tabela 11: Efeito dos diferentes tratamentos na indução de rebentos (%), número de rebentos (>5mm) e comprimento (mm) dos rebentos formados na multiplicação de *Corema album* na 1ª e 2ª subculturas. Os parâmetros número de rebentos (>5mm) e comprimento dos rebentos (mm) estão representados como valor médio ± ep. Valores médios inseridos na mesma coluna e com a mesma letra não variam significativamente entre si ($p < 0,05$). A verde encontra-se assinalado o tratamento mais favorável para a multiplicação de *Corema album*. 49

Tabela 12: Efeito dos diferentes tratamentos na mortalidade (%), capacidade de indução de novos rebentos (%), número de rebentos (>5mm) e seu comprimento (mm) na

multiplicação de *Corema album* em BIT. Os parâmetros número de rebentos (>5mm) e comprimento dos rebentos (mm) encontram-se representados como valor médio \pm ep. Valores médios inseridos na mesma coluna com a mesma letra não variam significativamente entre si ($p < 0,05$). SR representa ausência de resultado. A verde encontra-se assinalado o tratamento mais promissor para a multiplicação de *Corema album* em BIT. 51

Tabela 13: Efeito dos diferentes tratamentos na % de indução radicular, número de novas raízes formadas por rebento e no seu comprimento (mm), assim como o comprimento dos rebentos (mm) em *Corema album*. O parâmetro comprimento dos rebentos (mm) encontra-se representado como valor médio \pm ep. Valores médios inseridos na mesma coluna com a mesma letra não variam significativamente entre si ($p < 0,05$). SR representa a ausência de resultado. * rebentos que permaneceram durante todo o tempo de enraizamento em meio de cultura com a respetiva auxina. A verde encontra-se assinalada a melhor condição de alongamento em *Corema album*. 55

Tabela 14: Efeito dos diferentes tratamentos na % de indução radicular, número de novas raízes formadas por rebento e no seu comprimento (mm), assim como o comprimento dos rebentos (mm) em *Corema album*. O parâmetro comprimento do rebento (mm) encontra-se representado como valor médio \pm ep. Valores médios inseridos na mesma coluna com a mesma letra não variam significativamente entre si ($p < 0,05$). SR representa a ausência de resultado. A verde encontra-se assinalada a melhor condição de alongamento em *Corema album*. 57

Tabela 15: Efeito dos diferentes tratamentos na capacidade de indução de raízes (%), no número de raízes formadas por rebento e no seu comprimento (mm), assim como no comprimento dos rebentos (mm) em *Corema album*. Os parâmetros número de raízes, comprimento radicular (mm) e comprimento do rebento (mm) encontram-se representados como valor médio \pm ep. Valores médios inseridos na mesma coluna com a mesma letra não variam significativamente entre si ($p < 0,05$). A verde encontra-se assinalado o tratamento mais favorável para o enraizamento *ex vitro* de *Corema album*. 59

Tabela 16: Conteúdo de ADN genómico (pg) e coeficiente de variação (%) das plantas micropropagadas e das plantas de campo de *Corema album*. O conteúdo de ADN (pg) e o CV (%) encontram-se representados como o valor médio \pm dp. 61

Lista de abreviaturas

- 2iP** - N⁶-(2-Isopentenil)adenina
- AAB** - ácido abscísico
- ADN** - ácido desoxirribonucleico
- AG** - ácido gálico
- AIA** - ácido indol-3-acético
- AIB** - ácido indol-3-butírico
- ANA** - ácido 1-naftalenoacético
- APX** - ascorbato peroxidase
- ARN** - ácido ribonucleico
- AsA** - ascorbato
- BAP** - 6-Benzilaminopurina
- BIT** - biorreatores de imersão temporária
- BSA** (do inglês *bovine serum albumine*) - albumina do soro bovino
- CA** - carvão ativado
- CAT** - catalase
- Cin** - cinetina
- CV** - coeficiente de variação
- DMSO** - dimetilsulfóxido
- DHA** - dehidroascorbato
- DHAR** - dehidroascorbato redutase
- dp** - desvio padrão
- DPPH** (do inglês *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) - 2,2-difenil-1- picrilhidrazilo
- DTT** - ditioneitol
- EAG** - equivalentes de ácido gálico
- EDTA** (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) - ácido etilendiamino tetra-acético)
- ep** - erro padrão
- ERO** - espécies reativas de oxigénio
- GPX** - guaiacol peroxidase
- GSH** - glutationa
- HR** - humidade relativa
- LS** - Linsmaier & Skoog
- MDHA** - monodehidroascorbato
- MF** - massa fresca
- MS** - Murashigue & Skoog

mT - meta-topolina

NBT (do inglês *nitroblue tetrazolium*) - azul de nitrotetrazólio

NN - Nitsch & Nitsch

PMSF (do inglês *phenylmethylsulfonyl fluoride*) - fenilmetilsufonil

PVP - polivinilpirrolidona

Rnase - ribonuclease

SH - Schenk & Hildbrandt

SO - stresse oxidativo

SOD - superóxido dismutase

TCA (do inglês *trichloroacetic acid*) - ácido tricloroacético

TPC (do inglês *total phenolic content*) - conteúdo total de fenóis

TSP (do inglês *total soluble protein*) - proteínas solúveis totais

WPB (do inglês *woody plant buffer*) - tampão para plantas lenhosas

WPM (do inglês *woody plant medium*) – meio para plantas lenhosas

Introdução

1. Importância das plantas

A humanidade sempre dependeu do uso de plantas para assegurar as suas múltiplas necessidades ao nível da (1) alimentação (eg: cereais, legumes), providenciando dietas ricas e fundamentais para o bem-estar humano e animal; (2) vestuário, já que muita da roupa é feita com materiais de origem vegetal, direta ou indiretamente; (3) saúde, sendo frequentemente utilizadas na medicina tradicional para o tratamento/ prevenção de doenças (Dar et al. 2017; Usman et al. 2014). Para além disso, as plantas ajudam na melhoria da qualidade do ar, através da fixação de grandes quantidades de dióxido de carbono e libertação de oxigénio na atmosfera durante o processo fotossintético (Usman et al. 2014). Apesar dos enormes benefícios para a humanidade, muitas espécies vegetais nativas estão a desaparecer a uma taxa alarmante, maioritariamente devido a causas antrópicas (Humphreys et al. 2019; Usman et al. 2014).

1.1. Contextualização medicinal

Existem registos da utilização de plantas para fins medicinais desde há milhares de anos (Balunas & Kinghorn 2005) na China (Hesketh & Zhu 1997) e na Índia (Scartezzini & Speroni 2000). No entanto, as evidências escritas mais antigas remontam há aproximadamente 5000 anos na Suméria, existindo dados arqueológicos que sugerem uma utilização ainda mais primitiva (Raskin et al. 2002). Atualmente, uma grande parte da população mundial recorre a métodos tradicionais para cuidados primários de saúde e, aproximadamente 80% da humanidade, principalmente nos países em desenvolvimento, socorre-se de plantas medicinais ou de seus derivados em atividades medicinais (Firmo et al. 2011; Jamshidi-kia et al. 2018).

As plantas medicinais são definidas pela Organização Mundial de Saúde como plantas que possuem propriedades ou compostos que podem ser utilizados para fins terapêuticos ou que sintetizam metabolitos úteis na produção de drogas (WHO 1977). Estas sempre representaram uma das principais matérias primas para a indústria farmacêutica. Tradicionalmente, os químicos com potencial efeito na saúde podem ser classificados de três formas distintas: produtos naturais originais, produtos derivados ou quimicamente sintetizados a partir de produtos naturais e produtos sintéticos baseados nas estruturas dos produtos naturais (Raja et al. 2010). Em 1826, a morfina foi o primeiro produto natural (puro) comercializado para fins terapêuticos, enquanto que a aspirina, introduzida no mercado em 1899, foi o primeiro medicamento semi-sintético baseado

num produto natural, a salicina, isolado a partir da espécie vegetal *Salix alba* (Veeresham 2012).

Existe um futuro promissor relativamente à utilização de plantas para fins medicinais (tabela 1), uma vez que a grande maioria das espécies vegetais ainda não foi investigada relativamente ao seu potencial terapêutico (Singh 2015).

Tabela 1: Exemplos de espécies vegetais com propriedades medicinais e do seu valor no mercado. Retirado de: Rao & Ravishankar (2002).

Product	Use	Plant species	Cost (US\$ per kilogram)
Ajmalicine	Antihypertensive	<i>Cath. roseus</i>	37,000
Artemisinin	Antimalarial	<i>Artemisia annua</i>	400
Ajmaline	–	<i>Ra. serpentina</i>	75,000
Acinitine	–	<i>Acotinum spp.</i>	n/a
Berberine	Intestinal ailment	<i>C. japonica</i>	3250
Camptothecin	Antitumour	<i>Camptotheca acuminata</i>	432,000
Capsaicin	Counterirritant	<i>Ca. frutescens</i>	750
Castanospermine	Glycoside inhibitor	<i>Castanospermum australe</i>	n/a
Codeine	Sedative	<i>P. somniferum</i>	17,000
Colchicine	Antitumour	<i>Colchium autumnale</i>	35,000
Digoxin	Heart stimulant	<i>Di. lanata</i>	3000
Diosgenin	Steroidal precursor	<i>Dioscorea deltoidea</i>	1000
Ellipticine	Antitumour	<i>Orchrosia elliptica</i>	240,000
Emetine	–	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	1500
Forskolin	Bronchial asthma	<i>Coleus forskolii</i>	n/a
Ginsenosides	Health tonic	<i>Panax ginseng</i>	n/a
Morphine	Sedative	<i>P. somniferum</i>	340,000
Podophyllotoxin	Antitumour	<i>Podophyllum petalum</i>	n/a
Quinine	Antimalarial	<i>Cinchon. ledgeriana</i>	500
Sanguinarine	Antiplaque	<i>Sanguinaria canadensis</i>	4,800
		<i>P. somniferum</i>	
Shikonin	Antibacterial	<i>L. erythrorhizon</i>	4500
Taxol	Anticancer	<i>Taxus brevifolia</i>	600,000
Vincristine	Antileukemic	<i>Cath. roseus</i>	2,000,000
Vinblastine	Antileukemic	<i>Cath. roseus</i>	1,000,000

2. *Corema album*: uma espécie com interesse medicinal pouco explorada

A pesquisa arqueobotânica em *Corema album* (L.) D. Don tem demonstrado registos da sua importância na cultura humana, que datam do início do período Neolítico (López-Dóriga 2018). Atualmente, o seu fruto é vendido como um produto fresco em alguns mercados de Espanha (Galiza e Andaluzia) e Portugal e desperta particular interesse por parte das crianças que comem estes frutos como se fossem doces (Gil-López 2011; León-González et al. 2013). Para além da sua utilização como alimento, esta espécie tem sido cultivada como planta ornamental (Gonzales 2011), mas nunca apresentou uma grande valorização comercial.

2.1. Taxonomia

Corema album, vulgarmente apelidada de camarinha ou camarinheira, é uma das duas espécies que constituem o género *Corema*, pertencente à família Ericaceae e

subfamília Ericoideae. *Corema album* contém duas subespécies: *Corema album* subsp. *album* e *Corema album* subsp. *azoricum* (de Oliveira & Dale 2012). *Corema conradii*, a outra espécie do género *Corema*, distingue-se facilmente de *Corema album* através do seu fruto (de tamanho bastante reduzido), previamente descrito como seco (Martine et al. 2005) e com estruturas brancas e carnudas, desenvolvidas na sua porção basal (Dunwiddie 1990).

2.2. Distribuição geográfica e ecologia

No que diz respeito à sua distribuição geográfica, *Corema album* subsp. *azoricum*, é endémica do arquipélago dos Açores (Ormonde & Constância 1991), onde se encontra representada em seis das nove ilhas Açorianas. *Corema album* subsp. *album* encontra-se dispersa na costa atlântica da Península Ibérica (Zunzunegui et al. 2006), crescendo em solos sob dunas e falésias costeiras (Álvarez-Cansino et al. 2010). A espécie *Corema conradii* é encontrada em sistemas dunares sob as rochas graníticas e ígneas das montanhas costeiras do noroeste dos Estados Unidos e sudeste do Canadá (Díaz-Barradas et al. 2002; Mcewen 1894).

Corema album apresenta uma distribuição limitada a ambientes costeiros, nomeadamente dunas de areia, locais rochosos e, na Ilha dos Açores em lavas vulcânicas e campos de cinzas (Calviño-Cancela 2005; Guitián 1997). Atualmente, a distribuição da camarinha encontra-se em regressão tendo até mesmo desaparecido o seu *habitat* natural em várias regiões. Por exemplo, na Galiza, esta espécie, que foi outrora abundante, está confinada a duas grandes populações, uma nas Ilhas Cies e outra em Camarinhas, na Corunha (Díaz-Barradas et al. 2002). Considera-se que a fragmentação e degradação dos habitats são as principais causas de extinção local e regressão de numerosas espécies (Fahrig 1997). Os ecossistemas de dunas litorais da Península Ibérica têm sofrido uma enorme regressão nos últimos 30 anos devido à crescente pressão antrópica fundamentalmente associada a fins urbanísticos e recreativos (Clavijo et al. 2003) e à introdução de espécies exóticas de crescimento rápido. Estes processos têm colocado em risco a sobrevivência ou a regeneração de um número elevado de espécies autóctones, nomeadamente o cedro das dunas (*Juniperus oxycedrus*) e a camarinha (Clavijo et al. 2002). Nos Açores, *Corema album* é uma das espécies considerada de conservação prioritária e é uma das cem espécies de risco com elevada prioridade de conservação na região da Macaronésia (Arquipélago dos Açores e Madeira, Ilhas Selvagens, Ilhas Canárias e Cabo Verde) (Silva et al. 2008).

2.3. Descrição vegetativa – flores e frutos

Corema album é um arbusto dioico e perene, com numerosas ramificações geralmente entre os 30-75 cm, podendo atingir 1 m de altura, embora raramente este valor seja excedido (de Oliveira & Dale 2012; Santos et al. 2014). Os arbustos do sexo feminino distinguem-se morfológica e fisiologicamente dos arbustos do sexo masculino, caracterizando-se os primeiros como curtos e curvilíneos, enquanto as do sexo masculino são longos e eretos (Andrade 2016; Zunzunegui et al. 2006)

As folhas apresentam dimensões compreendidas entre 8-10 mm de comprimento e 1 mm de largura e estão em verticilos de 3 ou 4, com pecíolos curtos (Lisboa 2017). Quando as folhas são jovens, estas são cobertas com glândulas sésseis, que desaparecem nas folhas desenvolvidas (De Oliveira & Dale 2012).

Corema album apresenta flores pequenas com simetria actinomorfa, cujo número por inflorescência é variável entre os sexos, nunca excedendo as 20 (Gutián et al. 1997). As flores masculinas estão agrupadas em inflorescências de 4-14, possuindo as flores três sépalas, pétalas avermelhadas e três estames com anteras vermelhas conspícuas. As flores femininas apresentam menores dimensões relativamente às masculinas, também com três pequenas pétalas avermelhadas, três sépalas e três estigmas vermelhos (Álvarez-Cansino et al. 2010; de Oliveira & Dale 2012; Díaz-Barradas et al. 2018). As plantas produzem as flores numa fase inicial da primavera, começando em fevereiro e estendendo-se até abril (Andrade 2017) e a sua polinização é sobretudo realizada pela ação do vento (Gutián et al. 1997; Li et al. 2002)

No verão, as plantas femininas de *Corema album* produzem centenas a milhares de frutos brancos ou rosados, de formato quase esférico (figura 1). Cada fruto possui um diâmetro de aproximadamente 5-8 mm e geralmente contém três pequenas sementes (excecionalmente duas ou quatro) (Álvarez-Cansino et al. 2010; Diaz-Barradas et al. 2016). O tamanho da semente relaciona-se positivamente com o tamanho do fruto (Larrinaga & Gutián 2016). A produção de frutos em *Corema album* estende-se de julho a outubro, correspondendo ao período de temperaturas mais elevadas, ausência de chuva e intensa radiação (longas horas de luz solar forte), sobretudo nas áreas expostas das zonas costeiras (Diaz-Barradas et al. 2016).

A dispersão de sementes é um mecanismo extremamente importante para a regeneração natural da população de plantas (Calviño-Cancela 2002), sendo que alguns estudos referem a importância de animais frugívoros na regeneração das populações de *Corema album* nos sistemas dunares da Costa Atlântica da Península Ibérica (Clavijo et al. 2003; Calviño-Cancela 2005; Calviño-Cancela 2002). Os frutos

são previamente ingeridos e posteriormente as sementes são dispersas via defecação ou regurgitação. Gaivotas (*Larus cachinnans Pallas*) e melros (*Turdus merula*), assim como pequenos passeriformes e coelhos fazem parte das espécies que realizam a dispersão das sementes de camarinha (Calviño-Cancela 2002). A endozoocoria (ingestão e posterior libertação do diásporo) assume importância vital, não apenas pela sua intervenção na dispersão, mas também como potenciador quer da germinação das sementes através da remoção da polpa e de compostos químicos que poderão ser inibidores de germinação (Costa 2011; D'Antonio 1990), quer pela escarificação física e química da casca da semente, tornando-a mais permeável à passagem de água e gases assim como à perceção de sinais exteriores necessários ao início do processo germinativo e estabelecimento das plântulas (Izhaki & Safriel 1990; Traveset 1998).

Atualmente, ao contrário de outros pequenos frutos, a camarinha (vulgarmente denominada de *crowberry* portuguesa), não é comercializada nas grandes cadeias de distribuição do setor agroalimentar. No entanto, os seus frutos, que se caracterizam pelo seu sabor levemente ácido, riqueza em água, açúcares e fibras (Andrade 2016) têm sido tradicionalmente consumidos nas zonas costeiras, frescos ou utilizados na confeção de limonadas, geleias e licores (Andrade et al. 2017).



Figura 1: Planta feminina de *Corema album* em frutificação. Retirado de: Costa (2011).

3. Metabolismo vegetal

As plantas produzem uma vasta gama de metabolitos, estimando-se que coletivamente atinjam valores entre os 100000 e 1 milhão. Sendo as plantas seres imóveis, muitos destes compostos apresentam papéis essenciais na resistência e tolerância da planta aos stresses biótico e/ou abiótico. (Afendi et al. 2013; Dixon & Strack 2003; Fang et al. 2019; Rai et al. 2017; Weng 2014).

Os metabolitos primários como os carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos são produzidos através das vias metabólicas fundamentais como o ciclo de Calvin, a Glicólise e o ciclo de Krebs e podem encontrar-se ubiquamente distribuídos nas células vegetais, apresentando funções essenciais na sobrevivência e desenvolvimento das plantas (Rungsung et al. 2015). Por outro lado, alguns metabolitos secundários, também denominados de metabolitos especializados, podem apresentar uma distribuição taxonômica limitada, que pode ser única de uma espécie ou gênero (Kennedy & Wightman 2011; Russell & Duthie 2011).

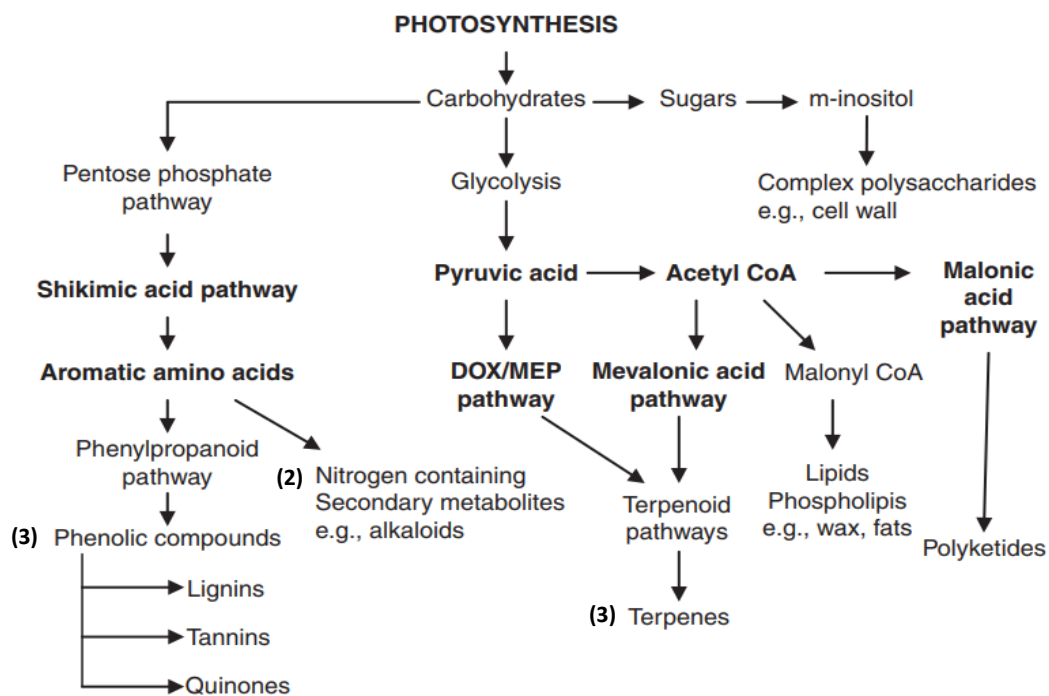


Figura 2: Esquema representativo das vias metabólicas envolvidas na formação das três classes principais de metabolitos secundários. Cada uma das vias está assinalada com os números 1, 2 ou 3. Retirado de: Ramawat et al. (2009).

Embora os metabolitos secundários não apresentem um papel essencial nas necessidades metabólicas primárias das plantas, estes melhoram a sua capacidade de sobrevivência e facilitam a sua interação com o ambiente (Kennedy & Wightman 2011), uma vez que possuem um papel fundamental na resposta aos stresses biótico e abiótico (eg: herbivoria), interações benéficas com insetos (eg: polinização) e comunicação com outras espécies vegetais e não vegetais (eg: alelopatia) (Moghe & Last 2015; Pichersky & Lewinsohn 2011; Saito & Matsuda 2010; Wink 2010). Os metabolitos secundários são frequentemente extraídos das plantas e utilizados como fitofarmacêuticos, fragrâncias, inseticidas e corantes, conferindo-lhes um elevado valor económico (Pagare et al. 2015).

De uma forma generalizada, os metabolitos secundários podem ser classificados com base na estrutura química (eg: existência de anéis e açúcares), composição (eg: presença ou ausência de azoto), solubilidade em vários solventes e as vias metabólicas pelos quais são sintetizados (Devika & Koililai 2012). Assim, estes podem ser divididos em: (1) compostos fenólicos, (2) compostos que contêm azoto, como os alcaloides e (3) terpenos (figura 2).

3.1. Metabolismo de *Corema album*: compostos de interesse medicinal

As crescentes evidências científicas sobre relação entre a dieta alimentar e a saúde têm aumentado a procura do consumidor por um maior número de informação acerca de dietas nutricionalmente ricas, que incluem sobretudo frutas e legumes (Nöthlings et al. 2008). Os constituintes bioativos destes alimentos apresentam efeitos benéficos para a saúde humana e o seu consumo tem um papel importante na prevenção de uma vasta gama de doenças (Joshi et al. 1999; Timlin & Pereira 2007). Os frutos silvestres/bagas poderão ser um dos componentes incluídos nas dietas saudáveis, uma vez que de uma forma geral contêm elevados níveis de compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, glicosídeos flavonoides e antocianinas (León-González et al. 2013), existindo numerosos estudos que sugerem que o seu consumo apresenta efeitos benéficos na saúde: prevenção de infeções do trato urinário (Jepson & Craig 2007), neuroprotecção (Fuentealba et al. 2011; Krikorian et al. 2010), redução do risco de doença cardiovascular (Sesso et al. 2007) e prevenção do cancro (Neto 2011; Seeram 2008; Truchado et al. 2013).

Recentemente, diversos estudos têm evidenciado o carater antioxidante dos frutos e folhas de *Corema album*, maioritariamente associado à sua riqueza em compostos fenólicos (Andrade et al. 2017; Diaz-Barradas et al. 2016; León-gonzález et al. 2012; Macedo et al. 2015). León-González et al. (2013) identificaram e quantificaram, por técnicas de cromatografia, quinze compostos presentes no fruto da camarinha, incluindo ácidos fenólicos (2268 mg/Kg), flavonoides (638 mg/Kg) e antocianinas (19 mg/Kg), verificando-se que os ácidos fenólicos são os principais constituintes deste fruto. Inseridos neste grupo foram ainda identificados onze compostos distintos: ácido benzoico, ácido salicílico, ácido *t*-cinâmico, ácido *p*-hidrobenzóico, ácido vanílico, ácido gentísico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico e ácido cafeico, sendo os ácidos benzoico, vanílico, ferúlico e cafeico os mais abundantes. Para além

disso, León-González et al. (2012) comprovaram os efeitos protetores de extratos fenólicos do fruto da camarinha contra o stresse oxidativo em células hepáticas.

Ferreira (2018) também evidenciou os frutos e folhas de *Corema album* como potenciais fontes de compostos fenólicos e flavonoides, apresentando as folhas uma maior riqueza face ao fruto, assim como uma maior atividade antioxidante. Para além disso, verificou-se que os extratos das folhas da camarinha apresentam efeitos citotóxicos contra a linhagem de células HT-29 de cancro do colón, induzindo a morte celular das mesmas. Também o seu efeito no controlo da doença de Parkinson, um dos distúrbios neurodegenerativos mais comuns, que se encontra associado à agregação da alfa-sinucleína, responsável pela formação dos corpos de *Lewy* (Kim et al. 2014), pode ser promissor. Estudos sobre o potencial antioxidante das folhas de *Corema album* evidenciaram que a sua fração rica em polifenóis apresenta uma ação protetora contra o stresse oxidativo, assim como contra a toxicidade induzida pela alfa-sinucleína (Macedo et al. 2015).

4. Abordagens biotecnológicas para a propagação de espécies vegetais

As ferramentas biotecnológicas apresentam um papel fundamental na multiplicação e no melhoramento genético de plantas, através da utilização de técnicas de regeneração *in vitro* e de transformação genética (Bhatia et al. 2015). Muitas espécies que contêm compostos de elevado valor/bioatividade são difíceis de cultivar (Mulabagal & Tsay 2004; Rates 2001) e, por outro lado, a síntese química dos compostos derivados das mesmas é frequentemente não viável economicamente, devido às suas estruturas complexas e às necessidades estereoquímicas específicas destes compostos (Oksman-Caldentey & Inzé 2004). Para além disso, a colheita descontrolada de plantas em *habitats* naturais tem levado a que algumas espécies se tornem cada vez mais raras e em perigo de extinção, sendo a sua proteção urgente (Liao et al. 2006).

4.1. Princípios básicos de micropropagação

Técnicas como a propagação por cultura *in vitro*, em particular a micropropagação, podem contribuir para a resolução dos problemas supracitados. A micropropagação é uma das técnicas com maior relevância, que utiliza pequenas secções de tecidos ou órgãos, denominados explantes, removidos de um órgão/planta dador, desinfectados e cultivados assepticamente em meio de cultura geralmente definido (líquido ou sólido), sob condições ambientais controladas (Flickinger 2010; Zhou & Wu 2006). Esta técnica

baseia-se na capacidade de totipotência apresentada pelas células vegetais, onde a diferenciação é reversível. A generalidade das células diferenciadas retém a capacidade de desdiferenciar e adquirir um estado meristemático, podendo posteriormente ocorrer a diferenciação das células descendentes e, via organogénese/embriogénese originar-se uma planta completa (Bhojwani & Razdan 1996; Vasil & Vasil 1972). A micropropagação poderá desta forma apresentar algumas vantagens face aos métodos de cultura tradicionais, nomeadamente (1) a produção um elevado número de plantas num espaço e período de tempo relativamente reduzidos (Debnath et al. 2006); (2) conservação de genótipos de “elite”, raros e/ou economicamente importantes (Rani & Raina 2000); (3) produção de uma elevada quantidade de plantas semelhantes com a planta mãe, no seu tamanho, forma, cor das flores, presença e concentração de metabolitos (Suman 2017) e (4) produção de plantas independentemente do clima, estação do ano e condições ambientais, desde que as condições da cultura (luz, temperatura e humidade) sejam especificamente controladas durante o procedimento (Mehrotra et al. 2007).

Por outro lado, apesar das vantagens supracitadas, a micropropagação apresenta também algumas potenciais desvantagens, como (1) elevados custos de produção, maioritariamente derivados do custo da mão-de-obra (Etienne & Berthouly 2002); (2) contaminação, sendo algumas das maiores perdas económicas ao nível da micropropagação comercial causadas pelas contaminações das culturas de plantas, quer endógenas ou induzidas durante o processo (Leifert et al. 1994); (3) níveis de variação somaclonal superiores aos aceitáveis (Bairu et al. 2011; Miguel & Marum 2011) e (4) plântulas com taxa de sobrevivência reduzida durante a aclimatização (Chandra et al. 2010).

4.2. Importância do meio de cultura

O sucesso da cultura de tecidos vegetais como estratégia de propagação de plantas é altamente influenciado pela natureza do meio de cultura utilizado (George et al. 2008). Apesar de existirem diversos meios de cultura disponíveis, o meio Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog 1962) é o mais comumente utilizado. No entanto, frequentemente podem também ser utilizados diferentes meios de cultura como: Linsmaier & Skoog (LS) (Linsmaier & Skoog 1965), Schenk & Hildebrandt (SH) (Schenk & Hildebrandt 1972), meio para plantas lenhosas (WPM) (Lloyd & McCown 1980), Nitsch & Nitsch (NN) (Nitsch & Nitsch 1969), entre outros.

O meio utilizado para a cultura de células e tecidos vegetais é geralmente constituído por alguns dos seguintes componentes: macronutrientes na ordem dos mM,

micronutrientes na ordem dos μM , vitaminas cuja concentração é variável de acordo com o tipo de cultura, aminoácidos ou outros suplementos de azoto, açúcares como fonte de energia e carbono, outros suplementos orgânicos indefinidos, agentes de gelificação e reguladores de crescimento (tabela 2) (Torres 1989). Os reguladores do crescimento vegetal desempenham um papel importante, coordenando o crescimento e resposta ao stresse, assim como regulando a maioria dos processos fisiológicos (Stirk & Staden 2014). Estes são componentes críticos do meio de cultura, uma vez que estimulam a divisão celular e regulam o crescimento e diferenciação de rebentos, raízes e embriões nos explantes (Narayana et al. 2016). Nestes, podem incluir-se cinco classes distintas de fitohormonas: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (Poonam et al. 2014), sendo as auxinas e as citocininas reconhecidas como moléculas chave de sinalização no desenvolvimento (Moubayidin et al. 2009). Já é vastamente reconhecido que uma concentração elevada de citocinina favorece o desenvolvimento de rebentos (caulogénese), enquanto que a concentração elevada de auxinas favorece o desenvolvimento de raízes (rizogénese e/ou eventualmente embriogénese) e concentrações equilibradas de ambos os reguladores conduzem à formação de tecido caloso (*callus*) (George et al. 2008a).

Para além da composição basal do meio de cultura e da adição dos reguladores de crescimento, existe outro fator limitante no sucesso da micropropagação vegetal: valor do pH. De uma forma generalizada, os valores de pH entre 5,5-5,8 são os recomendados para a cultura *in vitro* na maioria das espécies vegetais (George 1993; Ostrolucká et al. 2010).

Tabela 2: Principais constituintes do meio de cultura vegetal.

Constituinte	Exemplo
Macronutrientes	N, P, K, Ca, Mg, S (Saad & Elshahed 2012)
Micronutrientes	Fe, Mn, B, Zn, Mo, Cu, Cl (Santos 2016)
Fonte de Carbono	Sacarose, glucose, frutose, sorbitol (Swedlund & Locy 1993; wamy et al. 2010; Yaseen et al. 2012)
Vitaminas	Tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, mio – inositol (George et al. 2008)
Aminoácidos	Glicina, glutamina, asparagina, L-arginina, cisteína, L-tirosina (Kadhimi et al. 2014; Torres 1989b)
Suplementos Orgânicos Indefinidos	Água de coco, extrato de bactéria, extrato de malte, hidrolisado de caseína (Molnár et al. 2011)
Agentes Gelificantes	Agar, poliacrilamida, extratos de tecidos mucilaginosos, polissacarídeos microbianos, agarose, amidos vegetais (Henderson & Kinnersley 1988.; Liu 1989; Sovari 1986; Titel et al. 1987; Wang & Hu 1980)
Reguladores de Crescimento	Ácido indoloacético, ácido indolbutírico, ácido naftalenoacético, 2-(isopentenil)adamina, cinetina, 6-benzilaminopurina, ácido abscísico (Flickinger 2013; Gaspar et al. 1996; George et al. 2007; Rai et al. 2011; Viana & Mantell 1998)

4.3. Importância das condições de cultura

O material vegetal deverá ser mantido sob condições ambientais controladas, de modo a atingir um crescimento ótimo. Todos os tipos de cultura deverão ser incubados em condições de temperatura controlada, evitando flutuações superiores a $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$. A humidade relativa (HR%), é em geral elevada durante a cultura *in vitro* (~98%, baixando durante a aclimatização). Também a qualidade da luz deverá ser em geral de baixa intensidade e ajustável em termos de quantidade e duração do fotoperíodo (eg: lâmpadas fluorescentes), que varia entre dias longos, dias neutros ou dias curtos (Bhatia et al. 2015).

4.4. Fases da micropropagação

Os métodos de micropropagação de plantas podem dividir-se em três tipos distintos, consoante o material inicial e a resposta obtida, nomeadamente a proliferação de meristemas existentes no explante inicial, indução da organogénese e formação de embriões somáticos. De uma forma generalizada, a cultura de tecidos vegetais pode

dividir-se em cinco fases distintas (0-IV) (figura 3), propostas por Murashige (1974) e Debergh & Maene (1981).

4.4.1. Seleção do *stock*/plantas de elite

O primeiro passo no processo de micropropagação é a seleção do *stock* ou das plantas de elite que apresentem características desejáveis para a sua multiplicação em grande escala (Bhatia & Sharma 2015). Esta fase envolve a preparação da planta-mãe, de modo a providenciar explantes de qualidade para um melhor estabelecimento em condições assépticas na fase I (Bhojwani & Razdan 1996).

A fase de pré-propagação (também denominada de fase 0 requer a manutenção apropriada da planta-mãe (eg: em estufa) preferencialmente em condições livres de agentes patogénicos e pragas (Shastri 2006). Uma vez que as condições fitossanitárias da planta dadora são um dos aspetos mais importantes a ter em consideração, são aplicados pré-tratamentos à base de fungicidas e/ou inseticidas sistémicos, por vezes ainda acrescidos de antibióticos (Altafin 2005).

Desta forma, deve ser providenciada uma seleção e manutenção efetiva da fonte dos explantes para garantir que esta possui as seguintes características (Flickinger 2010): (1) representante certificada da espécie ou cultivar desejada; (2) planta com aspeto saudável e vigoroso, com potencial para responder às condições da cultura e (3) planta aparentemente livre de doenças e contaminações endógenas.

4.4.2. Estabelecimento em cultura asséptica

O objetivo primordial da fase I centra-se na obtenção de uma cultura vegetal em condições assépticas (livre de infeções obvias), com uma percentagem satisfatória de explantes que sobreviva e apresente um rápido crescimento (Murashige 1974).

Ácaros, fungos, leveduras e bactérias têm sido relatados como contaminantes em culturas *in vitro* (Blake 1988; Enjalric et al. 1987; Leggat et al. 1988; Leifert et al. 1989), sendo a presença de bactérias considerada a forma mais grave de contaminação, que pode conduzir a taxas reduzidas de multiplicação e enraizamento, ou até mesmo à morte das culturas vegetais (Leifert et al. 1989). De uma forma generalizada, existem quatro fontes distintas de infeção: a planta, o meio nutritivo, o ar e o operador, sendo que a planta representa a fonte de infeção mais importante (Pierik 1997). Com o intuito de eliminar a ocorrência de contaminação durante a propagação *in vitro* têm sido desenvolvidos vários protocolos de desinfeção (Barrett & Cassells 1994; Herman 1996; Hussain et al. 1994; Mihaljevic et al. 2013). Uma vez que as superfícies dos materiais vegetais estão naturalmente contaminadas com microrganismos

provenientes do meio ambiente, a desinfecção dessas superfícies usando substâncias químicas é um processo crítico, sendo os desinfetantes mais comumente utilizados o hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, etanol, cloreto de mercúrio, peróxido de hidrogénio e o nitrato de prata (Mihaljevic et al. 2013). Frequentemente, adiciona-se uma substância surfactante (eg: Tween 20) à solução de desinfecção, com o objetivo aumentar a eficiência da mesma (Oyebanji et al. 2009).

Apesar da principal fonte de contaminação ser o material vegetal, a proliferação de contaminantes é potenciada no meio de cultura (Bertoncelli et al. 2009), podendo levar a um domínio do meio pelos agentes contaminantes que competem com os tecidos vegetais pelos nutrientes (Odutayo et al. 2007). Uma vez estabelecidos no meio de cultura, estes contaminantes podem ter um crescimento rápido, levando a uma depleção dos nutrientes e produzindo toxinas que afetam o crescimento, ou que conduzem à morte do tecido vegetal (Guri & Patel 1998).

4.4.3. Multiplicação e alongamento

O objetivo primordial da fase II centra-se na multiplicação de órgãos e estruturas, que são capazes de formar plantas completas (Sathyanarayana & Verghese 2007). Geralmente, a multiplicação é melhorada pela adição de citocinina isolada ou combinada com uma pequena quantidade de auxina ao meio de cultura, sendo que a presença e quantidade destes reguladores de crescimento até ao momento é empiricamente determinada (Sathyanarayana & Verghese 2007). Em determinados casos, quando os rebentos não possuem dimensões adequadas (geralmente < 1cm), a multiplicação pode ser seguida de uma subfase denominada alongamento, na qual os rebentos adquirem um tamanho superior devido à ação de agentes como as giberelinas, tornando-se mais propícios para o enraizamento (Canhoto 2010; Shani et al. 2013)

4.4.4. Enraizamento

O enraizamento de pequenos rebentos é geralmente um processo problemático, no qual se verificam perdas de material vegetal, com vastas consequências ao nível económico (de Klerk 2002).

O desenvolvimento de raízes pode ser alcançado através de duas metodologias distintas (Canhoto 2010):

1. *Ex vitro* (Benmahioul et al. 2012a; Yan et al. 2010);
2. *In vitro* (Bhatia & Sharma 2015);

Os dois métodos supracitados são muito distintos entre si em vários aspetos, nomeadamente no tempo de exposição à auxina, que se verifica bastante reduzido no

enraizamento *ex vitro*, enquanto que na técnica *in vitro* pode ocorrer durante um longo período de tempo (de Klerk 1997), na morfologia das raízes formadas, verificando-se que o enraizamento *ex vitro* geralmente conduz à formação de um sistema radicular melhor desenvolvido, quando comparado com o das plantas resultantes de enraizamento *in vitro* (Borkowska 2001; McClelland et al. 1990; Yan et al. 2010). Para além disso, as plântulas enraizadas *ex vitro* não requerem uma aclimatização previa à sua transplantação para ambiente de estufa (Pruski et al. 2000; Yan et al. 2010), permitindo uma redução nos custos de manipulação e do tempo necessário para os processos de enraizamento e aclimatização (Ranaweera et al. 2013).

Com o intuito de enraizar os rebentos provenientes da multiplicação, várias auxinas podem ser utilizadas (eg: ácido indoloacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA)) (Overvoorde et al. 2010). A auxina convencionalmente mais utilizada é o AIB, quer para os processos de enraizamento *in vitro*, quer *ex vitro* (de Klerk et al. 1999; Gonçalves et al. 1998; Krikorian 1995; Štefančič et al. 2005).

Existem vários fatores, para além daqueles que apresentam um caráter hormonal, que estão envolvidos na capacidade de enraizamento de uma espécie vegetal, nomeadamente a existência de determinadas combinações genéticas que são mais favoráveis à formação de raízes, ou a presença de mutações que possam limitar este processo (Canhoto 2010). Fatores físicos como o stresse hídrico, elevadas temperaturas, redução da concentração de sais do meio de cultura e utilização de carvão ativado (composto com capacidade adsorvente), têm sido indicados como promotores do enraizamento (Arigita et al. 2010; Canhoto 2010; Silva et al. 2017; Sota & Kongjika 2014; Verma 2012).

4.4.5. Aclimatização

Apesar do processo de micropropagação ser extensamente utilizado para a rápida multiplicação de várias espécies vegetais, a sua utilização é frequentemente restringida devido ao elevado número de mortes e danos do material vegetal, aquando da sua transferência para as condições *ex vitro* (Deb & Imchen 2010). Desta forma, de modo a preparar as plantas para a sua transição para o ambiente externo é fundamental a sua aclimatização (Bhatia & Sharma 2015).

A aclimatização é definida como a adaptação climática ou ambiental de um organismo, especialmente uma planta, a um novo ambiente (Conover & Poole 1984). Nesta fase, a planta torna-se mais resistente ao stresse, humidade e infeções, ocorrendo uma mudança de um ambiente heterotrófico para um regime de autotrofia (Bhatia & Sharma 2015).

As plântulas ou rebentos que são mantidos em condições de crescimento *in vitro* são expostas com continuidade a um único microambiente, selecionado com o objetivo de providenciar condições ótimas para o desenvolvimento da planta, assim como o mínimo de stresse possível (da Silva 2006). Geralmente, as plantas desenvolvem-se dentro de frascos de cultura, sob condições otimizadas e controladas (descritas acima), que conduzem ao desenvolvimento de características fisiológicas e morfológicas diferentes das plantas que crescem em condições *ex vitro* (Chandra et al. 2010; Hazarika 2003). Por exemplo, a ausência de estomas funcionais e a presença uma cutícula fina (que pode levar a que a planta entre em dessecação) (Pospíšilová et al. 1999) e a existência de um sistema radicular frequentemente disfuncional e com os ápices radiculares em geral pouco expostos ao stresse mecânico (o que pode comprometer a absorção de água e nutrientes) (Fila et al. 1998), representam características que contribuem para o insucesso da transferência para o ambiente *ex vitro* (Mathur et al. 2008). Além disso, a baixa intensidade luminosa a que estão expostos os rebentos *in vitro*, promove a mixo/heterotrofia, não estimulando o funcionamento dos cloroplastos (Kozai 1991). Após a transferência das condições *in vitro* para *ex vitro*, as plantas necessitam de corrigir as anomalias supracitadas para garantirem a sua sobrevivência e desenvolvimento em estufa e especialmente no campo onde a intensidade luminosa é muito superior e a humidade relativa é inferior, comparativamente aos frascos de cultura (Pospíšilová et al. 1999).

Na fase de aclimatização recorrendo aos métodos convencionais as plantas são primeiramente retiradas dos frascos de cultura de forma gradual, ocorrendo posteriormente a remoção de todo o agar. As plantas devem ser lavadas em água corrente cuidadosamente, uma vez que os nutrientes e a sacarose podem ser usados como meio para o crescimento de organismos causadores de doenças. Tipicamente, as plantas podem ser também lavadas em solução fungicida (Ehirim et al. 2014; Santos 2016). Posteriormente, estas são transferidas para vários tipos de recipientes preenchidos com diferentes substratos, desde turfa, perlite, solo, vermiculite isolada ou combinada (Clapa 2013). Tradicionalmente, o ambiente de aclimatização *ex vitro* é ajustado de modo a que os níveis de humidade relativa e intensidade luminosa sejam regulados gradualmente, evitando a dissecação e morte das plantas devido a uma grande mudança no ambiente (Kumar & Rao 2012).

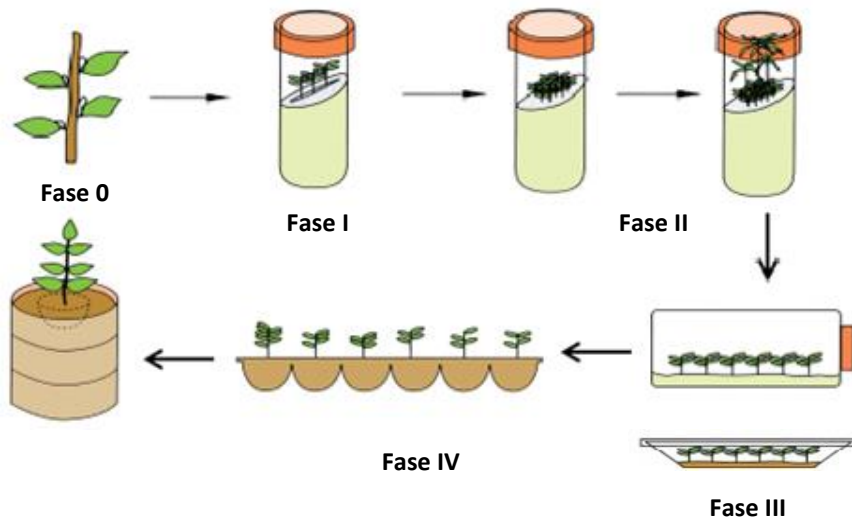


Figura 3: Principais fases de micropropagação (Fase 0, I, II, III e IV). A fase 0, corresponde à seleção do *stock* vegetal, fase I ao estabelecimento da planta *in vitro*, fase II à multiplicação e alongamento, a fase III ao enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* do material aclimatizado na fase IV. Adaptado de Hartman et al. (2011)

4.5. Potencialidades da micropropagação de *Corema album*

Apesar de em *Corema album* a produção de frutos ser bastante abundante, o processo de germinação e a sobrevivência de plântulas e indivíduos jovens não apresenta tanto sucesso, limitando a colonização de novos territórios e, conseqüentemente o rejuvenescimento da população (Lopes 2015). Estas características, associadas à regressão da distribuição da camarinha em muitas áreas dunares tem levado ao interesse no seu estabelecimento como cultura. No entanto, a informação sobre o seu sistema de reprodução é escassa, representando um parâmetro essencial para a sua gestão sustentável e conservação (Oliveira et al. 2016). Neste sentido, a biotecnologia, nomeadamente a otimização de técnicas de cultura *in vitro*, como a micropropagação, surge como um caminho alternativo aos problemas e desafios previamente mencionados.

Várias técnicas de micropropagação como embriogénese somática (Canhoto et al. 1999), organogénese (Arezki et al. 2000) e proliferação de rebentos axilares (Jain & Häggman 2007) têm sido aplicados na propagação *in vitro* de diversas plantas lenhosas. De entre todas estas metodologias, a proliferação de rebentos axilares é a mais frequentemente utilizada na propagação clonal de *Ericaceae* (Gomes & Canhoto 2009). *Arbustus xalapensis* (Mackay 1996), *Kalmia latifolia* (Lloyd & McCown 1980), *Oxydendrum arboreum* (Banko & Stefani 1996), *Rhododendrum* (Anderson 1984) e várias espécies pertencentes ao género *Vaccinium* (Gajdošová et al. 2007; Gomes & Canhoto 2009; Isutsa & Pritts 1994; Ostrolucká et al. 2007), são exemplos de *Ericaceae* micropropagadas com sucesso.

Atualmente, alguns estudos referentes à cultura *in vitro* para o estabelecimento e multiplicação da camarinha demonstram que o meio de cultura MS com os macronutrientes a metade da concentração foi utilizado conjuntamente com a citocinina N⁶-(2-Isopentenil)adenina (2iP) para o estabelecimento desta espécie (Gonçalves & Pinto 2019). No entanto, os melhores resultados em termos de multiplicação foram conseguidos para a utilização do meio de cultura WPM suplementado por 2 mg/L 2iP e 1 mg/L 6-Benzilaminopurina (BAP) (Gonçalves & Pinto 2019).

5. Produção em larga escala: uso e vantagens de biorreatores na produção de plantas

A micropropagação é atualmente aplicada a um grande número de espécies vegetais, no entanto continua a possuir custos de produção elevados devido ao trabalho manual intensivo ao longo das várias fases de cultura. Assim, a automatização e a utilização de culturas líquidas em grande escala para a propagação *in vitro* de plantas, nomeadamente os biorreatores, são essenciais para ultrapassar algumas destas limitações (Paek et al. 2001; Ziv 2005). Os objetivos primordiais da aplicação dos sistemas de biorreatores passam por providenciar condições ótimas de crescimento através da regulação dos parâmetros químicos e físicos, com o intuito de atingir o rendimento e a qualidade máxima dos propágulos, assim como manter os custos de produção reduzidos através da automatização e da integração de aparelhos de baixo custo (Hvoslef-Eide & Preil 2005). Enquanto que, na micropropagação convencional são usados pequenos frascos com um número reduzido de explantes, que requerem uma intensa manipulação e uma grande quantidade de trabalho especializado, os biorreatores utilizam grandes recipientes contendo meio líquido com uma elevada quantidade de explantes, o que diminui a frequência de manipulações (Lima et al. 2012). A produção em escala de plantas através do uso de biorreatores pode ser alcançada através da indução da embriogénese somática (Denchev et al. 1992; Greidziak et al. 1990; Stuart et al. 1987; Terashima & Nishimura 1991) ou através da técnica de multiplicação de rebentos meristemáticos (Hagimori et al. 1984; Katagi et al. 1986; Takayama & Akita 1994; Takayama 1986).

Diversos estudos descreveram a micropropagação em larga escala recorrendo a dois tipos de biorreatores distintos: aqueles em que as culturas estão continuamente submersas no meio, ou aqueles em que as culturas se encontram temporariamente imersas (Ducos et al. 2010). A primeira abordagem consiste no crescimento de tecidos vegetais em vasos de fermentação, que podem ser mecanicamente ou

pneumaticamente agitados (Ducos et al. 2010; Takayama & Akita 1994; Ziv 1991). A segunda abordagem envolve a ocupação de um recipiente com tecidos vegetais, que é periodicamente preenchido com solução nutritiva (Aitken-Christie & Jones 1987; Ducos et al. 2010; Krueger et al. 1981; Tisserat & Vandercook 1985). Apesar da existência de diferentes tipos de biorreatores, a sua eficácia está dependente de parâmetros comuns como o oxigénio dissolvido, a agitação, o pH e a disponibilidade de nutrientes (Paek et al. 2005). É importante ter em consideração que diferentes espécies vegetais e diferentes materiais de propagação apresentam diferentes especificidades quanto ao microambiente no biorreator, sendo necessário selecionar o tipo de biorreator mais apropriado tendo em consideração estas características (Mamun et al. 2015).

5.1. Biorreatores de imersão temporária

Os biorreatores de imersão temporária (BIT) são sistemas automáticos simples, desenhados para providenciarem o melhor ambiente, através da melhoria das transferências gasosas e de nutrientes, assim como da diminuição do stresse mecânico com o intuito de reduzir desordens fisiológicas e preservar a integridade morfológica de culturas vegetais *in vitro* (Steingroewer et al. 2013).

Entre os diferentes tipos de biorreatores, os BIT (figura 4) têm ganho popularidade para a micropropagação de espécies vegetais (Ahmadian et al. 2017; Topoonyanont et al. 2011; Zhang et al. 2019). De uma forma generalizada, estes biorreatores são formados por dois recipientes de vidro ou plástico, em que um deles contém o material vegetal, enquanto o outro armazena o meio de cultura líquido. A transferência do meio para o recipiente que contém o material vegetal ocorre através de um tubo de silicone pela ação da pressão positiva exercida por uma bomba de ar, verificando-se a imersão temporária dos explantes, ocorrendo este processo em intervalos de tempo regulares pré-determinados. Quando o tempo de imersão termina, a bomba de ar é acionada e por ação de uma válvula solenoide o fluxo de ar ocorre na direção oposta, havendo circulação de meio para o outro recipiente. O ar que circula no sistema de biorreatores é esterilizado devido à sua passagem por filtros acoplados aos tubos de silicone (Lima et al. 2012).

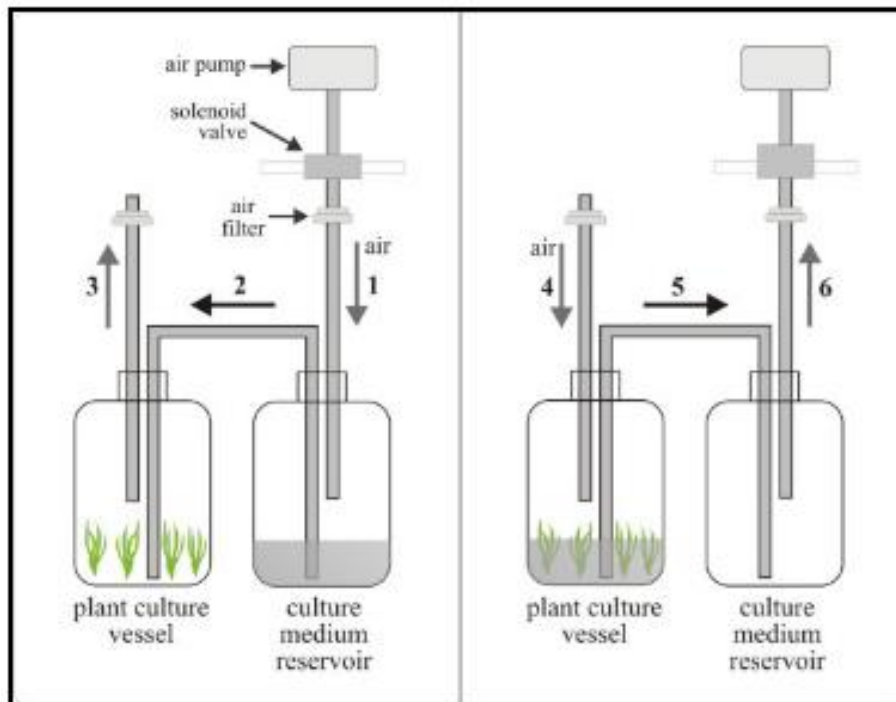


Figura 4: Esquema representativo de um BIT, demonstrado a transferência do meio e o movimento do ar entre o reservatório do meio de cultura e o reservatório contendo o material vegetal. Retirado de: Lima et al. (2012).

6. Análise de estabilidade de ploidia em material micropropagado

6.1. Aplicação da citometria de fluxo à análise de ploidia

A variação somaclonal foi um termo proposto para descrever a variação genética em plantas regeneradas através de métodos de cultura de células e tecidos vegetais (Sahijram 2015). Apesar desta variação apresentar conotações positivas relacionadas com a possibilidade de seleção de novas variantes com resistência a doenças, com melhor qualidade e com maior rendimento (Mehta & Angra 2000; Prediere 2001), uma das maiores finalidades do processo de micropropagação é a obtenção de plantas geneticamente idênticas à planta-mãe, com valores de variação somaclonal aceitáveis (Krishna et al. 2016). Contudo, podem ocorrer mutações devido a alterações na sequência de ácido desoxirribonucleico (ADN) (eg: mutações pontuais) ou no nível de ploidia (eg: euploidia/aneuploidia), sendo estas últimas facilmente detetadas recorrendo a técnicas como a citometria de fluxo.

A citometria de fluxo encontra-se entre os métodos mais comumente utilizados na avaliação da variação somaclonal (Brito et al. 2010), e devido às suas vantagens como um elevado rendimento, precisão e resolução, assim como a destruição negligenciável do material vegetal e baixo custo de manuseamento por amostra, tem substituído

outros métodos utilizados para a determinação do conteúdo genómico/ análise da ploidia em vários laboratórios (Sliwinska 2018; Vrána et al. 2014).

Para além da análise de ploidia e da estimativa do conteúdo de ADN genómico, a citometria de fluxo é utilizada na biotecnologia de plantas para o estudo do ciclo celular, determinação do sexo numa fase prévia do crescimento, análises de genotoxicidade e análises e separação de cromossomas (Loureiro & Santos 2004).

6.2. Princípios da citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia que mede e analisa simultaneamente múltiplas características físicas de partículas individuais (geralmente células) à medida que fluem, através de um feixe de luz (Sacerdoti et al. 2016). Apesar das células serem mais comumente analisadas, outras partículas como núcleos, cromossomas e pequenas moléculas podem também ser estudadas (Givan 2013). Historicamente, o primeiro citómetro de fluxo desenvolvido caracterizava-se como uniparamétrico, detetando apenas o tamanho celular. No entanto, atualmente, instrumentos mais sofisticados são capazes de detetar 14 parâmetros diferentes, simultaneamente (Adan et al. 2017; Wilkerson 2012).

O citómetro de fluxo é um instrumento composto por três partes distintas: fluídica, ótica e eletrónica, possuindo adicionalmente uma componente informática (figura 5) (Doležel et al. 2007). O sistema fluídico do citómetro tem como objetivo primordial posicionar as células (ou partículas) no ponto exato em que o feixe luminoso irá atravessar as células individualmente, sendo este processo denominado de focagem hidrodinâmica (Suthanthiraraj & Graves 2013). Relativamente ao sistema ótico este divide-se em duas partes: ótica de excitação e ótica de emissão. A ótica de excitação é composta por um laser com lentes de foco e prismas, enquanto a ótica de emissão possui lentes, espelhos e filtros que reúnem e direcionam a luz dispersa ou fluorescente para detetores óticos específicos (Gupta et al. 2016; Weaver 2000). Quando as partículas intersectam o feixe de luz, ocorre um processo de dispersão fotónica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade está dependente das características das partículas (Côrte-Real et al. 2002). A terceira parte do citómetro de fluxo, o sistema eletrónico, é responsável pela conversão dos sinais luminosos em dados numéricos, usados nas análises computacionais posteriores (Wilkerson 2012).

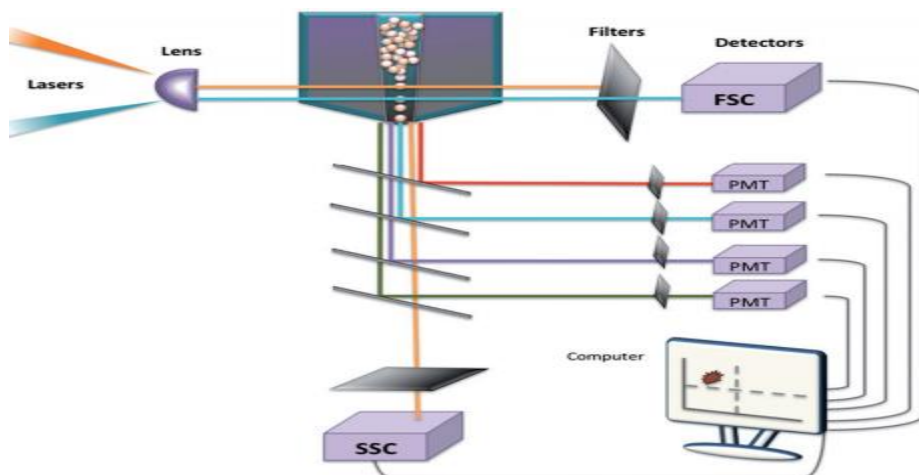


Figura 5: Esquema representativo do princípio básico da citometria de fluxo, evidenciando os três componentes principais de um citômetro de fluxo: componente fluidica, componente ótica e componente eletrônica. Retirado de: Adan et al. (2017).

7. Fisiologia da planta micropropagada: destaque para o estado oxidativo

Além do aspeto/morfologia da planta, também o estudo do processo fotossintético, e/ou do estado oxidativo da planta aclimatizada é crucial para a avaliação do fenótipo e desempenho das plantas micropropagadas. O stresse oxidativo (SO) é definido como o desequilíbrio entre a manifestação sistémica de espécies reativas de oxigénio (ERO) e a capacidade de um sistema biológico eliminar os intermediários reativos ou reparar os danos resultantes (Ozougwu 2016). Situações de stresse abiótico e biótico conduzem a respostas de SO que danificam componentes celulares e os tornam disfuncionais (Demidchik 2015).

O estado fundamental do oxigénio (O_2) é relativamente pouco reativo, no entanto durante os processos metabólicos essenciais e como consequência de exposição a perturbações ambientais como elevados níveis de luminosidade, seca, metais pesados, concentrações elevadas de sais, temperaturas extremas, poluição aérea, radiação ultravioleta, herbicidas e ataques de patógenos (Sharma et al. 2012), o O_2 é capaz de converter-se em estados mais reativos como as ERO (Karuppanapandian et al. 2011; Mittler et al. 2004; Scandalios 2005). As ERO como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o singleto de oxigénio (1O_2) são continuamente geradas em organelos como os cloroplastos, mitocôndria e peroxissomas (Sandalio et al. 2013; Sharma et al. 2012; Singh et al. 2016; Singh et al. 2015; Suzuki et al. 2012), estimando-se que cerca de 1% do O_2 consumido pelas plantas seja convertido em ERO (Asada & Takahashi 1987). Níveis elevados destas moléculas

podem provocar danos nas biomoléculas como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, conduzindo a distúrbios como mudanças na fluidez e permeabilidade da membrana lipídica, aumento da degradação proteolítica e indução de mutações nas bases de ADN (figura 6) (Das & Roychoudhury 2014).

As ERO apresentam um papel duplo na biologia de plantas, uma vez que representam subprodutos tóxicos resultantes do metabolismo aeróbico, mas são essenciais para muitas reações importantes de sinalização (Mittler 2016). Diversos estudos demonstram que nas plantas vasculares, as ERO são responsáveis por regular o desenvolvimento, diferenciação, reações redox, sinalização de stresse, interações com outros organismos, respostas sistémicas e morte celular (Foyer & Noctor 2013; König et al. 2012; Mittler 2016; Mittler et al. 2011; Vaahtera et al. 2014)

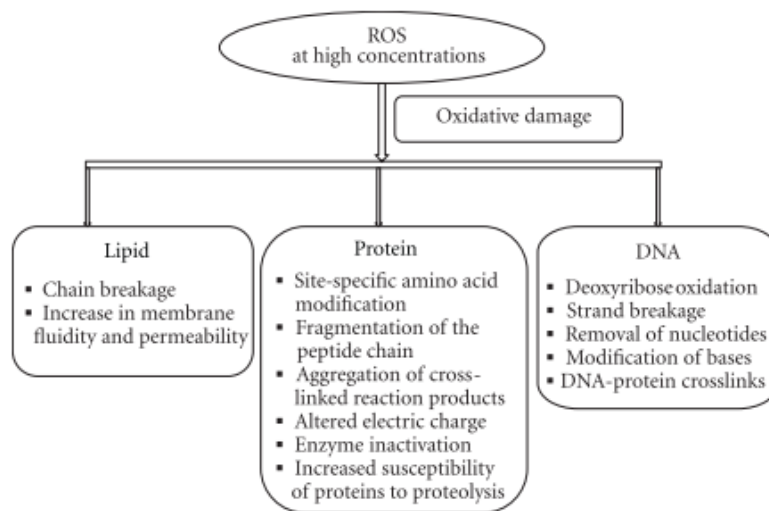


Figura 6: Efeito da concentração elevada de ERO ao nível dos lípidos, proteínas e ADN. Retirado de: Sarma et al. (2012)

7.1. Produção de espécies reativas de oxigénio

O $O_2^{\cdot -}$ é geralmente a primeira ERO a ser formada e é moderadamente reativo, com uma meia-vida reduzida (Jajic et al. 2015). Nos tecidos vegetais, o anião superóxido é maioritariamente produzido nas mitocôndrias e nos cloroplastos, sendo os complexos I e III os principais locais de produção nas mitocôndrias (Møller 2001; Raha & Robinson 2000; Rhoads et al. 2006; Sweetlove et al. 2002), enquanto que o fotossistema I e II são responsáveis pela principal produção de $O_2^{\cdot -}$ na membrana tilacoidal (Dražkiewicz et al. 2014; Smirnov 1993). Nos peroxissomas, o anião superóxido é maioritariamente produzido na matriz do peroxissoma, através da ação da enzima xantina oxidase (Corpas et al. 2008; Sandalio et al. 1988) e através da cadeia transportadora de eletrões na membrana peroxissomal (del Río & Donaldson 1995).

O H_2O_2 é uma das ERO mais estudados por parte da comunidade científica, devido à sua importância, quer nos mecanismos de sinalização, quer nos mecanismos de toxicidade (Mhamdi & Van Breusegem 2018). O facto desta molécula apresentar uma meia vida superior comparativamente às outras ERO, associada ao seu pequeno tamanho e à falta de eletrões desemparelhados, permitem-lhe atravessar as membranas e enviar sinais, assim como causar dano oxidativo em regiões distantes do seu local de formação (Sharma et al. 2012). Nas plantas, o H_2O_2 pode ser produzido através de duas vias distintas: dismutação do $O_2^{\cdot-}$ com o envolvimento da superóxido dismutase (SOD) (Asada 2006) ou via oxidases como as amino ou oxalato oxidases (Hu et al. 2003). Apesar desta molécula estar envolvida na sinalização de diversos processos celulares, em concentrações demasiado elevadas pode causar dano oxidativo.

O OH^{\cdot} é a molécula mais reativa e mais tóxica pertencente às ERO. Apesar da sua elevada reatividade, os radicais hidroxilo são extremamente instáveis e não se movem para longe do seu local de formação (Tuteja et al. 2009). A sua principal via de formação é a reação de Fenton, que ocorre entre o H_2O_2 e o $O_2^{\cdot-}$ e é catalisada por metais de transição como o ferro (Das & Roychoudhury 2014). Esta ERO tem a capacidade de danificar diferentes componentes celulares através da peroxidação lipídica, dano proteico e destruição membranar (Das & Roychoudhury 2014; Demidchik 2015). De facto, as propriedades destrutivas associadas ao H_2O_2 e ao $O_2^{\cdot-}$ estão maioritariamente relacionadas com o seu papel na produção do radical hidroxilo e não com o seu efeito direto (Imlay & Linn 1988).

Por último, o 1O_2 é uma ERO menos comum, uma vez que em geral não está relacionado com a transferência de eletrões para o O_2 , mas preferencialmente com a insuficiente dissipação de energia. A sua formação durante a fotossíntese é um dos casos mais estudados, onde o excesso de energia leva à formação de clorofila em estado de tripleto que pode reagir com 3O_2 e originar o singleto de oxigénio (Gill & Tuteja 2010). Apesar de possuir uma meia vida bastante reduzida (Hatz et al. 2007), esta molécula é altamente reativa, consegue difundir-se e causar dano numa grande variedade de alvos, incluindo proteínas, pigmentos, ácidos nucleicos e lípidos (Krieger-Liszka et al. 2008; Wagner et al. 2004). A eliminação do singleto de oxigénio é mediada pelo β -caroteno, tocoferol, flavonoides e plastoquinona reduzida (Demidchik 2015).

Apesar da formação das espécies reativas de oxigénio ocorrer sobretudo ao nível dos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas, a membrana plasmática, apoplasto,

retículo endoplasmático e parede celular também contribuem para esta produção (Sharma et al. 2012).

7.2. Eliminação de espécies reativas de oxigénio

O equilíbrio entre a produção e eliminação de ERO ao nível intracelular deve ser altamente regulado, uma vez que é necessário evitar o dano causado pelas espécies reativas de oxigénio nos componentes celulares, garantindo simultaneamente o crescimento, metabolismo, desenvolvimento e produtividade global das plantas (Mittler et al. 2004; Mittler 2002). Este equilíbrio é assegurado pela existência de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (tabela 3) (Noctor & Foyer 1998), que atuam como dadores de eletrões, reduzindo as ERO em moléculas menos perigosas e com menor reatividade (Racchi 2013). Os antioxidantes enzimáticos incluem componentes como a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) e a catalase (CAT), enquanto que os compostos não enzimáticos de baixo peso molecular incluem o ascorbato (AsA), glutathiona reduzida (GSH), α -tocoferol, carotenoides e compostos fenólicos (Das & Roychoudhury 2014; Gill et al. 2011; Gill & Tuteja 2010; Miller et al. 2010).

7.2.1. Antioxidantes enzimáticos

As SOD são os antioxidantes enzimáticos intracelulares mais efetivos, ubíquos em todos os organismos aeróbios e em todos os compartimentos subcelulares propensos ao SO provocado pelas ERO (Apel & Hirt 2004; Gill & Tuteja 2010). Estas enzimas atuam na primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigénio através da dismutação do superóxido em oxigénio molecular e peróxido de hidrogénio. Este último deve ser posteriormente destruído pela CAT ou/e pelas peroxidases, assim como por outros mecanismos não enzimáticos (Racchi 2013). De acordo com o co-fator metálico presente no local catalítico podem distinguir-se três classes distintas de SODs: Cu/ZnSOD, MnSOD e FeSOD. Geralmente, as plantas contêm SODs do tipo CU/ZnSODs no citosol e nos cloroplastos e possivelmente no espaço extracelular, FeSODs nos cloroplastos e MnSODs na matriz mitocondrial e nos peroxissomas (Racchi 2013; Scandalios 2005).

A CAT é uma enzima largamente, mas não exclusivamente produzida nos peroxissomas, que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio (Racchi 2013). A principal função da catalase é evitar a dispersão do H_2O_2 para outros compartimentos celulares, impedindo a sua reação com iões metálicos e subsequente formação de radicais hidroxilo altamente reativos (Bettini et al. 2008; Dat et al. 2000; del

Río et al. 2002). As catalases presentes nas plantas podem classificar-se em três classes distintas: catalases da classe I, maioritariamente proeminentes dos tecidos fotossintéticos e envolvidas na remoção do H_2O_2 produzido durante a fotorrespiração; as catalases da classe II, altamente produzidas nos tecidos vasculares, podendo apresentar um papel importante no processo de lenhificação, embora o seu exato papel biológico permaneça desconhecido e as catalases da classe III, abundantes nas sementes e em plantas jovens, estando a sua atividade relacionada com a remoção do excesso de peróxido de hidrogénio produzido durante a degradação dos ácidos gordos no ciclo do glioxilato nos glioxissomas (Ahmad et al. 2010; Willekens et al. 1994).

A APX utiliza o ascorbato (AsA) como dador de eletrões para a redução de H_2O_2 em água, gerando simultaneamente monodehidroascorbato (MDHA), um oxidante univalente do ascorbato. O MDHA é espontaneamente convertido em AsA e dehidroascorbato (DHA). A DHA redutase (DHAR) utiliza a glutathiona (GSH) como dadora de eletrões para a regeneração de AsA para a sua forma oxidada. (Racchi 2013). Assim, é necessária a manutenção de níveis elevados de ascorbato para o funcionamento viável desta enzima (Shigeoka et al. 2002). Diferentes isoenzimas de APX já foram identificadas nas células vegetais: citosólica (Ishikawa et al. 1995), peroxissomal (Ishikawa et al. 1998), cloroplastidial (Ishikawa et al. 1996) e mitocondrial (De Leonardis et al. 2000). A isoenzima citosólica APX tem sido considerada uma das mais importantes na defesa contra o H_2O_2 , pois devido à sua localização celular é a primeira a receber os sinais produzidos durante o stresse, atuando rapidamente com o intuito de prevenir danos celulares/todo o tecido (Ceron-Garcia et al. 2012).

A GPX é uma enzima contendo um grupo heme, que preferencialmente oxida dadores aromáticos como o guaiacol e o piragalol, através do gasto de H_2O_2 (Erofeeva 2015; Sharma et al. 2012). As GPXs para além de estarem associadas com muitos processos biossintéticos importantes, apresentam também um papel central na defesa contra o stresse biótico e abiótico, sendo vastamente reconhecidas como “enzimas do stresse” (Haag 2019).

7.2.2. Antioxidantes não enzimáticos

O ascorbato (AsA) é o composto antioxidante mais abundante e mais extensamente estudado, sendo detetado na maioria das células vegetais e no apoplasto (Horemans et al. 2000; Smirnoff 1993). O AsA tem uma elevada capacidade de doar eletrões para uma ampla gama de reações enzimáticas e não enzimáticas (Das & Roychoudhury 2014). Este atua sobretudo como redutor e elimina vários tipos de radicais livres. Indiretamente, duas moléculas de AsA são utilizadas pela APX no ciclo

do ascorbato-glutationa, de forma a reduzir o peróxido de hidrogénio em água (Ahmad et al. 2010). Diretamente, o AsA pode ainda eliminar os radicais superóxido e hidroxilo e regenerar os corotenoides oxidados ou α -tocoferol, providenciando proteção membranar e minimizando os danos causados pelo processo oxidativo através da sinergia com outros antioxidantes (Gill and Tuteja 2010; Racchi 2013).

O α -tocoferol é um antioxidante lipofílico que, conjuntamente com outros antioxidantes, desempenha um papel fundamental na redução dos níveis de ERO (maioritariamente $^1\text{O}_2$ e OH^{\cdot}) nas membranas fotossintéticas e limita a extensão de peroxidação lipídica, através da redução dos radicais peroxil aos respetivos hidroperóxidos (Munné-Bosch 2005). A principal função atribuída ao α -tocoferol é o seu envolvimento em diversos mecanismos que protegem os ácidos gordos polinsaturados da oxidação (Ledford & Niyogi 2005).

Em todos os organismos fotossintéticos, tal como o α -tocoferol, os carotenoides apresentam uma função fotoprotetora vital, através da dissipação do excesso de energia de excitação sob a forma de calor, ou através da eliminação de ERO, suprimindo a peroxidação lipídica (Iqbal et al. 2017). O β -caroteno apresenta-se como um excelente agente na remoção de singletos de oxigénio.

O tripéptido glutaciona é um antioxidante de baixo peso molecular, detetado em compartimentos celulares como o citosol, cloroplastos, reticulo endoplasmático, vacúolos mitocôndrias, peroxissomas e apoplasto (Noctor & Foyer 1998; Roy 2017). A glutaciona reduzida é considerada o tiol mais importante contra os danos oxidativos, atuando como um redutor dissulfito e protegendo o grupo tiol das proteínas (-SH), regenerando o ascorbato e atuando como substrato das enzimas importantes como as glutaciona peroxidases e glutaciona S-transferases (Labudda & Azam 2014).

Os compostos fenólicos representam o grupo mais importante de antioxidantes naturais (Gonçalves et al. 2017; Huyut et al. 2017). A sua atividade antioxidante encontra-se primeiramente atribuída às suas propriedades redox, que lhes permitem atuar como supressores dos singletos de oxigénio, agentes redutores e dadores de hidrogénio (Bhuyan & Basu 2017; Galleano et al. 2010; Gharekhani et al. 2012; Rice-Evans et al. 1996).

Tabela 3: Principais antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos utilizados na eliminação de ERO, com informação relativa à sua função e localização subcelular. Retirado de: Das & Roychoudhury (2014).

Enzymatic antioxidants	Enzyme code	Reaction catalyzed	Subcellular location
Superoxide dismutase (SOD)	1.15.1.1	$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$	Peroxisomes, Mitochondria, Cytosol, and Chloroplast
Catalase (CAT)	1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Peroxisome and Mitochondria
Ascorbate peroxidase (APX)	1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$	Peroxisomes, Mitochondria, Cytosol, and Chloroplast
Monodehydroascorbate reductase (MDHAR)	1.6.5.4	$2MDHA + NADH \rightarrow 2AA + NAD$	Mitochondria, Cytoplasm, and Chloroplast
Dehydroascorbate reductase (DHAR)	1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$	Mitochondria, Cytoplasm, and Chloroplast
Glutathione reductase (GR)	1.6.4.2	$GSSG + NADPH \rightarrow 2GSH + NADP^+$	Mitochondria, Cytoplasm, and Chloroplast
Guaiacol peroxidase (GPX)	1.11.1.7	$H_2O_2 + DHA \rightarrow 2H_2O + GSSG$	Mitochondria, Cytoplasm, Chloroplast, and ER
Non-enzymatic Antioxidants		Function	Subcellular location
Ascorbic Acid (AA)		Detoxifies H_2O_2 via action of APX	Cytosol, Chloroplast, Mitochondria, Peroxisome, Vacuole, and Apoplast
Reduced Glutathione (GSH)		Acts as a detoxifying co-substrate for enzymes like peroxidases, GR and GST	Cytosol, Chloroplast, Mitochondria, Peroxisome, Vacuole, and Apoplast
α -Tocopherol		Guards against and detoxifies products of membrane LPO	Mostly in membranes
Carotenoids		Quenches excess energy from the photosystems, LHCs	Chloroplasts and other non-green plastids
Flavonoids		Direct scavengers of H_2O_2 and 1O_2 and OH^\bullet	Vacuole
Proline		Efficient scavenger of OH^\bullet and 1O_2 and prevent damages due to LPO	Mitochondria, Cytosol, and Chloroplast

Objetivos

É crescente o interesse no desenvolvimento de protocolos robustos para produção em larga escala de espécies subvalorizadas, quer para alimentação (eg: frutos), quer como fonte de produtos de interesse para a indústria farmacêutica. A espécie autóctone *Corema album* tem despertado cada vez mais atenção pelos seus frutos e pelas suas potencialidades medicinais, associadas ao caráter antioxidante das suas folhas e frutos. Contudo, vários fatores têm colocado em risco as populações naturais desta espécie. Assim sendo,

O primeiro objetivo desta dissertação centra-se no desenvolvimento e otimização de um protocolo robusto de micropropagação (até à aclimatização), que permita a regeneração não convencional das populações de camarinha;

O segundo objetivo foca-se na análise da instabilidade genética (face ao nível de ploidia) das plantas obtidas através do protocolo de micropropagação após a fase de aclimatização. Para tal, recorrer-se-á à técnica de citometria de fluxo para a comparação da ploidia e quantidade de ADN (pg/2C) entre as plantas micropropagadas e as plantas de campo de *Corema album*.

O terceiro objetivo relaciona-se com a avaliação do estado oxidativo das plantas micropropagadas, que será realizada através de um estudo comparativo entre as plantas de campo e as plantas micropropagadas (aclimatizadas), com principal destaque para as vias de eliminação de ERO, evidenciando se plantas da mesma espécie, mas de origens distintas (zigótica vs micropropagada) apresentam atividades semelhantes ao nível dos mecanismos antioxidantes.

Materiais e Métodos

1. Micropropagação

1.1. Material vegetal

Para os ensaios posteriores recorreu-se a um *stock* de *Corema album* estabelecido no âmbito de um projeto de dissertação anterior. O material vegetal pré-existente foi recolhido na zona dunar da Praia de São Jacinto, no distrito de Aveiro, coordenadas 40°43'5.18"N, 8°43'20.42"W (figura 7), estabelecido *in vitro* e transferido para meio de multiplicação (meio WPM suplementado por 2 mg/L 2iP + 1 mg/L BAP). O número de subculturas deste material vegetal é igual a 5.



Figura 7: Planta feminina de *Corema album* em período de frutificação, representativa do local onde o material vegetal foi recolhido.

1.2. Aumento e manutenção da população *stock* de *Corema album*

Com o intuito de assegurar a disponibilidade de material vegetal para os ensaios posteriores, aumentou-se a população *stock* de camarinha através da sua multiplicação. Para tal, recorreu-se à formulação do meio de cultura que mais se adequou à multiplicação de *Corema album*: WPM (tabela 4). O meio foi ainda suplementado com 1 mg/L BAP, 2 mg/L 2iP, sacarose (30 g/L) e agar (7 g/L) como agente gelificante. O pH foi ajustado para valores entre 5,7-5,8, antes da adição do agar. Após a distribuição do meio em frascos de cultura (50 mL cada), os mesmos foram esterilizados por autoclavagem a uma temperatura de 121°C, pressão de 1,2 atm durante 20 minutos. Após a gelificação do meio à temperatura ambiente, o manuseamento do material vegetal e a sua inoculação ocorreu em ambiente estéril, dentro da câmara de fluxo laminar e com o auxílio de algum material de apoio como placas de Petri, pinças e bisturis (previamente esterilizado em estufa de calor seco a 180°C, durante 3 horas).

Em cada frasco de cultura foram colocados 10 rebentos axénicos, sem remoção da porção apical e com um comprimento entre 10-15 mm. Durante a manipulação dentro da câmara de fluxo laminar, as pinças e os bisturis foram esterilizados através de um

esterilizador de bancada com esferas de vidro (Steri) que atingem temperaturas de 250°C. Finalizado o processo de inoculação, as culturas foram transferidas para câmara climatizada com temperatura de 25°C dia e 22°C noite, sob uma intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão. O desenvolvimento do material vegetal foi monitorizado ao longo do tempo, sendo removidos frascos que apresentassem qualquer tipo de contaminação. Para além disso, foi feita a manutenção do material vegetal através de subculturas periódicas para novo meio de cultura com as condições acima descritas.

Tabela 4: Formulação do meio WPM (Lloyd & McCown 1980), com informação relativa aos seus constituintes e respetivas concentrações.

Constituintes	mg/L	Solução Stock	
		1000 mL	500 mL (g, x 10)
Macronutrientes			
CaCl ₂	72,5	0,725	0,363
NH ₄ NO ₃	400,00	4,0	2,0
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	471,26	4,71	2,355
MgSO ₄	180,54	1,81	0,905
KH ₂ PO ₄	170,00	1,7	0,85
K ₂ SO ₄	990,00	9,9	4,95
Micronutrientes			
			(g, x 100)
FeNaEDTA	36,70	0,37	0,185
MnSO ₄ .H ₂ O	22,30	2,3	1,15
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	0,86	0,43
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	0,025	0,0125
H ₃ BO ₃	6,20	0,620	0,31
MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O	0,25	0,025	0,0125
Vitaminas			
m-Inositol	100,00	10	5
Tiamina.HCl	1,00	-	-
Ácido nicotínico	0,50	-	-
Glicina	2,00	-	-
Piridoxina-HCl	0,50	-	-

1.3. Ensaios de multiplicação *in vitro*

1.3.1. Multiplicação em meio de cultura gelificado

Para a identificação da melhor condição de multiplicação em meio gelificado utilizou-se material vegetal proveniente da cultura *stock*. Neste ensaio, o meio WPM foi suplementado por combinações de duas citocininas: 1) 2iP+BAP, 2) 2iP+meta-topolina (mT) e 3) 2iP+Cinetina (Cin), nas concentrações apresentadas na tabela 5, com a exceção do tratamento controlo onde não foi adicionado qualquer regulador de

crescimento. A sacarose e agar foram adicionados ao meio de cultura nas concentrações de 30 g/L e 7 g/L, respetivamente.

Tabela 5: Representação das diferentes condições de multiplicação, com informação relativa à combinação dos reguladores de crescimento e respetivas concentrações. A verde está assinalada a combinação de reguladores de crescimento usada até ao momento para a multiplicação de *Corema album*: 2 mg/L 2iP + 1 mg/L BAP.

Tratamento	2iP (mg/L)	BAP (mg/L)	mT (mg/L)	Cin (mg/L)
T0				
T1	1,0	0,5		
T2	1,0	1,0		
T3	1,0	2,0		
T4	1,0		0,5	
T5	1,0		1,0	
T6	1,0		2,0	
T7	1,0			0,5
T8	1,0			1,0
T9	1,0			2,0
T10	2,0	0,5		
T11	2,0	1,0		
T12	2,0	2,0		
T13	2,0		0,5	
T14	2,0		1,0	
T15	2,0		2,0	
T16	2,0			0,5
T17	2,0			1,0
T18	2,0			2,0
T19	4,0	0,5		
T20	4,0	1,0		
T21	4,0	2,0		
T22	4,0		0,5	
T23	4,0		1,0	
T24	4,0		2,0	
T25	4,0			0,5
T26	4,0			1,0
T27	4,0			2,0

A elaboração dos meios de cultura seguiu o procedimento previamente descrito em 1.2., com acerto do pH para valores entre 5,7-5,8, dissolução do agar em placa de aquecimento, seguido de esterilização do meio por autoclavagem.

Para cada tratamento foram utilizados 5 frascos de cultura (50 mL cada), cada um inoculado com sete rebentos axilares com um comprimento entre 10-15 mm e sem remoção da porção apical, perfazendo um total de 35 rebentos por cada uma das condições estudadas (figura 8).

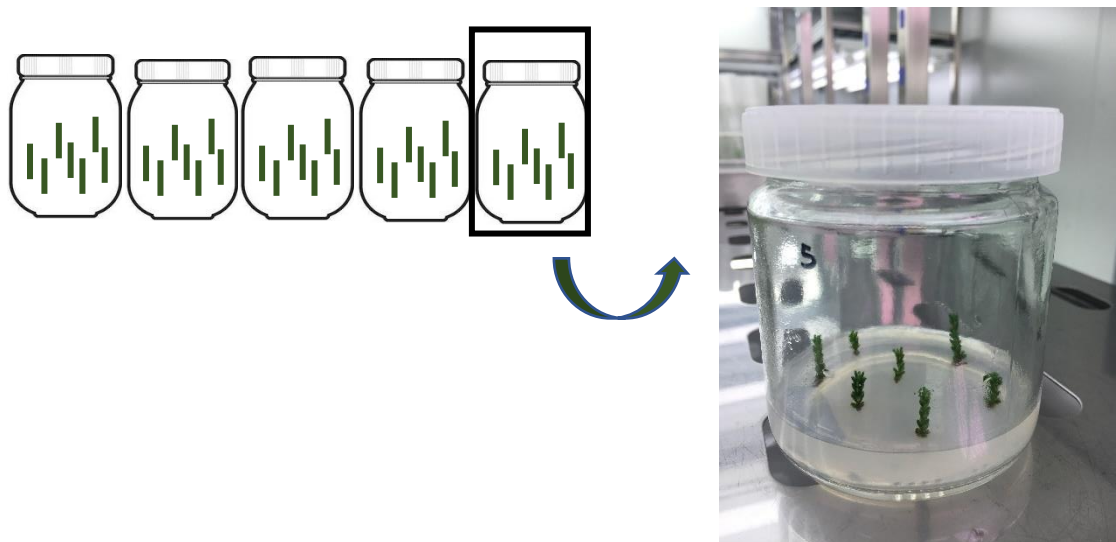


Figura 8: Esquema representativo das diferentes condições de multiplicação. Cada condição é representada por 5 frascos, cada um contendo 7 rebentos, totalizando 35 rebentos por tratamento.

Concluída a inoculação, o material vegetal foi armazenado em câmara climatizada nas condições descritas anteriormente para a população *stock*.

Com o intuito de determinar qual o melhor tratamento em termos de multiplicação, foram realizadas duas subculturas, com a duração de 60 dias cada, com avaliação de alguns parâmetros intermédios, nomeadamente a capacidade de indução de novos rebentos (%), formação de novos rebentos (>5mm), o comprimento dos rebentos (mm) e taxa de mortalidade (%) e contaminação (%). Para além disso, registaram-se ainda características qualitativas como o nível de oxidação dos rebentos e a ocorrência de hiperhidricidade.

1.3.2. Multiplicação em biorreatores de imersão temporária

Para a identificação das melhores condições de multiplicação em BIT, utilizaram-se rebentos axilares provenientes da população *stock* com tamanho compreendido entre 10-15 mm. Neste ensaio, pretendeu-se avaliar a influência da adição de citocinininas, da frequência e duração do período de imersão e arejamento, assim como da presença ou ausência de rede nos biorreatores na multiplicação dos rebentos (tabela 6). Para tal, o meio de cultura utilizado foi o meio WMP, suplementado com sacarose 30 g/L, com adição dos reguladores de crescimento 2iP+BAP nas concentrações 2 mg/L +1 mg/L, ou sem adição de qualquer regulador de crescimento (dependendo do tratamento).

Após a elaboração do meio de cultura e ajuste do pH entre 5,7-5,8, este foi transferido para o recipiente do biorreator destinado ao armazenamento do mesmo. Antes da autoclavagem nas condições já mencionadas, colocou-se papel de alumínio

em ambos os depósitos do biorretor na zona de ligação dos tubos de silicone. Os filtros e os tubos, previamente embrulhados em papel de alumínio, foram também autoclavados conjuntamente com os depósitos. Após o período de autoclavagem, os filtros e tubos de silicone foram colocados em estufa a 60°C para a remoção do excesso de água.

Antes da inoculação do material vegetal, procedeu-se à montagem do sistema de biorreatores. Em ambiente estéril em câmara de fluxo laminar, procedeu-se à ligação dos filtros a cada um dos depósitos de birreatores, assim como à ligação de ambos os depósitos através da utilização de tubos de silicone. Posteriormente, o material vegetal foi inoculado (40 rebentos por tratamento) e colocado na câmara de crescimento em prateleiras especializadas para a ligação de biorreatores. A frequência e duração do período de imersão e arejamento foram definidos e controlados automaticamente através do *software* de gestão de sistema de biorreatores de imersão temporária modelo SETIS™ (<https://setis-systems.be/home>). As condições de temperatura, luminosidade e fotoperíodo são as mesmas já descritas para a multiplicação em frasco de cultura.

Ao fim de 60 dias, quantificaram-se os parâmetros indução de rebentos (%), número de novos rebentos formados (>5mm), comprimento dos rebentos (mm), assim como a taxa de mortalidade (%) e taxa de contaminação (%). Para além disso, registou-se também o nível de oxidação e existência de hiperhidricidade e massas de vitrificação.

Tabela 6: Representação das diferentes condições de multiplicação em sistemas BIT, com informação relativa à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, duração e frequência do período de imersão e arejamento e presença ou ausência de rede.

Tratamento	2 mg/L 2iP + 1 mg/L BAP	Imersão	Arejamento	Presença de rede
T0	Não	2' a cada 6h	1' a cada 3h	Sim
T1	Sim	2' a cada 6h	1' a cada 3h	Sim
T2	Não	3' a cada 12h	1' a cada 4h	Sim
T3	Sim	3' a cada 12h	1' a cada 4h	Sim
T4	Não	3' a cada 8h	30'' a cada 8h	Sim
T5	Sim	3' a cada 8h	30'' a cada 8h	Sim
T6	Não	3' a cada 8h	30'' a cada 8h	Não
T7	Sim	3' a cada 8h	30'' a cada 8h	Não

1.4. Ensaios de enraizamento

Com o intuito de identificar a melhor condição de enraizamento para *Corema album*, e uma vez que na literatura não há informações relativas à fase de enraizamento desta espécie, foram realizados ensaios de enraizamento em condições *in vitro* e *ex vitro*.

Tendo em consideração a proveniência dos rebentos utilizados nos ensaios de enraizamento (1.2.) e devido à possível habituação às citocininas, estes foram colocados durante 15 dias em meio WPM sem adição de qualquer regulador de crescimento, suplementado com sacarose (20 g/L) e agar (7 g/L), tal como proposto na literatura (Anwar et al. 2008; Dewir et al. 2016). Após a preparação do meio de cultura (de acordo com o descrito anteriormente), este foi distribuído em frascos de cultura de 50 mL e autoclavado. O manuseamento do material em câmara de fluxo laminar ocorreu conforme o supracitado. Finalizada a inoculação, o material vegetal foi armazenado em câmara climatizada nas mesmas condições de cultura da fase de multiplicação, durante duas semanas com monitorização regular.

1.4.1. Enraizamento *in vitro*

Primeiro ensaio de enraizamento *in vitro*

No primeiro ensaio de enraizamento *in vitro*, estudou-se a influência da utilização de reguladores de crescimento (auxinas) individualizados ou combinados, nas concentrações apresentadas na tabela 7. Utilizaram-se duas modalidades distintas: 1) exposição de longa duração por cultura do rebento em meio contendo auxina; 2) choque auxínico por imersão (*dipping*) do rebento em auxina previamente esterilizada através de filtração, seguida da sua transferência para meio de cultura sem reguladores de crescimento. Para o tratamento controlo não foi feita qualquer indução com auxina. O meio de cultura utilizado para o ensaio de enraizamento foi o WPM com os macronutrientes reduzidos para metade da sua concentração, suplementado de sacarose e agar nas concentrações de 20 g/L e 7 g/L, respetivamente. Cada um dos tratamentos foi representado por 30 rebentos individualizados com tamanho entre 20-25 mm.

O manuseamento do material vegetal foi realizado em câmara de fluxo laminar, com os mesmos cuidados já mencionados nas metodologias anteriores. Após a inoculação do material vegetal, as culturas foram transferidas para a câmara climatizada nas condições de luminosidade de 17 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, com fotoperíodo de 16 horas dia e 8 horas noite e temperatura de 25°C dia e 22°C noite.

A avaliação do ensaio de enraizamento ocorreu 60 dias após o início do mesmo e os parâmetros avaliados foram a % de indução radicular, o número de raízes por rebento, comprimento radicular (mm) e o comprimento do rebento (mm). Para além disso, registou-se também a ocorrência de mortalidade e contaminação, assim como a oxidação e o aparecimento de tecido caloso.

Tabela 7: Representação das diferentes condições de enraizamento *in vitro*, com informação relativa à modalidade de enraizamento, auxinas utilizadas e respetivas concentrações.

Tratamento	Modalidade	ANA (mg/L)	AIB (mg/L)	AIB (mg/L)
T0	Controlo			
T1	Auxina no meio	1,0		
T2	Auxina no meio	2,0		
T3	Auxina no meio		1,0	
T4	Auxina no meio		2,0	
T5	<i>Dipping in vitro</i> 1 minuto	1000,0		
T6	<i>Dipping in vitro</i> 2 minutos	1000,0		
T7	<i>Dipping in vitro</i> 1 minuto		1000,0	
T8	<i>Dipping in vitro</i> 2 minutos		1000,0	
T9	Auxina no meio			1,0
T10	Auxina no meio			2,0
T11	Auxina no meio		0,5	0,5
T12	Auxina no meio		1,0	0,5
T13	Auxina no meio		2,0	0,5
T14	Auxina no meio		0,5	1,0
T15	Auxina no meio		1,0	1,0
T16	Auxina no meio		2,0	1,0
T17	Auxina no meio		0,5	2,0
T18	Auxina no meio		1,0	2,0
T19	Auxina no meio		2,0	2,0

Segundo ensaio de enraizamento *in vitro*

Tendo em consideração os resultados obtidos no primeiro ensaio de enraizamento *in vitro*, foi desenvolvido um segundo ensaio com o intuito de conseguir melhores taxas de enraizamento.

Este ensaio ocorreu em duas fases distintas: 1) indução radicular e 2) expressão radicular. Na primeira fase, o meio de cultura (WPM com os macronutrientes a metade da concentração, sacarose 20 g/L e agar 7 g/L) foi suplementado com o regulador de crescimento AIB em duas concentrações distintas: 3 mg/L ou 5 mg/L (ou não ocorreu adição de AIB, dependendo do tratamento) e posteriormente os rebentos inoculados foram transferidos para câmara climatizada com temperatura de 25°C dia e 22°C noite e condições de luminosidade variáveis consoante o tratamento (nota: para os tratamentos cuja indução radicular ocorreu na presença de luz, a intensidade luminosa foi de 17 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, com fotoperíodo de 16 horas dia e 8 horas noite). Após o período de indução de 5 dias, o material vegetal foi transferido para tubos de ensaio, para a expressão radicular (segunda fase). O meio de cultura utilizado foi o WPM com os macronutrientes a metade da sua concentração, sacarose e agar nas concentrações já referidas, sem

adição de qualquer regulador de crescimento. Em alguns tratamentos o meio de cultura foi suplementado por carvão ativado (CA) na concentração de 1,5%. Após a inoculação do material vegetal, este foi armazenado em câmara climatizada com temperatura de 25°C dia e 22°C noite, condições de luminosidade 17 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16h dia e 8h noite. Os diferentes tratamentos encontram-se representados na tabela 8.

Cada um dos tratamentos foi representado por um número de rebentos individualizados igual a 30, de comprimento entre 20-25mm e 60 dias após o início do tratamento foram avaliados os parâmetros já referidos para o primeiro ensaio.

Tabela 8: Representação das diferentes condições de enraizamento *in vitro*, com informação relativa à fase de indução e à fase de expressão radicular. U8

Tratamento	Fase de indução (5 dias)		Fase de expressão
	AIB (mg/L)	Condição	Condição
T0	0,0	Luz	Luz
T1	3,0	Luz	Luz
T2	5,0	Luz	Luz
T3	0,0	Luz	CA, Luz
T4	3,0	Luz	CA, Luz
T5	5,0	Luz	CA, Luz
T6	0,0	Escuro	Luz
T7	3,0	Escuro	Luz
T8	5,0	Escuro	Luz
T9	0,0	Escuro	CA, Luz
T10	3,0	Escuro	CA, Luz
T11	5,0	Escuro	CA, Luz

1.4.2. Enraizamento *ex vitro* e pré-aclimatização

Para além dos ensaios de enraizamento *in vitro* foram também testadas algumas condições distintas de enraizamento *ex vitro*.

Neste ensaio foi estudada a influência da utilização do regulador de crescimento AIB em concentrações distintas e combinadas com dois substratos diferentes na capacidade de enraizamento dos rebentos (tabela 9). Os substratos utilizados foram os *jiffys* e a mistura de perlite e vermiculite (P+V). As concentrações estudadas foram: 0,2% (AIB em solução), 0,3% (AIB em gel), 0,4% (AIB em solução), 0,5% (AIB em pó) e 1% (AIB em pó).

Para a utilização dos *jiffys* (constituídos por 60% turfa + 40% fibras de coco) foi necessário o seu embebedimento em água desionizada durante alguns minutos, com o intuito de ganharem volume e se tornarem utilizáveis. No caso da mistura de perlite e vermiculite esta foi usada na proporção 1:1 (v:v), autoclavada nas mesmas condições dos meios de cultura e distribuída em caixas de esferovite (60x40x15 cm).

Relativamente aos rebentos utilizados, para além da eliminação do excesso de agar, ocorreu também a remoção de uma pequena porção basal do material vegetal, com o intuito de se criar uma superfície de contacto. Para além disso, eliminou-se também a folhagem do cm basal que iria estar em contacto com o regulador de crescimento e subsequentemente com o substrato. No caso das modalidades de controlo, após este processo os rebentos foram diretamente transferidos para o respetivo substrato, enquanto que nas restantes modalidades antes da transferência para os substratos adequados, a sua porção basal foi colocada em contacto com o regulador de crescimento durante 10 segundos. Cada um dos tratamentos foi representado por 30 rebentos individualizados com comprimentos compreendidos entre 20-25 mm. Após 60 dias do início do ensaio os parâmetros avaliados foram os já descritos para o enraizamento *in vitro*.

A fase de pré-aclimatização ocorreu em simultâneo com o processo de enraizamento. Desta forma, depois da transferência do material para o substrato adequado, este foi colocado em caixas (no caso dos *jiffys*, uma vez que P+V já estava em caixa) fechadas com tampa acrílica, com o objetivo de promover um microambiente com maior humidade relativa (%HR). No decorrer do processo, realizou-se uma abertura gradual da tampa, acompanhada de uma redução da humidade relativa, até ao momento em que a tampa foi removida por completo. Para além disso, ocorreu também o aumento gradual da intensidade luminosa (até 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). As condições de temperatura são as já descritas nas metodologias anteriores. Durante o ensaio experimental, o material vegetal foi regado periodicamente com água desionizada.

Tabela 9: Representação das diferentes condições de enraizamento *ex vitro*, com informação relativa à concentração do regulador de crescimento AIB, assim como ao tipo de substrato utilizado.

Tratamento	AIB (%)	Substrato
T0 (Controlo)	0,0	Jiffy
T1 (Controlo)	0,0	P+V
T2	0,2	Jiffy
T3	0,2	P+V
T4	0,3	Jiffy
T5	0,3	P+V
T6	0,4	Jiffy
T7	0,4	P+V
T8	0,5	Jiffy
T9	0,5	P+V
T10	1,0	Jiffy
T11	1,0	P+V

1.5. Aclimatização

Terminado o ensaio de enraizamento *ex vitro* e o período de pré-aclimatização, os rebentos enraizados foram transferidos para vasos contendo uma mistura de substratos: perlite + turfa + substrato comercial, nas proporções 1:2:1 (v:v:v), e colocados em estufa de campo com revestimento em acrílico alveolar de 10 mm, bancadas com *fog system* e rega por microaspersão. No final de 30 dias foi avaliada a taxa de sobrevivência (%) das plantas.

2. Análise da estabilidade de ploidia das plantas micropropagadas

2.1. Material vegetal

A avaliação da estabilidade da ploidia das plantas micropropagadas foi efetuada através da metodologia de citometria de fluxo. Para o efeito, compararam-se plantas de campo provenientes da praia de São Jacinto em Aveiro (coordenadas 40°43'5.18"N, 8°43'20.42"W) e plantas micropropagadas (após aclimatização). Para quantificar o ADN (pg) da camarinha, usou-se o tomate (*Solanum lycopersicum* “*Stupické*”) como espécie padrão, de conteúdo genómico conhecido.

2.2. Processamento da amostra e análise no citómetro de fluxo

Para a análise da ploidia e quantificação do ADN genómico, as suspensões nucleares foram preparadas segundo Galbraith et al. (1983) através de *chopping* de

tecidos foliares das amostras (plantas de campo e plantas micropropagadas), conjuntamente com tecido foliar de uma espécie padrão. No caso da suspensão nuclear de *Corema album*, utilizou-se aproximadamente 100 mg de tecido foliar, que sofreu *chopping* simultaneamente com 50 mg da folha de *Solanum lycopersicum* “Stupické” [2C=1,96 pg] (Doležel et al. 1992)), utilizando uma lâmina de barbear. Este processo foi realizado em 1 mL de tampão para plantas lenhosas (WPB), constituído por Tris-HCl 0,2 M, MgCl₂.6H₂O 4 mM, Triton X-100 0,1%, EDTANa₂.2H₂O 2 mM, NaCl 86 mM, metabisulfito 10 mM, polivinilpirrolidona (PVP) 1%, com pH ajustado a 7,5 (Loureiro et al. 2007).

A suspensão nuclear resultante foi filtrada através de um filtro de nylon de 50 µm e posteriormente adicionou-se 50 µg/mL de iodeto de propídio e 50 µg/mL de ribonuclease (RNase) para marcar o ADN e evitar a marcação de cadeias duplas de ácido ribonucleico (ARN), respetivamente. Após 5 minutos de incubação, a fluorescência do ADN da amostra foi analisada recorrendo ao citómetro de fluxo (*Partec CyFlow Space*). Utilizando o software *Partec Flomax v.2.4d*, obtiveram-se os histogramas de fluorescência dos núcleos correspondentes a cada uma das amostras e ao padrão. Pelo menos 1300 núcleos foram analisados em todas as amostras e no padrão (Suda et al. 2007).

Para a análise do conteúdo genómico de *Corema album*, foram preparadas e analisadas 3 réplicas representativas da planta de campo e 3 réplicas representativas da planta micropropagada. O tamanho do genoma holoploide (2C em pg; (Greilhuber et al. 2005)) foi obtido utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Tamanho genoma holoploide (pg)} = \frac{\text{Valor médio pico GO/G1 em Corema album}}{\text{Valor médio pico GO/G1 da espécie padrão}} \times \text{tamanho genómico da espécie padrão}$$

3. Estado oxidativo de plantas micropropagadas

3.1. Material vegetal

Para a avaliação do estado oxidativo das plantas produzidas *in vitro* foram utilizadas plantas obtidas através do protocolo de micropropagação (plantas aclimatizadas) e comparadas com plantas de campo recolhidas na zona dunar da praia de São Jacinto, no distrito de Aveiro, coordenadas 40°43'5.18"N, 8°43'20.42"W.

Inicialmente, as plantas foram colocadas nas mesmas condições, em ambiente de estufa, durante 15 dias.

Para a quantificação das ERO (O₂^{•-} e H₂O₂), assim como para o estudo da atividade antioxidante enzimática foram utilizadas alíquotas de 20 mg de tecido foliar,

quer das plantas de campo, quer das plantas micropropagadas, previamente maceradas em azoto líquido e congeladas a -80°C . Para avaliação da atividade antioxidante não enzimática foram utilizadas alíquotas de 20 mg de material fresco.

Em cada um dos ensaios foram utilizadas três réplicas biológicas correspondentes ao material micropropagado e ao material de campo, com pelo menos três réplicas técnicas (cada réplica representada por 3 poços).

3.2. Quantificação de espécies reativas de oxigénio

3.2.1. Quantificação anião superóxido

Para quantificação do $\text{O}_2^{\cdot-}$, seguiu-se a metodologia desenvolvida por Gajewska & Skłodowska (2007), com algumas modificações. Inicialmente, preparou-se 2 mL de tampão de extração para cada réplica, constituído por tampão fosfato 0,01 M ($\text{pH}=7,8$), azul de nitrotetrazólio (NBT) 0,05% previamente diluído em 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 10 mM de azida sódica. A cada tubo com 20 mg de tecido foliar, adicionou-se 2mL de tampão de extração e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente e com algumas inversões ocasionais. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados durante 2 minutos, a 13000 $\times g$ e a 4°C . Finalizado este período, transferiu-se para novos microtubos de 2 mL, 1,5 mL do sobrenadante obtido e as amostras foram aquecidas em banho-maria à temperatura de 85°C , durante 15 minutos. De seguida, os microtubos foram transferidos para o gelo, onde permaneceram durante 10 minutos.

Por fim, numa placa de 96 poços de espetro visível, cada uma das réplicas e o branco (formado apenas por tampão de extração) foram representados em triplicado, por um volume de 150 μL por poço. A leitura da absorvância foi realizada a 580 nm num espectrofotómetro de placas. A quantidade de superóxido por amostra foi determinada com base na redução do NBT e expressa em $\text{Abs}_{580\text{nm}}/\text{g}$ de massa fresca (MF).

3.2.2. Quantificação peróxido de hidrogénio

A quantificação do H_2O_2 foi realizada de acordo com Dias et al. (2014), com algumas modificações. Preparam-se padrões para a realização da reta padrão de H_2O_2 [0; 1; 10; 25; 50; 75; 1009] μM . Preparou-se também 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % (m/v) por réplica e posteriormente, procedeu-se à maceração dos tecidos foliares num almofariz com o suporte mecânico de um pilão, em 2 mL de TCA. Depois, decantou-se todo o volume do macerado para um microtubo de 2 mL e agitou-se (*vortex*) durante 15 segundos. Após este período, os microtubos foram centrifugados durante 15 minutos, a 12000 $\times g$ e a 4°C .

Após a centrifugação, adicionou-se a um novo microtubo, 500 µL do sobrenadante obtido, 500 µL de tampão fosfato 0,1M (pH=7,0) e 1 mL de iodeto de potássio. À semelhança das amostras, seguiu-se o mesmo procedimento para os diferentes padrões da reta, sendo o sobrenadante substituído pelo padrão. Posteriormente, incubaram-se os microtubos durante 1 hora na obscuridade.

Por fim, numa placa de 96 poços de espectro visível, as amostras e cada um dos padrões foram representados em triplicado, por um volume de 150 µL por poço e a leitura da absorvância foi realizada 390 nm num espectrofotómetro leitor de placas. A concentração de H₂O₂ presente nas amostras foi calculada de acordo com a reta padrão e expressa em mmol/g de massa fresca.

3.3. Atividade enzimática

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados através da quantificação da atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX), peroxidases que usam o guaiacol como substrato (GPX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Para todas as quantificações, após a extração do material vegetal, determinou-se primeiramente a quantidade de proteínas totais solúveis (TSP) presentes em cada amostra.

3.3.1. Extração do material vegetal

Para a extração do material vegetal de cada uma das amostras seguiu-se a metodologia de Mariz-Ponte et al. (2018), com algumas modificações. Preparou-se um tampão de extração constituído por tampão fosfato 0,1 M (pH =7), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,5 M, 0,2 % triton X-100 (v/v), ditioneitol (DTT) 1 M, fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF) 1 M e polivinilporrildona (PVP). Como o tampão de extração foi utilizado para todos os protocolos de atividade enzimática, incluindo a SOD, o seu pH foi ajustado para valores de 7,5.

Posteriormente, procedeu-se à maceração do material vegetal (previamente congelado a -80°C) num almofariz com o suporte mecânico de um pilão (em gelo) com 2 mL de tampão de extração. Depois decantou-se todo o volume do macerado para um microtubo de 2 mL e agitou-se (*vortex*) durante 15 segundos. Centrifugou-se durante 15 minutos, a 8000 xg a 4°C Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo e colocado em gelo, descartando-se o pellet.

3.3.2. Quantificação proteínas totais solúveis

Os sobrenadantes das diferentes amostras foram usados para quantificar as proteínas totais solúveis (TSP). Para o efeito, usou-se uma reta padrão [0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5] µg/µL de proteína (albumina de soro bovino (BSA)). Usando

uma placa de 96 poços de espectro visível, nos poços representativos do branco adicionou-se 5 µL de tampão de extração, enquanto que nos outros poços o tampão de extração foi substituído pelo respetivo extrato das amostras. A todos os poços preenchidos com tampão de extração/extrato adicionou-se 150 µL de reagente de Bradford. De seguida, incubou-se a placa de 96 poços durante 10 minutos à temperatura ambiente e leu-se a absorvância a 595 nm num leitor de microplacas.

Por fim, calculou-se o conteúdo de TSP com base na reta padrão. Os resultados foram expressos em mg/g de massa fresca.

3.3.3. Determinação da atividade da superóxido dismutase

A avaliação da atividade da SOD foi realizada de acordo com Beauchamp & Fridovich (1981), com algumas modificações. Inicialmente procedeu-se à elaboração da *mastermix* da reação. Para um volume final de 17 mL, adicionou-se a um tubo falcon de 50 mL, 9 mL de tampão fosfato 100 mM (pH = 7,5), 3,6 mL de metionina a 70 mM, 0,18 mL de EDTA 10 µM, 1,350 mL NBT e 2,790 mL de água miliQ. De seguida, adicionou-se a um microtubo de 2 mL 940 µL da *mastermix* anteriormente elaborada, 50 µL de extrato (ou tampão de extração no caso do branco) e 50 µL de riboflavina a 2 mM.

Neste ensaio foram preparadas duas placas de 96 poços de espectro visível. Para cada uma das placas pipetou-se por poço 150 µL da mistura realizada anteriormente, existindo 3 poços representativos do branco e 3 poços correspondentes a cada uma das 3 réplicas. Posteriormente, colocou-se uma das placas no escuro, enquanto a outra foi colocada à luz (fonte luminosa artificial) durante 10-15 minutos. Por fim, a absorvância foi lida a 560 nm num espectrofotómetro de placas.

A atividade da SOD foi quantificada através da sua habilidade para inibir a redução fotoquímica do NBT (Giannopolitis & Ries 1977) e os seus resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína, sabendo que uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição de redução do NBT.

3.3.4. Determinação da atividade da ascorbato peroxidase

A avaliação da atividade da APX foi realizada de acordo com Azevedo et al. (2005), com algumas modificações. Para tal, recorrendo a uma placa de 96 poços de espectro UV, adicionou-se a cada poço 140 µL de tampão fosfato (pH= 7,5), 20 µL de extrato (ou tampão de extração para o branco), 20 µL de AsA preparado a fresco (0,0176 g para 20 mL) e por fim, 100 µL de H₂O₂ 0,01 M. Após a adição do H₂O₂ procedeu-se à leitura da microplaca num espectrofotómetro de placas no comprimento de onda de 290 nm, 7 vezes, em intervalos de 10 segundos.

A atividade da APX foi quantificada com base na taxa de oxidação de AsA aos 290nm e durante 70 segundos (Azevedo et al. 2005) e utilizando o coeficiente de extinção do ascorbato (2,8/mM/cm). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol DHA}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

3.3.5. Determinação da atividade da catalase

A avaliação da atividade da CAT foi realizada de acordo com Teranishi et al. (1974), com algumas modificações. Para a quantificação desta enzima prepararam-se padrões que permitiram a construção de uma reta padrão de catalase [0; 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 1000; 1700] $\mu\text{g}/\text{mL}$ em água miliQ.

Inicialmente, foram preparados microtubos de 2 mL para as réplicas representativas da planta de campo e da planta micropropagada e para o branco correspondente a cada uma das réplicas. Para um volume final de 2 mL, adicionou-se 700 μL de tampão fosfato 0,1 M (pH = 7), 50 μL de extrato e por fim 250 μL H_2O_2 6 mM para ativar a reação. Nos microtubos correspondentes aos brancos não foi adicionado H_2O_2 , sendo o volume final concluído com 250 μL de tampão de extração. Após a adição do H_2O_2 a cada um dos tubos, estes foram incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, adicionou-se a cada tubo 1 mL de reagente de titânio [1 g de dióxido de titânio (TiO_2) e 10 g de sulfato de potássio (K_2SO_4) em 150 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4)], com o intuito de finalizar a reação. Tendo em consideração que o reagente de titânio é altamente corrosivo, a sua preparação e utilização ao longo do protocolo foi realizada em *hotte*, e com o material devidamente adaptado.

Posteriormente, os microtubos foram centrifugados à temperatura ambiente durante 10 minutos a 10000 xg. O sobrenadante foi recolhido e alíquotas colocadas em microplaca de 96 poços de leitura à luz visível. A leitura da absorvância foi realizada a 410 nm e a atividade da catalase foi determinada com base na degradação do H_2O_2 . Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

3.3.6. Determinação da atividade da guaiacol peroxidase

A avaliação da atividade da GPX foi realizada de acordo com Azevedo et al. (2005), com algumas modificações. Para tal, numa placa de 96 poços de espectro visível adicionou-se a cada poço 50 μL de tampão fosfato 0,1 M, 50 μL de guaiacol 15 mM, 100 μL de extrato (ou tampão de extração para o branco) e 50 μL de H_2O_2 0,083 M. Posteriormente, colocou-se a placa a incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após o período de incubação, procedeu-se à determinação da absorvância a 470 nm, recorrendo a um espectrofotómetro de placas.

Por fim, calculou-se a atividade de GPX usando o coeficiente de extinção do tetraguaiacol (26600/M/cm). Os resultados foram expressos em U GPX/ mg de proteína.

3.4. Atividade não enzimática

Os ensaios de atividade não enzimática foram realizados através da quantificação do conteúdo total de fenóis (TPC) e do estudo da atividade antiradicalar.

3.4.1. Quantificação do conteúdo total de fenóis

Para a quantificação do TPC seguiu-se a metodologia proposta por Dewanto et al. (2002), com algumas modificações. Preparam-se 7 padrões para a construção de uma reta padrão de ácido gálico [0; 50; 100; 200; 300; 400; 500] µg/mL em dH₂O. Posteriormente, maceraram-se as réplicas representativas das plantas de campo e das plantas micropropagadas em 3 mL de água desionizada num almofariz em gelo, com o suporte mecânico de um pilão. Posteriormente, o macerado foi filtrado com o auxílio de um funil de Büchner com filtro de celulose Whatman®, usando um kitasato ligado a uma bomba de vácuo. Dentro do kitasato colocou-se um tubo falcon de 15 mL, para recolher o filtrado. Cada tubo falcon contendo o filtrado foi centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante. Num tubo falcon de 15 mL para cada amostra, adicionou-se 500 µL de água desionizada, 125 µL do extrato e 125 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. No caso da reta padrão, seguiu-se a mesma metodologia, sendo preparados tubos falcon de 15 mL correspondentes a cada um dos padrões da reta. Depois, os tubos falcon (amostras e padrões) foram agitados (*vortex*) e incubados durante 6 minutos à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, adicionou-se a cada tubo 1250 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 7% e 1 mL de dH₂O até se perfazer 3 mL. Posteriormente, os tubos foram incubados durante 90 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 760 nm em placa de 96 poços.

O conteúdo total de fenóis calculou-se através da curva de ácido gálico (AG), sendo o resultado expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL de volume de solução (µg EAG/mL).

3.4.2. Determinação da atividade antiradicalar

O estudo da atividade antiradicalar foi determinado de acordo com a metodologia seguida por Harkat-Madouri et al. (2015), com algumas modificações. Inicialmente, prepararam-se 7 padrões que permitiram a construção de uma reta padrão de ácido gálico [0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 65] µg/mL em metanol puro.

Posteriormente, procedeu-se à maceração das 3 réplicas representativas das plantas de campo e das plantas micropropagadas em 3 mL de metanol puro num almofariz em gelo, com o suporte mecânico de um pilão. O macerado foi filtrado usando um funil de Büchner com um filtro de celulose Whatman®, e um kitasato ligado a uma bomba de vácuo. Dentro do kitasato colocou-se um tubo falcon de 15 mL, para recolher o filtrado. Os tubos falcon contendo os filtrados foram centrifugados a 2500 rpm durante 10 minutos. Seguidamente os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos falcon, enquanto aqueles que continham o precipitado foram eliminados. Em microtubos de 2 mL adicionou-se extrato, metanol puro e 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) 0,1 M elaborado a fresco. A solução de reação foi preparada com diferentes diluições do extrato para a planta de campo e as plantas micropropagadas (tabela 10).

Tabela 10: Diluições dos extratos da planta de campo e da planta micropropagada de *Corema album* em metanol, utilizados na quantificação da atividade antiradicalar.

Planta de Campo	Extrato (%)	Extrato (µL)	Metanol (µL)	DPPH (µL)
	4	10	240	1250
	8	20	230	1250
	12	30	220	1250
	15	37,5	212,5	1250
Planta Micropropagada	Extrato (%)	Extrato (µL)	Metanol (µL)	DPPH (µL)
	4	10	240	1250
	15	37,5	212,5	1250
	30	75	175	1250
	50	125	125	1250

Após a adição do extrato (ou do padrão), do metanol e do DPPH aos microtubos de 2 mL, agitaram-se (*vortex*) durante 10 segundos e colocaram-se no escuro durante 30 minutos para ocorrer a reação. Seguidamente, leu-se a absorvância a 517nm em placa de 96 poços.

Os resultados foram expressos em mg de massa fresca/mL de solução necessária para causar a redução de 50% do DPPH (IC₅₀).

4. Análise estatística

Relativamente aos ensaios de micropropagação, a análise estatística foi realizada recorrendo ao software *IBM SPSS Statistics v.25.00* através da realização de Anovas unidirecionais, conjuntamente com o teste de Duncan. Os resultados foram expressos como o valor médio ± erro padrão (ep), seguido da(s) letra(s) correspondente(s) ao

subconjunto homogéneo. Adicionalmente, o teste *t-student* (software Prism 7 (GraphPad Software Inc., USA)) foi também aplicado na análise estatística de alguns dados e os resultados expressos em valor médio \pm dp (desvio padrão).

Os dados da citometria de fluxo foram obtidos através do *software* Partec Flomax v.2.4d e a análise estatística foi realizada através do software Prism 7 (GraphPad Software Inc., USA). Os resultados foram expressos como valor médio \pm dp.

Por último, a análise estatística relacionada com os ensaios de stresse oxidativo foi realizada através do software Prism 7 (GraphPad Software Inc., USA), recorrendo ao teste *t-student*. Os resultados foram expressos em valor médio \pm dp.

Resultados

1. Micropropagação

1.1 Ensaios de multiplicação *in vitro*

1.1.1 Identificação da melhor condição de multiplicação em meio gelificado

Para a identificação da melhor condição de multiplicação, o material vegetal foi submetido a duas subculturas, com a duração de 60 dias cada. Para cada um dos tratamentos, quantificou-se, em cada subcultura, a percentagem de diferenciação de novos rebentos (% indução de rebentos), o número de novos rebentos (>5mm), assim como o respetivo comprimento (mm). Os resultados obtidos para cada tratamento encontram-se representados na tabela 11.

De uma forma generalizada verifica-se que a % de indução de novos rebentos é superior para a combinação entre as citocininas 2iP+Cin, quando comparada com a adição conjunta de 2iP+BAP e 2iP+mT, ocorrendo 100% de indução para os tratamentos T16, T17 e T18 na 2^o subcultura. Embora na primeira subcultura alguns dos tratamentos apresentem uma capacidade de proliferação reduzida, com valores inferiores ou próximos de 50% (eg: T6, T10, T13, T14, T15, T20, T23, T24), na segunda subcultura observa-se um aumento da capacidade de proliferação dos rebentos em todos os tratamentos, com a exceção do controlo (T0), cuja percentagem de proliferação diminui de 60% para 31%.

Relativamente ao número de novos rebentos (>5mm), na primeira subcultura T17 (2 mg/L 2iP + 1 mg/L Cin) representa o melhor resultado para este parâmetro com $5,9 \pm 0,3$ rebentos, não variando significativamente de T16 e T25. Na segunda subcultura, com exceção do controlo, verificamos um acréscimo do número de rebentos formados, comparativamente com a 1^a subcultura, para a generalidade das combinações testadas, com particular destaque para os tratamentos T25 (7 rebentos), T17 (6,8 rebentos) T26 (6,7 rebentos) T16 (6,6 rebentos) e T27 (5,7 rebentos), todos sem diferenças significativas. Desta forma, através da análise deste parâmetro para as duas subculturas, é possível concluir-se que a combinação dos reguladores de crescimento 2iP+Cin é a mais benéfica, estando os melhores resultados associados à adição de cinetina conjuntamente com a 2iP em concentrações mais elevadas desta última, pois para a concentração mais reduzida de 2iP (1 mg/L), a combinação de 2iP+Cin apresenta resultados similares à adição conjunta de 2iP+BAP e 2iP+mT. Os resultados menos satisfatórios estão associados ao controlo, onde, como já foi referido, se registou um decréscimo da capacidade proliferativa dos explantes, assim como à

adição de 2iP+mT, embora a combinação dos reguladores de crescimento 2iP+BAP gere resultados semelhantes para este parâmetro.

No que diz respeito ao comprimento dos novos rebentos (mm), os melhores resultados estão associados mais uma vez à combinação dos reguladores de crescimento 2iP+Cin e adicionalmente ao controlo, no caso da primeira subcultura. Apesar desta associação ser a mais promissora, os resultados mais satisfatórios estão sobretudo relacionados com concentrações de 2iP de 1 mg/L e 2 mg/L, com os melhores resultados a serem obtidos nos tratamentos T7, T8, T9, T16, T17, T18, com valores que variaram entre 14,2 e 13,1 mm, sem diferenças significativas. Para a concentração mais elevada (4 mg/L) não são tão satisfatórios, com valores entre os 11,3 e os 9,4 mm. Por outro lado, verifica-se mais uma vez que a adição conjunta de 2iP+mT não é a mais benéfica, apresentando os piores resultados para este parâmetro em todas as concentrações de 2iP+mT testadas, seguido da combinação entre 2iP+BAP tal como se sucedeu para o parâmetro número de rebentos. Verifica-se o aumento do comprimento dos rebentos para todos os tratamentos testados, com a exceção do controlo entre a primeira e a segunda subcultura.

Neste trabalho, foram também quantificados o número de rebentos (<5mm). Apesar de normalmente não serem considerados explantes secundários de multiplicação face à sua menor viabilidade, podem ser considerados como um indicador do potencial de diferenciação do material vegetal. Não apresentando os seus resultados na tabela 11 devido à pouca relevância neste estudo, verifica-se que a combinação mais favorável ocorre entre 2iP+mT, contrariamente ao que se observou para os parâmetros anteriores.

Em suma, os dados mostram que a associação entre o 2iP+Cin é a mais benéfica para todos os parâmetros avaliados. Tendo em consideração os resultados obtidos nas duas subculturas para a indução e número de novos rebentos, assim como para o seu alongamento, a combinação entre 2 mg/L 2iP + 1 mg/L Cin (T17) é a mais favorável (figura 9, c).

Tabela 11: Efeito dos diferentes tratamentos na indução de rebentos (%), número de rebentos (>5mm) e comprimento (mm) dos rebentos formados na multiplicação de *Corema album* na 1ª e 2ª subculturas. Os parâmetros número de rebentos (>5mm) e comprimento dos rebentos (mm) estão representados como valor médio ± ep. Valores médios inseridos na mesma coluna e com a mesma letra não variam significativamente entre si ($p < 0,05$). A verde encontra-se assinalado o tratamento mais favorável para a multiplicação de *Corema album*.

	Regulador de crescimento (mg/L)				Indução de rebentos (%)		Número de rebentos (>5mm) ± ep		Comprimento dos rebentos (mm) ± ep	
	2iP	BAP	mT	Cin	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
					subcultura	subcultura	subcultura	subcultura	subcultura	subcultura
T0					60	31	2,3 ± 0,3 hijk	1,1 ± 0,7 h	10,7 ± 0,3 a	10,3 ± 0,7 efgh
T1	1,0	0,5			69	90	2,9 ± 0,4 ghijk	4,9 ± 0,4 cdef	7,3 ± 0,4 def	12,3 ± 0,4 bcd
T2	1,0	1,0			82	88	3,7 ± 0,4 cdefgh	3,7 ± 0,4 efg	7,8 ± 0,3 de	12,0 ± 0,4 cd
T3	1,0	2,0			66	83	3,0 ± 0,4 efghijk	3,7 ± 0,4 efg	7,3 ± 0,4 def	10,9 ± 0,4 defg
T4	1,0		0,5		60	94	4,5 ± 0,4 bcd	4,5 ± 0,4 cdefg	7,3 ± 0,4 def	11,5 ± 0,4 de
T5	1,0		1,0		60	90	2,3 ± 0,4 hijk	4,5 ± 0,4 cdefg	6,6 ± 0,4 efgh	10,5 ± 0,4 efgh
T6	1,0		2,0		57	90	3,2 ± 0,4 defghij	3,3 ± 0,4 g	6,4 ± 0,4 fgh	9,8 ± 0,4 fgh
T7	1,0			0,5	89	91	2,9 ± 0,3 fghijk	4,1 ± 0,4 defg	11,8 ± 0,3 a	13,5 ± 0,4 ab
T8	1,0			1,0	82	93	3,5 ± 0,4 cdefgh	5,4 ± 0,5 bcd	11,7 ± 0,4 a	13,4 ± 0,4 abc
T9	1,0			2,0	81	96	4,4 ± 0,4 bcd	4,4 ± 0,4 cdefg	11,6 ± 0,4 a	14,5 ± 0,4 a
T10	2,0	0,5			57	86	3,1 ± 0,4 efghij	3,4 ± 0,4 g	7,6 ± 0,4 def	10,2 ± 0,4 efgh
T11	2,0	1,0			83	100	4,3 ± 0,4 bcdef	4,3 ± 0,4 cdefg	8,1 ± 0,3 cd	12,3 ± 0,4 bcd
T12	2,0	2,0			71	85	2,5 ± 0,4 ghijk	3,4 ± 0,4 fg	7,2 ± 0,4 defg	9,9 ± 0,4 fgh
T13	2,0		0,5		54	97	3,6 ± 0,4 cdefgh	3,7 ± 0,4 efg	7,2 ± 0,4 defg	11,1 ± 0,4 def
T14	2,0		1,0		44	92	2,9 ± 0,5 fghijk	5,0 ± 0,5 cde	6,4 ± 0,5 fgh	10,3 ± 0,5 efgh
T15	2,0		2,0		52	96	2,3 ± 0,5 hijk	3,1 ± 0,5 g	6,0 ± 0,4 gh	7,4 ± 0,4 k
T16	2,0			0,5	93	100	5,4 ± 0,4 ab	6,6 ± 0,4 ab	11,1 ± 0,4 a	13,1 ± 0,4 abc
T17	2,0			1,0	89	100	5,9 ± 0,3 a	6,8 ± 0,4 a	11,2 ± 0,3 a	14,2 ± 0,4 a
T18	2,0			2,0	97	100	3,8 ± 0,3 cdefg	4,9 ± 0,4 cde	9,6 ± 0,3 b	13,1 ± 0,4 abc
T19	4,0	0,5			71	94	3,6 ± 0,4 cdefgh	4,4 ± 0,4 cdefg	7,4 ± 0,4 def	9,6 ± 0,4 ghi
T20	4,0	1,0			52	91	2,1 ± 0,5 ijk	3,9 ± 0,4 efg	6,3 ± 0,5 fgh	9,5 ± 0,4 hij
T21	4,0	2,0			47	94	2,1 ± 0,5 ijk	4,3 ± 0,4 cdefg	6,0 ± 0,4 gh	9,1 ± 0,4 hij
T22	4,0		0,5		53	64	1,7 ± 0,5 k	4,3 ± 0,5 cdefg	5,6 ± 0,4 h	9,8 ± 0,5 fgh
T23	4,0		1,0		49	84	1,7 ± 0,4 k	4,2 ± 0,4 cdefg	5,7 ± 0,4 h	8,3 ± 0,4 ijk
T24	4,0		2,0		51	76	2,1 ± 0,5 ijk	3,9 ± 0,5 efg	5,5 ± 0,4 h	8,2 ± 0,4 jk
T25	4,0			0,5	89	89	4,8 ± 0,4 abc	7,0 ± 0,4 a	9,2 ± 0,4 bc	11,3 ± 0,5 de
T26	4,0			1,0	86	94	3,5 ± 0,4 cdefghi	6,7 ± 0,4 ab	9,4 ± 0,3 b	12,2 ± 0,4 bcd
T27	4,0			2,0	79	100	2,6 ± 0,4 ghijk	5,7 ± 0,4 abc	9,1 ± 0,4 bc	9,4 ± 0,4 hij

Para além dos parâmetros previamente analisados, quantificou-se também a taxa de mortalidade e contaminação em cada subcultura. Em relação à mortalidade, verificou-se que os tratamentos mais afetados são os representativos da combinação 2iP+mT, com valores máximos de mortalidade de 13%, não sendo observada ocorrência de contaminação.

Em relação ao parâmetro qualitativo nível de oxidação, mais uma vez a combinação entre 2iP+mT foi a mais afetada. No que diz respeito à ocorrência de desordens fisiológicas como a hiperhidricidade, esta observou-se muito baixa em todos os tratamentos, verificando-se um ligeiro aumento com a adição de concentrações de 2iP mais elevadas.

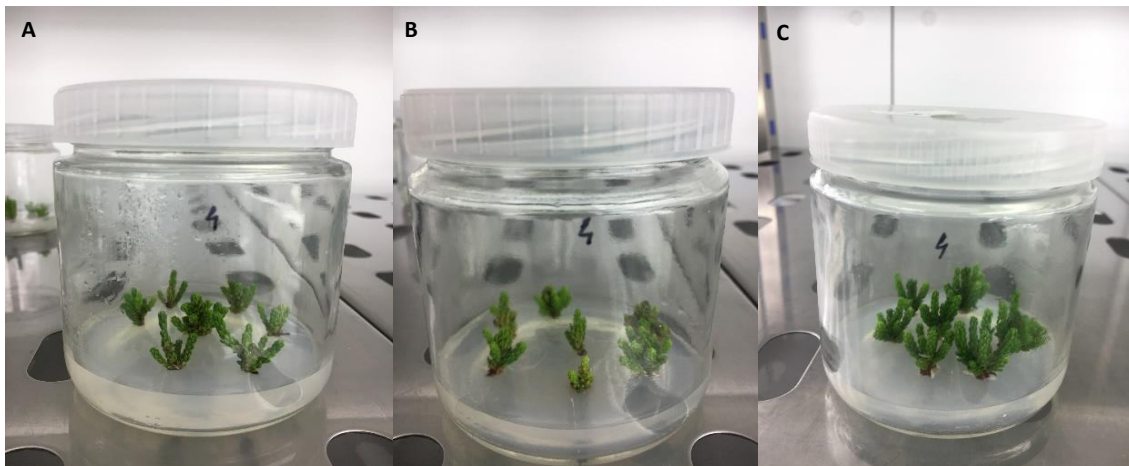


Figura 9: Representação de alguns dos tratamentos testados na multiplicação de *Corema album*. Em todas as imagens (A, B e C) o regulador de crescimento 2iP é utilizado na concentração de 2mg/L e a BAP (A), mT (B) e Cin (C) na concentração de 1 mg/L. Em C, encontra-se representada uma das réplicas do tratamento T17, que apresenta os resultados mais favoráveis para a multiplicação desta espécie

1.1.2. Identificação das melhores condições de cultura para a multiplicação em biorreatores de imersão temporária

Para determinar as melhores condições de multiplicação em sistemas BIT, o material vegetal foi avaliado 60 dias após a sua inoculação. Para cada um dos tratamentos, quantificou-se a mortalidade (%), a indução de novos rebentos (%), o número de novos rebentos (>5mm), assim como o respetivo comprimento (mm). Os resultados obtidos encontram-se representados na tabela 12.

Inicialmente, observa-se que os tratamentos T0 e T1 apresentam uma mortalidade de 100%, constatando-se que as condições físicas de imersão e arejamento (2' a cada 6h e 1' a cada 3h, respetivamente) associadas aos mesmos não são favoráveis ao desenvolvimento de *Corema album*. Para além disso, verifica-se também a mortalidade da totalidade dos rebentos no tratamento T2, que poderá estar associada à existência de um explante na zona de ligação entre duas componentes do biorreator, impedindo a circulação conveniente do meio de cultura. Observa-se ainda que para a mesma composição do meio de cultura e para as mesmas condições de imersão e arejamento, a mortalidade é muito superior para os biorreatores sem rede, atingindo os 100% para o tratamento T6 e 65% para o tratamento T7, quando comparados com os tratamentos T4 (25% mortalidade) e T5 (5% de mortalidade).

Relativamente à capacidade de indução de novos rebentos, verifica-se que esta é baixa para todos os tratamentos onde a mortalidade não foi máxima, apresentando o valor mais elevado (50%) para o tratamento T5.

No que diz respeito ao número de rebentos (>5mm), verifica-se que T3 é a condição que melhor resultado apresenta, com um número de rebentos de $11,6 \pm 1,3$,

embora não varie significativamente do tratamento T5. Por outro lado, T4 e T7 são os tratamentos com capacidade de gerar o menor número de rebentos. No entanto, a menor capacidade de gerar rebentos em T4 e T7 poderá relacionar-se sobretudo à ausência de citocininas no meio e à ausência de rede no biorreator, respetivamente. Uma vez que T4, T5, T6 e T7 apresentam as mesmas condições de cultura em termos de frequência e duração do período de imersão e arejamento, quando comparando T4 (meio sem adição de citocininas) e T5 (meio de cultura adicionalmente suplementado com citocininas), verifica-se que T5 apresenta uma multiplicação 7,1 vezes superior, demonstrando que a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura afeta positivamente a multiplicação. Para além disso, comparando o tratamento T5 (com rede) e T7 (sem rede) observa-se que a capacidade de formação de novos rebentos é aproximadamente 3,6 vezes menor no biorreator onde a rede não está presente. Desta forma, conclui-se que a ausência de rede afeta negativamente a multiplicação assim como a sobrevivência dos rebentos.

Relativamente ao comprimento dos rebentos (mm), embora a condição T7 não seja a mais indicada para a formação de novos rebentos em termos de % de indução e número de novos rebentos gerados, tem capacidade de formar os rebentos com maiores dimensões ($23,0 \pm 2,5$ mm). Por outro lado, T3, que se apresenta com melhores resultados para a formação de novos rebentos é a condição com menor capacidade de alongamento ($11,0 \pm 0,9$ mm).

Tabela 12: Efeito dos diferentes tratamentos na mortalidade (%), capacidade de indução de novos rebentos (%), número de rebentos (>5mm) e seu comprimento (mm) na multiplicação de *Corema album* em BIT. Os parâmetros número de rebentos (>5mm) e comprimento dos rebentos (mm) encontram-se representados como valor médio \pm ep. Valores médios inseridos na mesma coluna com a mesma letra não variam significativamente entre si ($p < 0,05$). SR representa ausência de resultado. A verde encontra-se assinalado o tratamento mais promissor para a multiplicação de *Corema album* em BIT.

Tratamento				Mortalidade (%)	Indução de rebentos (%)	Número de rebentos (>5mm) \pm ep	Comprimento dos rebentos (mm) \pm ep
2 mg/L 2iP + 1mg/L BAP	Imersão / Arejamento (duração e frequência)	Presença de rede					
T0	Não	2' a cada 6h / 1' a cada 3h	Sim	100	0	SR	SR
T1	Sim	2' a cada 6h / 1' a cada 3h	Sim	100	0	SR	SR
T2	Não	3' a cada 12h / 1' a cada 4h	Sim	100	0	SR	SR
T3	Sim	3' a cada 12h / 1' a cada 4h	Sim	10	40	$11,6 \pm 1,3$ a	$11,0 \pm 0,9$ c
T4	Não	3' a cada 8h / 30" a cada 8h	Sim	25	20	$1,0 \pm 1,8$ b	$15,3 \pm 1,2$ bc
T5	Sim	3' a cada 8h / 30" a cada 8h	Sim	5	50	$7,1 \pm 1,2$ ab	$17,3 \pm 0,8$ b
T6	Não	3' a cada 8h / 30" a cada 8h	Não	100	0	SR	SR
T7	Sim	3' a cada 8h / 30" a cada 8h	Não	65	5	$2,0 \pm 3,7$ b	$23,0 \pm 2,5$ a

No que diz respeito à ocorrência de desordens fisiológicas como vitrificação dos rebentos, formação de massas de vitrificação e oxidação, verificou-se a ocorrência de

todas elas em todos os tratamentos testados, no entanto estas são superiores para os tratamentos T4, T5 e T7, cuja multiplicação ocorre nas mesmas condições físicas (imersão 3' a cada 8h e arejamento 30" a cada 8h), sendo o tratamento T7 (ausência de rede) especialmente afetado pela ocorrência de vitrificação (figura 10).

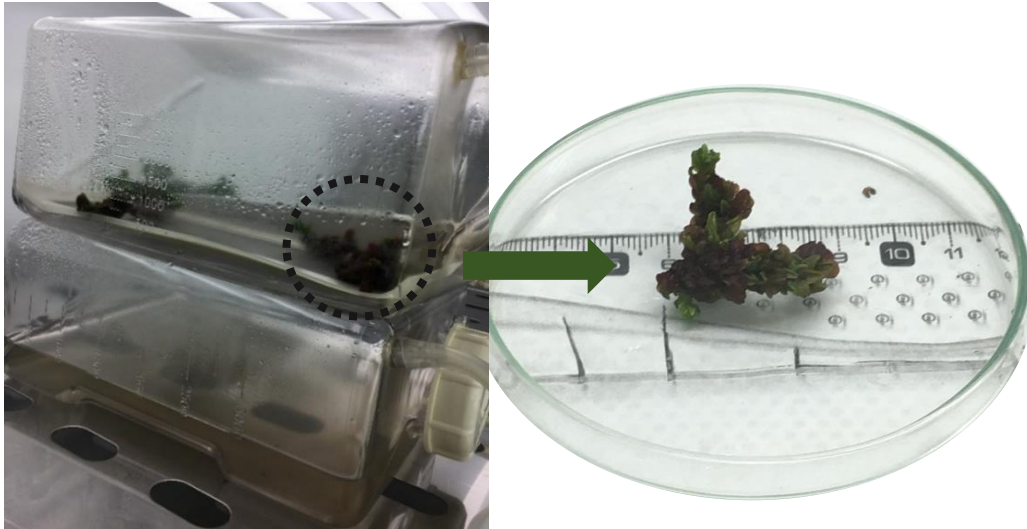


Figura 10: Rebento em estado de vitrificação, umas das principais problemáticas associadas à cultura em biorreatores.

Em suma, verifica-se que a combinação entre a adição de citocininas ao meio de cultura e a utilização de rede no biorreator é propícia à regeneração de rebentos em *Corema album*, contudo, os resultados obtidos não permitem selecionar significativamente quais as melhores condições de imersão e arejamento associadas a estas características. No entanto, o tratamento T3 é aquele que apresenta melhor resultado em termos de número de novos rebentos formados (>5mm). Para além disso, é o tratamento menos afetado pela ocorrência de desordens fisiológicas como a vitrificação.

1.1.3. Multiplicação em meio gelificado vs biorreatores de imersão temporária

Com o intuito de verificar qual a o sistema mais eficiente para a multiplicação de *Corema album*, estabeleceu-se uma comparação entre a multiplicação de rebentos recorrendo aos métodos tradicionais (representado pelo tratamento T11, tabela 11) e utilizando os BIT (representado pelo tratamento T3, tabela 12). Desta forma, verifica-se que para a mesma composição do meio de cultura (com a exceção do agar) e para o mesmo número de subculturas existem diferenças significativas no número de novos rebentos (>5mm) e no seu comprimento (mm) entre a cultura em frasco e em biorreator (figura 11). T3, que apresenta os melhores resultados para a multiplicação em

biorreator, gera aproximadamente 2,7 vezes mais rebentos do que os observados em frasco de cultura e apresenta um alongamento 1,4 vezes superior (figura 11).

Em suma, conclui-se que para a mesma composição do meio de cultura, a multiplicação recorrendo a biorreatores se torna mais vantajosa no que diz respeito aos parâmetros quantitativos. No entanto, esta é bastante mais afetada pela ocorrência de desordens fisiológicas, assim como fenómenos de mortalidade.

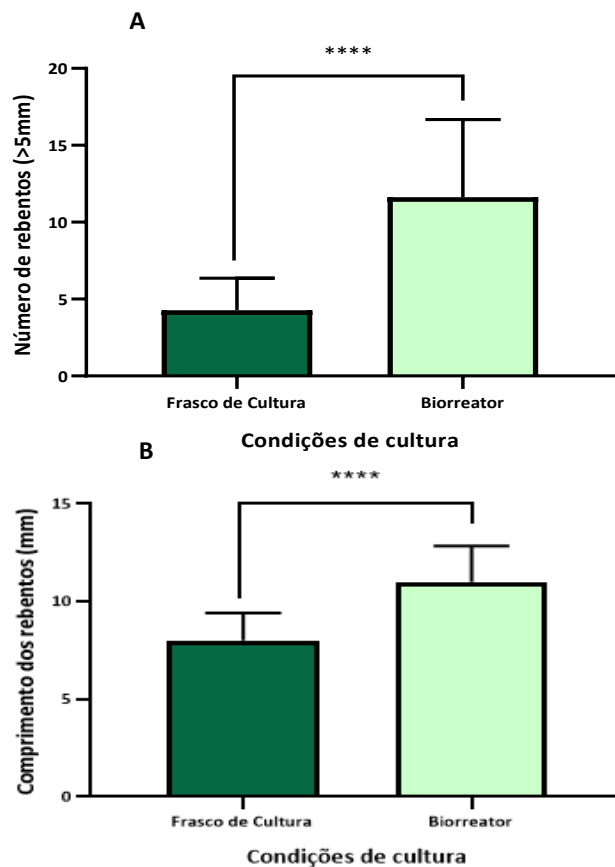


Figura 11: Comparação da fase de multiplicação de *Corema album* em biorreator e frasco de cultura, com informações relativas ao número de novos rebentos (>5mm) (A) e ao comprimento dos rebentos (mm) (B). Os resultados estão representados em valor médio \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

1.2. Ensaio de enraizamento

1.2.1 Identificação das melhores condições de enraizamento *in vitro*

Primeiro ensaio de enraizamento *in vitro*

Para a identificação da melhor condição de enraizamento *in vitro*, 60 dias após o início do ensaio, avaliaram-se parâmetros relacionados com a % de indução radicular, número de raízes formadas por rebento, comprimento radicular (mm) e comprimento do rebento (mm). No entanto, não são apresentados resultados referentes aos parâmetros relacionados com a formação de raízes, uma vez que não se verificou desenvolvimento

radicular em nenhum dos tratamentos aplicados. Por outro lado, apresentam-se resultados referentes ao comprimento dos rebentos não enraizados, uma vez que se verificou um aumento no seu comprimento, sem perda de viabilidade, o que pode ter interesse sob ponto de vista de obtenção de rebentos mais longos para futuros ensaios de enraizamentos *ex vitro*. Os resultados encontram-se representados na tabela 13.

Apesar de todos os tratamentos aplicados apresentarem aumento do comprimento dos rebentos, através da análise estatística, é possível constatar que o tratamento T4 (2 mg/L AIB) é a condição que melhor resultados gera em termos de alongamento dos rebentos, com valores de aproximadamente $65,2 \pm 2,0$ mm, não variando significativamente do tratamento T8. Pelo contrário, o pior resultado está associado ao tratamento T19 (2 mg/L AIA + 2 mg/L AIB), não variando significativamente de T0, T14, T15 e T17.

Verifica-se também que a incorporação individualizada de AIB, ANA e AIA no meio de cultura gera resultados semelhantes entre si para a concentração de 1 mg/L, no entanto para a concentração de 2 mg/L a auxina AIB é aquela que mais promove o alongamento. A utilização simultânea das auxinas AIB e AIA no meio de cultura gera resultados similares para todas as concentrações testadas.

Relativamente à utilização da metodologia de *dipping*, observa-se que a capacidade de alongamento de AIB é superior comparativamente a AIA para os dois tempos de imersão testados, estando o melhor resultado associado aos 2 minutos de *dipping* em AIB.

De uma forma global, os melhores resultados de alongamento estão relacionados com a utilização individualizada da auxina AIB, quer pela sua incorporação no meio de cultura, que pelo processo de *dipping*.

Tabela 13: Efeito dos diferentes tratamentos na % de indução radicular, número de novas raízes formadas por rebento e no seu comprimento (mm), assim como o comprimento dos rebentos (mm) em *Corema album*. O parâmetro comprimento dos rebentos (mm) encontra-se representado como valor médio \pm ep. Valores médios inseridos na mesma coluna com a mesma letra não variam significativamente entre si ($p < 0,05$). SR representa a ausência de resultado. * rebentos que permaneceram durante todo o tempo de enraizamento em meio de cultura com a respetiva auxina. A verde encontra-se assinalada a melhor condição de alongamento em *Corema album*.

Tratamento	Regulador de crescimento (mg/L)			Tempo / Método	Indução radicular (%)	Número de raízes por explante \pm ep	Comprimento radicular (mm) \pm ep	Comprimento do rebento (mm) \pm ep	
	ANA	AIB	AIA						
	T0								
T1	1,0				*	0	SR	SR	54,3 \pm 2,0 cdef
T2	2,0				*	0	SR	SR	50,8 \pm 2,0 cdefg
T3		1,0			*	0	SR	SR	56,9 \pm 2,0 bcd
T4		2,0			*	0	SR	SR	65,2 \pm 2,0 a
T5	1000,0			1 min / dipping		0	SR	SR	55,6 \pm 2,0 cde
T6	1000,0			2 min / dipping		0	SR	SR	50,3 \pm 2,0 defg
T7		1000,0		1 min / dipping		0	SR	SR	57,3 \pm 2,0 bc
T8		1000,0		2 min / dipping		0	SR	SR	62,8 \pm 2,0 ab
T9			1,0	*		0	SR	SR	50,1 \pm 2,0 cdefg
T10			2,0	*		0	SR	SR	56,0 \pm 2,0 cde
T11		0,5	0,5	*		0	SR	SR	52,3 \pm 2,1 cdefg
T12		1	0,5	*		0	SR	SR	49,2 \pm 2,0 efg
T13		2	0,5	*		0	SR	SR	54,0 \pm 2,0 cdef
T14		0,5	1,0	*		0	SR	SR	45,9 \pm 2,0 gh
T15		1,0	1,0	*		0	SR	SR	48,1 \pm 2,1 fgh
T16		2,0	1,0	*		0	SR	SR	49,9 \pm 2,0 efg
T17		0,5	2,0	*		0	SR	SR	47,7 \pm 2,2 fgh
T18		1,0	2,0	*		0	SR	SR	51,2 \pm 2,0 cdefg
T19		2,0	2,0	*		0	SR	SR	42,4 \pm 2,0 h

Para além do registo dos parâmetros radiculares e do alongamento dos rebentos, foi ainda avaliada a taxa de mortalidade e de contaminação. Relativamente à ocorrência de mortalidade, esta verificou-se bastante reduzida (com um valor máximo de 3%), ocorrendo apenas em 3 dos 20 tratamentos (T0, T2 e T6). Não foi registada qualquer contaminação em nenhum dos tratamentos aplicados. Em relação aos parâmetros qualitativos como a oxidação, esta foi constante entre os diferentes tratamentos e sobretudo ao nível da base, onde se localizam as regiões foliares mais antigas e onde ocorreu contacto com o meio de cultura (figura 12). Para além disso, os rebentos não apresentaram sinais de formação de calo em nenhum dos tratamentos.

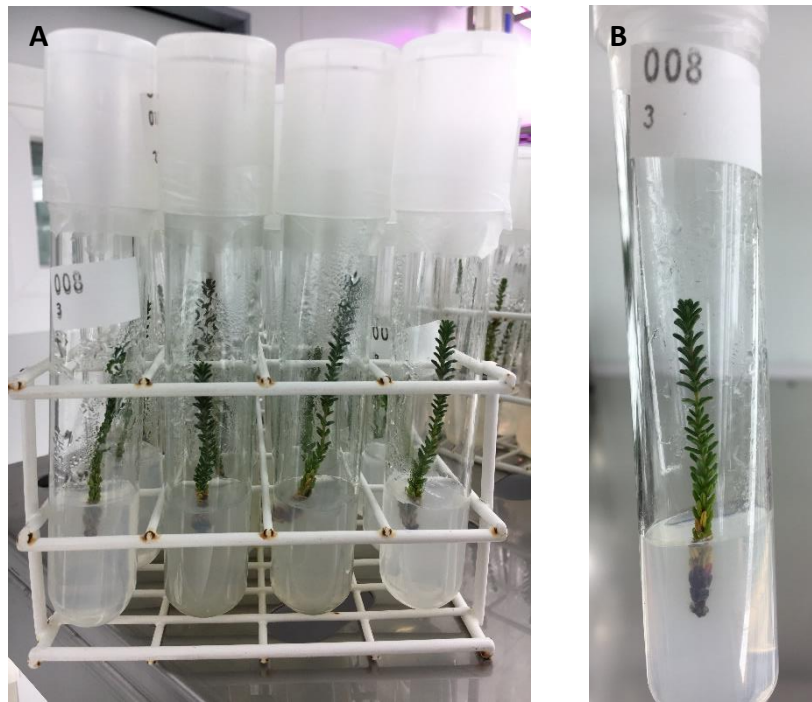


Figura 12: Alongamento dos rebentos não enraizados (A e B). Em B observa-se um rebento saudável, com sinais de oxidação na porção basal.

Segundo ensaio de enraizamento *in vitro*

Tendo em consideração os resultados obtidos no primeiro ensaio de enraizamento *in vitro*, realizou-se um novo ensaio e após 60 dias do seu início foram novamente quantificados os parâmetros já mencionados. Mais uma vez, não são apresentados os resultados relacionados com os parâmetros radiculares, uma vez que não se verificou formação de raízes em nenhum dos tratamentos. Não obstante, o comprimento (mm) dos rebentos não enraizados encontra-se representado na tabela 14.

Apesar de se observar um aumento no comprimento dos rebentos em todas os tratamentos testados, verifica-se que presença ou ausência de AIB no meio de cultura na fase de indução afeta a capacidade de alongamento, uma vez que as condições T0, T3, T6 e T9 (ausência de AIB na fase de indução), são as que apresentam um menor alongamento dos rebentos, não variando significativamente entre si. Por outro lado, a utilização de 3 mg/L ou 5 mg/L AIB gera resultados semelhantes.

Para os tratamentos onde o AIB foi utilizado na fase de indução, verifica-se que a presença ou ausência de luz é um fator importante, sendo que os 5 dias iniciais em condições de obscuridade melhoraram a capacidade de alongamento dos rebentos.

Assim, para as mesmas condições de cultura, os tratamentos cuja indução ocorreu em ambiente de luminosidade apresentam um menor comprimento comparativamente aqueles cuja indução foi feita obscuridade (eg. T1 < T7; T2 < T8; T4 < T10; T5 < T11). A adição de CA ao meio de expressão não mostra influência na capacidade de alongamento dos rebentos.

De uma forma geral, verifica-se que os melhores resultados em termos de alongamento dos rebentos não enraizados estão associados a uma fase de indução na presença de AIB e ambiente de obscuridade, com posterior transferência para meio de expressão suplementado ou não por CA, destacando-se o tratamento T7 com comprimento de $66,2 \pm 2,3$, apesar de não variar significativamente de T8, T10 e T11.

Tabela 14: Efeito dos diferentes tratamentos na % de indução radicular, número de novas raízes formadas por rebento e no seu comprimento (mm), assim como o comprimento dos rebentos (mm) em *Corema album*. O parâmetro comprimento do rebento (mm) encontra-se representado como valor médio \pm ep. Valores médios inseridos na mesma coluna com a mesma letra não variam significativamente entre si ($p < 0,05$). SR representa a ausência de resultado. A verde encontra-se assinalada a melhor condição de alongamento em *Corema album*.

Tratamento	Fase de indução (5 dias)		Indução radicular (%)	Número de raízes \pm ep	Comprimento radicular (mm) \pm ep	Comprimento do rebento (mm) \pm ep	
	AIB (mg/L)	Condição					Fase de expressão
							Condição
T0	0,0	Luz	Luz	0	SR	SR	42,6 \pm 2,4 c
T1	3,0	Luz	Luz	0	SR	SR	52,6 \pm 2,3 b
T2	5,0	Luz	Luz	0	SR	SR	52,9 \pm 2,3 b
T3	0,0	Luz	CA, Luz	0	SR	SR	43,1 \pm 2,4 c
T4	3,0	Luz	CA, Luz	0	SR	SR	52,8 \pm 2,3 b
T5	5,0	Luz	CA, Luz	0	SR	SR	52,7 \pm 2,3 b
T6	0,0	Escuro	Luz	0	SR	SR	43,6 \pm 2,4 c
T7	3,0	Escuro	Luz	0	SR	SR	66,2 \pm 2,3 a
T8	5,0	Escuro	Luz	0	SR	SR	59,9 \pm 2,0 ab
T9	0,0	Escuro	CA, Luz	0	SR	SR	43,5 \pm 2,4 c
T10	3,0	Escuro	CA, Luz	0	SR	SR	59,9 \pm 2,3 ab
T11	5,0	Escuro	CA, Luz	0	SR	SR	65,2 \pm 2,3 a

Para além do registo dos parâmetros radiculares e do alongamento dos rebentos, foi ainda avaliada a taxa de mortalidade e de contaminação dos rebentos, no entanto não se verificou ocorrência de mortalidade ou contaminação em nenhum dos tratamentos testados. Em relação aos parâmetros qualitativos como a oxidação, esta foi constante entre os diferentes tratamentos e sobretudo ao nível da base, onde se localizam as regiões foliares mais antigas e onde ocorreu contacto com o meio de cultura. Para além disso, os rebentos não apresentaram sinais de formação de tecido caloso em nenhum dos tratamentos.

1.2.2. Identificação das melhores condições de enraizamento *ex vitro* e aclimatização

Para a identificação da melhor condição de enraizamento *ex vitro*, 60 dias após o início do ensaio avaliaram-se parâmetros quantitativos relacionados com o desenvolvimento radicular, nomeadamente a capacidade de indução radicular (%), o número de novas raízes formadas por rebento e o comprimento radicular (mm). Para além disso, registou-se ainda o comprimento dos rebentos (mm).

Como descrito em material e métodos foram testadas 5 modalidades de indução com AIB e 2 tipos de substrato para expressão radicular (figura 13). Os resultados obtidos para os diferentes tratamentos encontram-se discriminados na tabela 15.

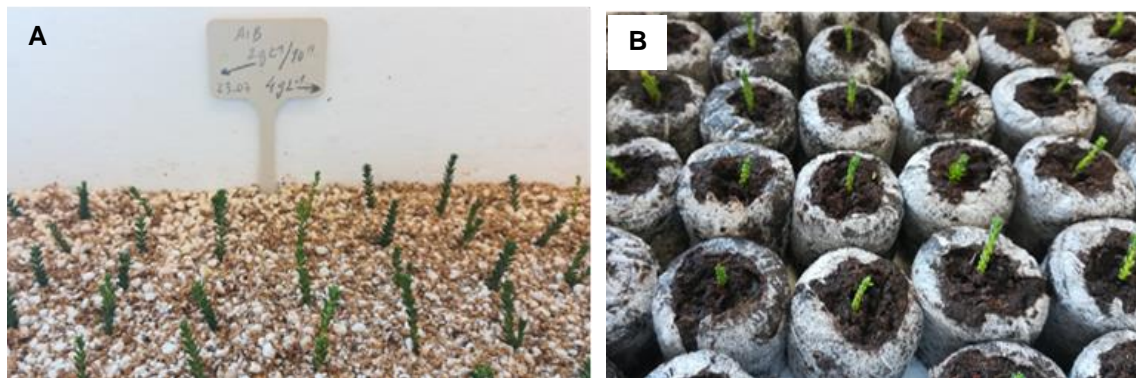


Figura 13: Processo de enraizamento nos 2 tipos de substratos testados. (A) Perlite + Vermiculite (1:1, v:v); (B) *Jiffys*.

A capacidade de indução radicular (%) é reduzida para todos os tratamentos testados. No entanto, os piores resultados estão associados à utilização de 0,3% AIB, para ambos os substratos, apresentado uma indução de apenas 6% (T4 e T5), com valores inferiores aos tratamentos de controlo (T0 e T1). Por outro lado, a melhor percentagem de indução (20%) relaciona-se com a utilização de 0,2% e 0,5% AIB em substrato *jiffy* (T2 e T8, respetivamente), seguido de 17% e 16% para as concentrações 1,0% e 0,2% de AIB em P+V, respetivamente (T11 e T3, respetivamente).

No que diz respeito ao número de raízes formadas por rebento, o tratamento T11 (1,0% AIB em substrato P+V) é aquele que apresenta o melhor resultado, com a formação de $7,2 \pm 1,3$ raízes, apesar de não variar significativamente das condições T1, T2, T3, T4, T6, T7, T8, T9 e T10. Por outro lado, os tratamentos T0 (controlo em *jiffys*) e T5 (0,3% AIB em substrato P+V), apresentam os piores resultados para este parâmetro com o mesmo número de raízes formadas ($1,0 \pm 2,1$). De uma forma generalizada, observa-se um maior número de raízes no substrato P+V comparativamente aos *jiffys* para todas as concentrações de AIB testadas, com a exceção de AIB 0,3%. Em substrato *jiffy*, 0,2% é a concentração que promove o maior

número de raízes, enquanto que em P+V, AIB 1% foi a mais satisfatória. A concentração de 0,3% é a menos satisfatória para ambos os substratos.

Em relação ao comprimento radicular (mm), observa-se que o tratamento T3 (0,2% AIB em substrato P+V) apresenta o melhor resultado, com valores de aproximadamente $63,9 \pm 4,9$ mm, não variando significativamente do tratamento T2 e T7 e T10. Por outro lado, T0 e T5 apresentam os valores mais reduzidos no comprimento radicular, demonstrando a ineficácia destes tratamentos no número de raízes, assim como no seu alongamento. Para ambos os substratos, a concentração 0,2% é aquela que mais favorece o alongamento radicular.

Considerando que os comprimentos iniciais dos rebentos utilizados para enraizamento tinham entre 20-25 mm, verificou-se também o desenvolvimento dos rebentos para todas os tratamentos durante a fase de enraizamento, sendo o melhor resultado para o tratamento T10 com $50,2 \pm 2,9$ mm, não variando significativamente dos tratamentos T0, T2, T3, T4, T5, T7, T8, T9 e T11. Por outro lado, o pior resultado é observado para a condição de controlo em substrato P+V, com valores de aproximadamente $30,9 \pm 4,1$ mm. De uma forma generalizada, a utilização de *jiffy*s conduz a um maior alongamento face a P+V para todas as concentrações, com a exceção de 0,4%.

Tabela 15: Efeito dos diferentes tratamentos na capacidade de indução de raízes (%), no número de raízes formadas por rebento e no seu comprimento (mm), assim como no comprimento dos rebentos (mm) em *Corema album*. Os parâmetros número de raízes, comprimento radicular (mm) e comprimento do rebento (mm) encontram-se representados como valor médio \pm ep. Valores médios inseridos na mesma coluna com a mesma letra não variam significativamente entre si ($p < 0,05$). A verde encontra-se assinalado o tratamento mais favorável para o enraizamento *ex vitro* de *Corema album*.

	Indução (AIB, %)	Substrato	Indução radicular (%)	Número de raízes \pm ep	Comprimento radicular (mm) \pm ep	Comprimento do rebento (mm) \pm ep
T0	0,0	<i>Jiffy</i>	7	$1,0 \pm 2,1$ b	$5,5 \pm 12,5$ d	$44,5 \pm 2,8$ ab
T1	0,0	P+V	7	$4,5 \pm 2,1$ ab	$17,5 \pm 12,5$ cd	$30,9 \pm 4,1$ c
T2	0,2	<i>Jiffy</i>	20	$5,3 \pm 1,2$ ab	$43,8 \pm 7,2$ abc	$47,0 \pm 2,9$ ab
T3	0,2	P+V	16	$6,3 \pm 0,8$ ab	$63,9 \pm 4,9$ a	$45,0 \pm 2,0$ ab
T4	0,3	<i>Jiffy</i>	6	$2,0 \pm 2,1$ ab	$25,0 \pm 12,5$ bcd	$48,3 \pm 2,8$ a
T5	0,3	P+V	6	$1,0 \pm 2,1$ b	$10,0 \pm 12,5$ d	$41,7 \pm 6,2$ ab
T6	0,4	<i>Jiffy</i>	10	$2,7 \pm 1,7$ ab	$27,7 \pm 10,2$ bcd	$36,0 \pm 2,5$ bc
T7	0,4	P+V	11	$5,0 \pm 1,0$ ab	$56,3 \pm 6,2$ ab	$50,0 \pm 2,6$ a
T8	0,5	<i>Jiffy</i>	20	$2,7 \pm 1,2$ ab	$24,8 \pm 7,2$ bcd	$47,8 \pm 2,6$ a
T9	0,5	P+V	10	$5,0 \pm 1,7$ ab	$27,7 \pm 10,2$ bcd	$46,3 \pm 6,2$ ab
T10	1,0	<i>Jiffy</i>	10	$4,7 \pm 1,7$ ab	$37,7 \pm 10,2$ abcd	$50,2 \pm 2,9$ a
T11	1,0	P+V	17	$7,2 \pm 1,3$ a	$25,6 \pm 10,2$ bcd	$49,2 \pm 3,2$ a

Em suma, tendo em consideração a capacidade de indução radicular, o número de raízes e o seu comprimento, poderemos considerar que a utilização de 0,2% de AIB será, das concentrações testadas, a mais eficaz na indução radicular de *Corema album*,

associada depois à expressão em *jiffys* (T2) ou P+V (T2), ainda que os valores mais elevados em termos de número e comprimento radicular estejam associados à combinação 0,2% AIB em substrato P+V (figura 14).



Figura 14: Rebentos de *Corema album* enraizados em substrato P+V, após a indução com 0,2 % AIB, a combinação mais promissora para o desenvolvimento radicular desta espécie. (A barra representa 25 mm).

Para além dos parâmetros quantitativos, avaliou-se também a ocorrência de contaminação. Esta verificou-se muito superior no caso dos *jiffys* comparativamente à P+V, onde se registou sobretudo o aparecimento de algas e fungos, um problema ultrapassado pela aplicação da solução antifúngica Mancozebe 1 g/L.

Relativamente à ocorrência de desordens fisiológicas como oxidação, esta observou-se de uma forma generalizada em todos os tratamentos testados, sobretudo na folhagem basal, que está em contacto com o substrato. Não se verifica formação de calo para nenhum dos tratamentos.

A taxa de sobrevivência dos rebentos enraizados, avaliada 30 dias depois da sua transferência para estufa, foi de 100% para todos os tratamentos, evidenciado uma capacidade de pré-aclimatização/aclimatização elevada e idêntica para todas as combinações estudadas (figura 15).



Figura 15: Transferência de rebentos enraizados *ex vitro* para vasos com a mistura perlite + turfa+ substrato comercial (1:2:1, v:v:v) (A). Rebroto enraizado *ex vitro*, com aspeto vigoroso (B).

2. Análise da estabilidade de ploidia das plantas micropropagadas

Para a análise da fidelidade genética (ploidia) do material obtido através do protocolo de micropropagação, quantificou-se o tamanho do genoma nuclear das plantas aclimatizadas e de plantas recolhidas em campo, recorrendo à técnica de citometria fluxo. O conteúdo genómico (pg ADN), assim como o coeficiente de variação (CV) (%) encontram-se representados na tabela 16.

Tabela 16: Conteúdo de ADN genómico (pg) e coeficiente de variação (%) das plantas micropropagadas e das plantas de campo de *Corema album*. O conteúdo de ADN (pg) e o CV (%) encontram-se representados como o valor médio \pm dp.

Material Vegetal	Conteúdo de ADN genómico (pg/2C) \pm dp	CV (%) \pm dp	CV mínimo (%)	CV máximo (%)
Planta de campo	1,21 \pm 0,03	5,30 \pm 0,47	4,69	5,71
Planta micropropagada	1,21 \pm 0,04	4,41 \pm 1,54	3,25	6,16

Através da comparação do conteúdo genómico recorrendo ao teste de *t-student*, verifica-se que não existem diferenças significativas ($p=0,9134$) entre as plantas de campo e plantas obtidas *in vitro*, excluindo-se a possível ocorrência de instabilidade de

ploidia durante o desenvolvimento do protocolo de micropropagação (tabela 16 e figura 16)

O valor médio do coeficiente de variação, indicativo da qualidade da amostra, apresenta um valor inferior, ainda que próximo dos 5% para as plantas micropropagadas e um valor superior a 5% para as plantas de campo. Para os dois tipos de material vegetal, observa-se que pelo menos uma das 3 réplicas possui os valores de CV mais elevados, superiores a 5%, revelando uma menor qualidade da amostra.

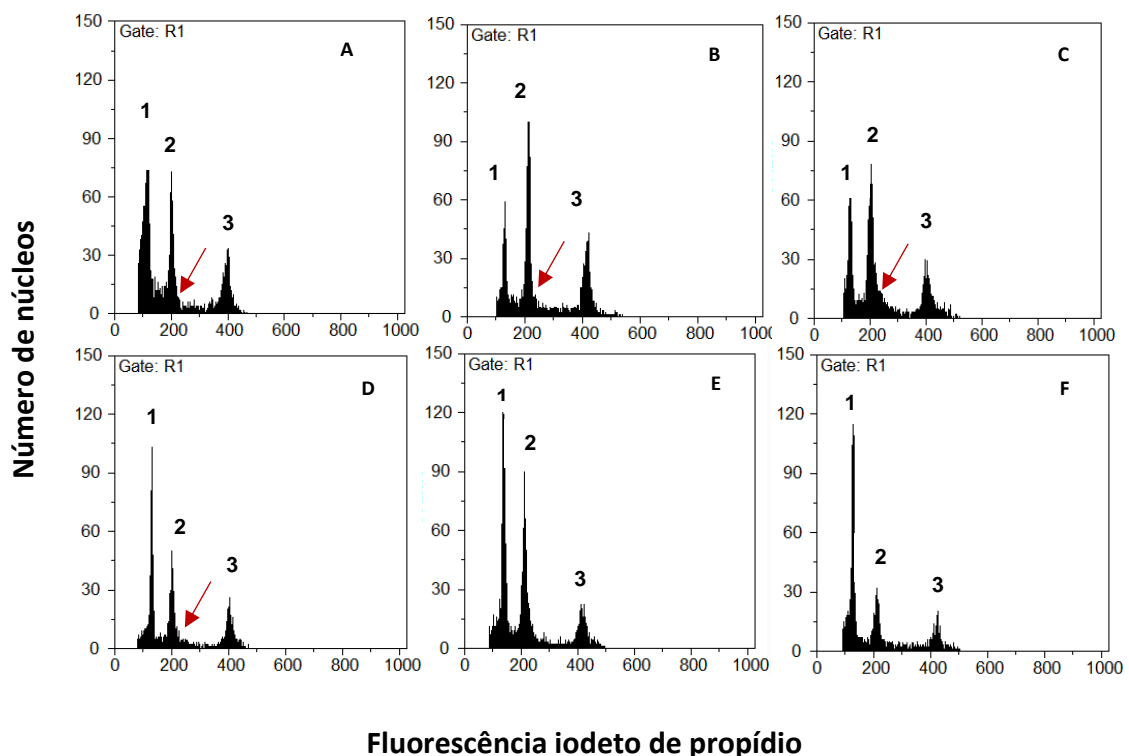


Figura 16 :Histogramas de citometria de fluxo representativos da intensidade da fluorescência relativa do iodeto de propídio obtidos após a análise simultânea de núcleos isolados de uma referência padrão (*Solanum lycopersicum*) e de plantas de campo (A-C) ou plantas micropropagadas (D-F) de *Corema album*. Em todos os histogramas (A, B, C, D, E e F), (1) corresponde à fase G0/G1 de *Corema album* e (2) à fase G0/G1 de *Solanum lycopersicum*. (3) representa a fase G2 da espécie padrão. A seta vermelha aponta para a região da fase G2 de *Corema album*.

3. Avaliação do estado oxidativo das plantas micropropagadas

3.1. Espécies reativas de oxigênio

3.1.1. Níveis de superóxido

A quantificação dos níveis de anião superóxido nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas encontra-se representada na figura 17.

Verifica-se a existência de diferenças significativas na quantidade de $O_2^{\cdot-}$ acumulada entre as plantas de campo e as plantas micropropagadas. Embora as plantas de campo apresentem níveis reduzidos desta ERO, as plantas micropropagadas

apresentam aproximadamente 13,6 vezes mais superóxido, conduzindo a níveis elevados deste radical.

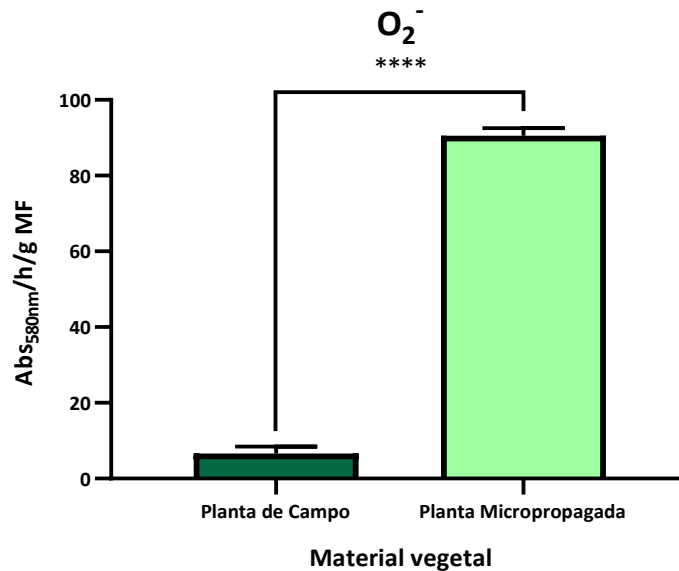


Figura 17: Níveis O_2^- nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

3.1.2. Níveis de peróxido de hidrogénio

Os níveis de peróxido de hidrogénio acumulado nas plantas recolhidas em campo e nas plantas produzidas *in vitro* encontram-se representados na figura 18.

Observa-se a ocorrência de diferenças significativas nos níveis de H_2O_2 entre os dois tipos de material vegetal. Os valores de peróxido de hidrogénio verificam-se bastantes superiores para as plantas de campo, existindo aproximadamente 13,5 vezes mais H_2O_2 nestas plantas comparativamente às plantas micropropagadas.

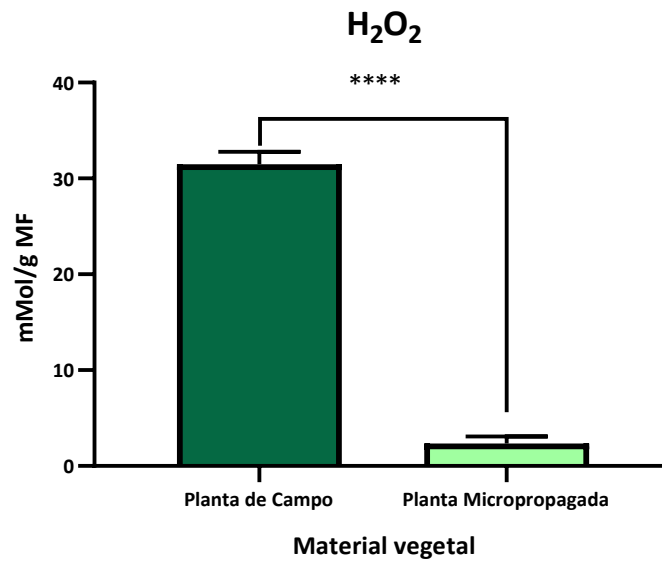


Figura 18: Níveis de H₂O₂ nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média ± dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

3.2. Atividade enzimática

3.2.1. Proteínas totais solúveis

O conteúdo das proteínas hidrossolúveis das plantas de campo e das plantas micropropagadas encontra-se representado na figura 19.

Observa-se a existência de diferenças significativas no conteúdo proteico nos dois tipos de material vegetal, apresentando as plantas de campo aproximadamente 1,7 vezes mais proteínas.

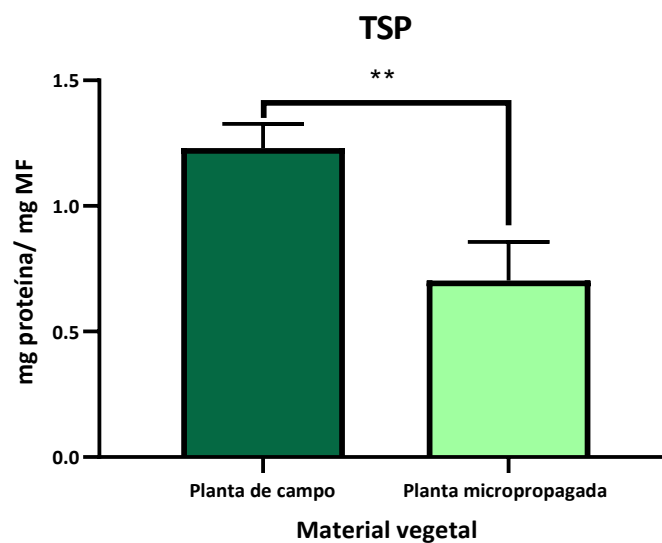


Figura 19: Conteúdo de proteínas totais solúveis nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média ± dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

3.2.2. Atividade superóxido dismutase

A atividade enzimática da SOD nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas encontra-se representada na figura 20.

Verifica-se que existem diferenças significativas na atividade da SOD entre as plantas recolhidas em campo e as plantas micropropagadas. As plantas de campo apresentam aproximadamente $1,26 \pm 0,13$ U SOD/mg proteína, enquanto que as plantas micropropagadas apresentam apenas $0,34 \pm 0,02$ U SOD/mg proteína, concluindo-se que a atividade da SOD é superior nas plantas de campo.

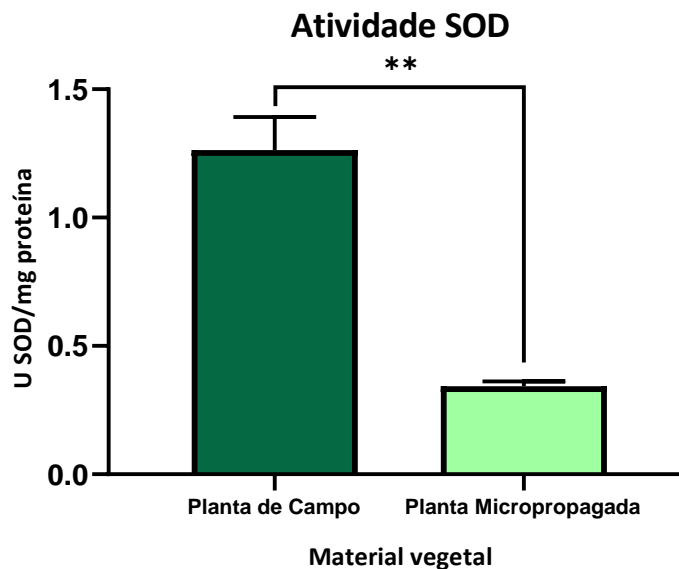


Figura 20: Atividade da SOD nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

3.2.3. Atividade ascorbato peroxidase

A atividade enzimática da APX nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas encontra-se representada na figura 21.

Verifica-se que não existem diferenças significativas na atividade da APX entre as plantas recolhidas em campo e as plantas obtidas através da metodologia de micropropagação, apesar da planta de campo apresentar uma atividade ligeiramente superior.

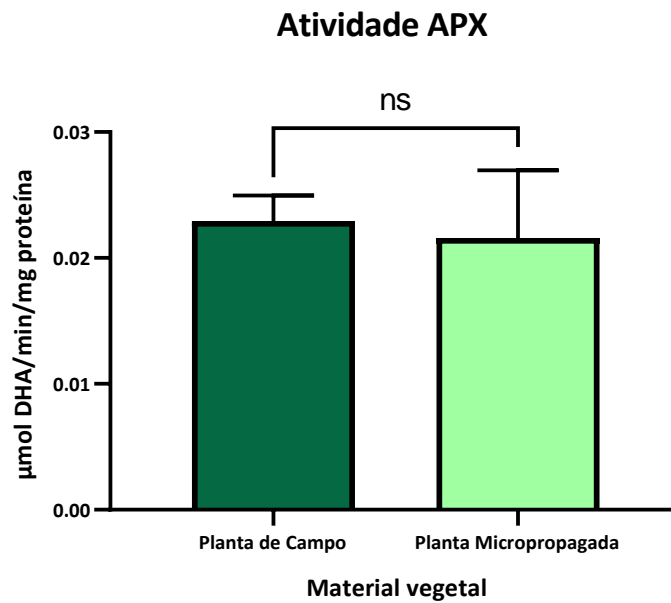


Figura 21: Atividade da APX nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. ns representa a ausência de diferenças significativas.

3.2.4. Atividade catalase

A atividade enzimática da CAT nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas encontra-se representada na figura 22.

Verifica-se que não existem diferenças significativas na atividade da CAT entre as plantas de campo e as plantas micropropagadas, apesar das plantas micropropagadas apresentarem uma atividade ligeiramente superior.

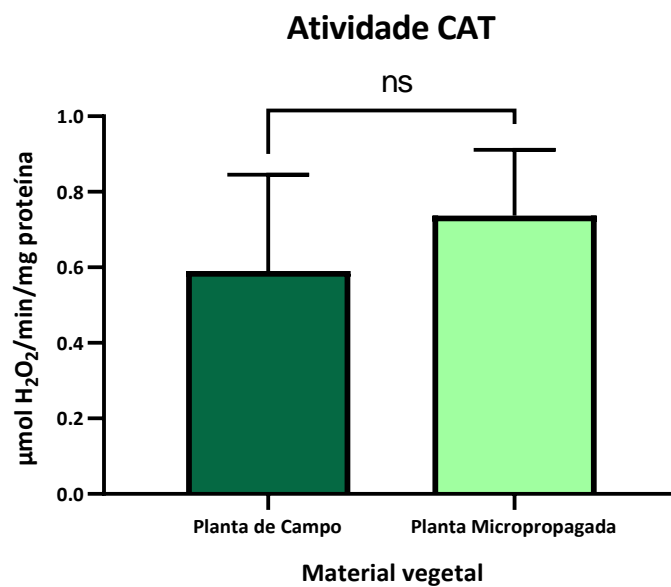


Figura 22: Atividade da CAT nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. ns representa a ausência de diferenças significativas.

3.2.5. Atividade guaiacol peroxidase

Os resultados da atividade da GPX para os dois tipos de material vegetal encontram-se representados na figura 23.

Verifica-se a existência de diferenças significativas na atividade da GPX entre as plantas recolhidas em campo e as plantas obtidas através da metodologia de micropropagação. Contrariamente ao que se verificou para a ascorbato peroxidase e para a catalase, cujas atividades não diferiam com o tipo de material vegetal, a atividade da guaiacol peroxidase é superior nas plantas de campo.

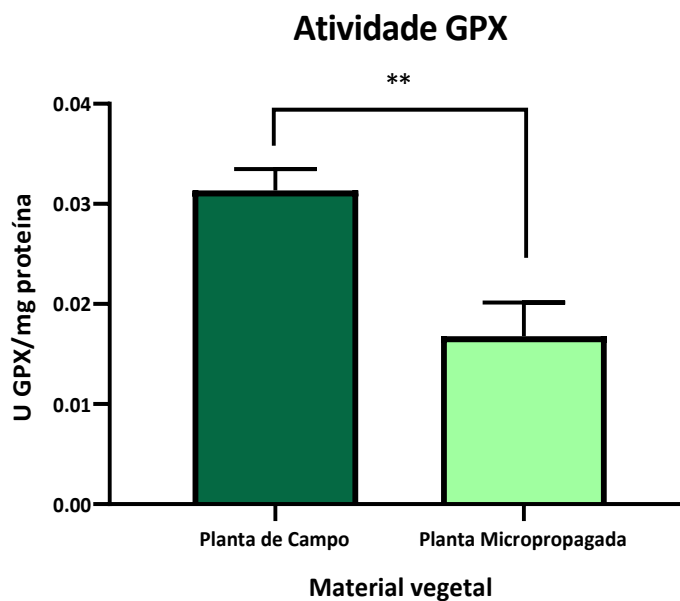


Figura 23: Atividade da GPX nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

3.3. Atividade não enzimática

3.3.1. Conteúdo total de fenóis

O conteúdo total de fenóis das plantas micropropagadas e das plantas de campo encontra-se representado na figura 24.

Verifica-se que o conteúdo total de fenóis varia significativamente com o tipo de material vegetal. As plantas de campo apresentam valores superiores às plantas micropropagadas, com um conteúdo total de fenóis aproximadamente 2,3 vezes maior.

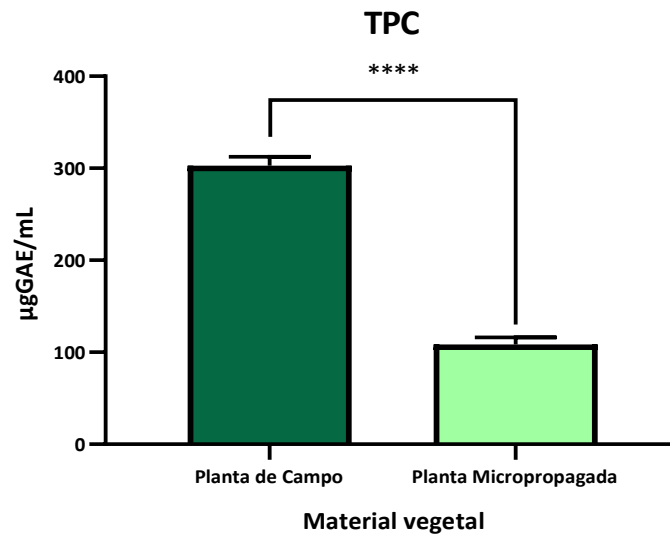


Figura 24: Conteúdo total de fenóis nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

3.3.2. Atividade antiradicalar

Os resultados da atividade antiradicalar das plantas de campo e das plantas micropropagadas encontram-se representados na figura 25.

Verifica-se a existência de diferenças significativas na atividade antiradicalar entre as plantas de campo e as plantas micropropagadas. Aquilo que se observa é que para a redução de 50% do DPPH, as plantas micropropagadas necessitam de aproximadamente 5,3 vezes mais material vegetal quando comparadas com as plantas de campo, exibindo assim uma atividade antiradicalar inferior.

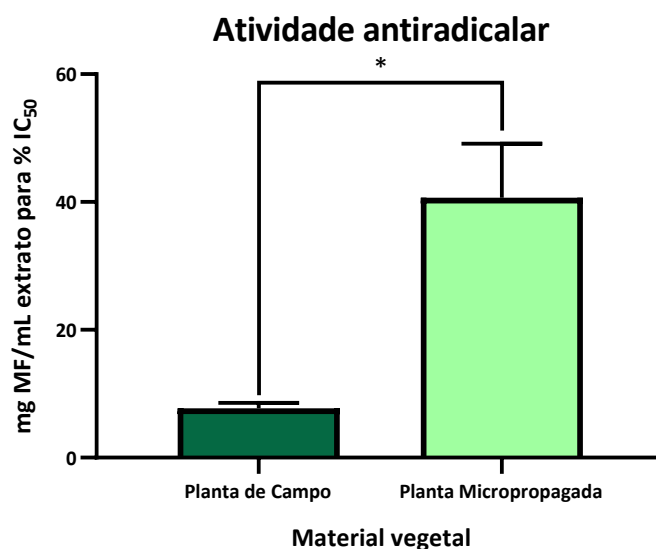


Figura 25: Atividade antiradicalar nas plantas de campo e nas plantas micropropagadas de *Corema album*. Os valores estão representados como média \pm dp. * representa as diferenças significativas (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

Discussão

1. Micropropagação

A regeneração de plantas *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica que oferece uma potencial solução para propagação de espécies de interesse comercial ou ameaçadas, que podem ser posteriormente transplantadas no seu *habitat* natural ou propagadas em larga escala para a obtenção de produtos de interesse (Chandana et al. 2018).

Embora já tenham sido realizados alguns avanços no estabelecimento e multiplicação da camarinha (Gonçalves & Pinto 2019), não está disponível um protocolo completo (até à aclimatização) para a sua propagação *in vitro*.

Para a otimização da fase de multiplicação, recorreu-se ao meio WPM (Lloyd & McCown 1980), que mostrou ser o melhor meio basal em termos de formação de rebentos para *Corema album*, tal como para outras espécies pertencentes à família Ericaceae como *Vaccinium arctostaphylos* (Cüce et al. 2013), *Vaccinium myrtillus* (Cüce & Sökmen 2015) e *Empetrum nigrum* (Han et al. 2010) e estudou-se a influência da combinação entre as citocininas 2iP+BAP, 2iP+mT e 2iP+Cin nas concentrações de 1mg/L, 2mg/L e 4mg/L para 2iP e 0,5 mg/L, 1mg/L e 2mg/L para as outras citocininas, sendo 2mg/L 2iP + 1mg/L BAP reconhecida como a combinação mais favorável até ao momento para a multiplicação desta espécie (Gonçalves & Pinto 2019).

Após os ensaios desenvolvidos em *Corema album*, tendo em consideração a capacidade de indução, número e comprimento dos novos rebentos formados, a combinação entre 2iP+Cin mostrou ser a mais indicada para a multiplicação desta espécie, sobretudo para as concentrações de 2mg/L 2iP e 1mg/L Cin. O regulador de crescimento 2iP é uma das citocininas mais comumente utilizadas na propagação *in vitro* de ericáceas, sendo vital a seleção da concentração ótima para cada espécie, uma vez que esta citocinina pode ter efeitos fitotóxicos (Zróbek-Sokolnik et al. 2011). Em *Arbustus unedo*, uma espécie pertencente à família Ericaceae, a adição isolada de cinetina ao meio de cultura apresentou melhor taxa de multiplicação, embora não varie significativamente das citocininas BAP e zeatina (Gomes 2011). Para além disso, em *Arbustus pavarii*, outro exemplo de ericácea, a cinetina apresentou-se como o regulador de crescimento mais benéfico em termos de alongamento dos rebentos formados (Elmaghabi et al. 2017). O mesmo foi observado em espécies como *Lagenaria siceraria* (Saha et al. 2007) e *Matthiola incana* (Hesar et al. 2011), filogeneticamente mais

distantes de *Corema album*. Na camarinha, o efeito sinérgico destas hormonas permitiu a indução de um número ótimo de rebentos, com um comprimento favorável.

Embora o efeito do número de subculturas na capacidade de multiplicação varie entre as espécies, na literatura está mencionado um declínio do potencial de multiplicação durante um longo período de subcultura em meio com a composição hormonal constante para seis espécies ornamentais e cultivares pertencentes à família *Rosaceae* (Norton & Norton 1986), duas cultivares de *Potentilla fruticosa* (Remphrey et al. 1993), várias plantas decorativas (Vardja & Vardja 2001), entre outras (Vujović et al. 2012). No entanto, para *Rubus pubescens* Raf. (Debnath 2004), verificou-se um aumento da multiplicação, assim como do tamanho dos rebentos e do número de folhas até à terceira subcultura, mantendo-se constantes posteriormente (Vujović et al. 2012). Para *Corema album*, observou-se a ocorrência de um aumento no número e comprimento dos novos rebentos para a maioria dos tratamentos da primeira para a segunda subcultura, sendo o controlo uma das exceções. Como seria de esperar, o controlo (sem citocininas), apresentou um dos piores resultados na formação de novos rebentos (indução e número), confirmando-se que a inclusão de citocininas no meio de cultura é geralmente necessária para a proliferação *in vitro* (Arab et al. 2014; Dobránszki & Teixeira da Silva 2010). Para além disso, verificou-se a diminuição no número de rebentos formados entre a primeira e segunda subculturas, o que poderá ser explicado pela habituação ao meio de cultura *stock* (2 mg/L 2iP + 1mg/L BAP), que poderá ter funcionado como um indutor da multiplicação na primeira subcultura. Apesar da ausência de citocininas não se mostrar favorável na formação de novos rebentos, apresenta um papel positivo no seu comprimento. Noutras espécies, a utilização de meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento também se mostrou vantajosa para o alongamento dos rebentos (Arab et al. 2014; Franklin et al. 2004).

Recentemente, a mT tem-se tornado também uma das citocininas de eleição na produção de plantas *in vitro* (Gentile et al. 2014; Koszeghi et al. 2014; Nowakowska et al. 2019), embora o seu efeito em espécies pertencentes à família *Ericaceae* ainda não esteja descrito na literatura. A aplicação desta citocinina já demonstrou evitar problemas relacionados com a dificuldade de regeneração de algumas espécies, baixa capacidade de enraizamento devido ao efeito prévio de outras citocininas, assim como na redução da mortalidade durante a fase de aclimatização em condições *ex vitro* (Amoo et al. 2015; Amoo & Van Staden 2012; Aremu et al. 2012; Nowakowska et al. 2019; Tarkowská et al. 2003). No entanto, para *Corema album*, a adição simultânea de 2iP+mT é a combinação hormonal que gera os piores resultados na formação de rebentos

superiores a 5 mm, assim como no alongamento dos mesmos, sobretudo em concentrações de 2iP mais elevadas. Por outro lado, esta apresenta-se como a combinação com maior capacidade de regenerar rebentos de dimensões reduzidas (<5mm), o que revela a forte capacidade de indução de novas formações meristemáticas, aliada à incapacidade de alongamento. A combinação entre 2iP+BAP apresentou resultados similares, ainda que mais elevados para todos os parâmetros.

Em suma, após a realização deste estudo encontrou-se uma nova combinação hormonal mais favorável à multiplicação de *Corema album*, que ao final de duas subculturas permitiu uma indução de 100% e aproximadamente 6,8 novos rebentos, com um tamanho médio de 14,2 mm.

Apesar da multiplicação de *Corema album* não ser fortemente afetada pela ocorrência de desordens fisiológicas como a oxidação e hiperhidricidade, verificou-se um ligeiro aumento desta última com o aumento da concentração de 2iP. A hiperhidricidade é o termo proposto para designar as malformações hiperhídricas que frequentemente afetam os rebentos herbáceos e lenhosos durante a sua propagação vegetativa *in vitro* (Debergh et al. 1992; Kevers et al. 2004). Este fenómeno é induzido pela ação combinada de vários fatores físicos e/ou químicos do ambiente de cultura e, embora a maioria das plantas se consiga adaptar a estas condições ambientais, algumas delas tornam-se anormais com um aspeto translúcido, devido à deficiência de clorofila e a um elevado conteúdo em água, o que poderá conduzir à perda de capacidade proliferativa dos explantes e conseqüente perda das culturas (Debergh 1983; Gaspar 1991; Quiala et al. 2014). A observação feita em *Corema album* para este parâmetro está de acordo com Williams & Taji (1991), que defendem que o aumento da concentração das citocininas, com o intuito de maximizar a taxa de multiplicação, por vezes corresponde à ocorrência de vitrificação. Apesar de vários estudos relatarem uma maior ocorrência de vitrificação aquando da adição individual de BAP (van der Westhuizen 2014), para *Corema album* a combinação de 2iP com BAP, mT ou Cin gera resultados semelhantes para este parâmetro.

A automatização, através da utilização de biorreatores, é uma das formas mais efetivas de reduzir os custos associados à micropropagação (Paek et al. 2001). A literatura demonstra que o uso de biorreatores em detrimento dos métodos de micropropagação tradicionais foi empregue em várias espécies pertencentes à família *Ericaceae* (Debnath 2011; Jesionek et al. 2017). Porém, apesar de todas as vantagens associadas aos biorreatores, a ocorrência de fenómenos anormais como a hiperhidricidade aquando do desenvolvimento vegetal representa um dos maiores

problemas (Ziv 2000), pelo que a utilização de sistemas de imersão temporária surge com intuito de reduzir este fenómeno.

Para a multiplicação de *Corema album*, recorrendo à utilização de biorreatores de imersão temporária, o melhor resultado em termos de formação de rebentos com maior qualidade foi conseguido para o meio de cultura suplementado com citocininas, com rede no biorreator e para uma frequência e duração de imersão e arejamento de 3' a cada 12h e 1' a cada 4h, respetivamente. A manipulação da frequência e da duração do período de imersão é um fator fundamental para a obtenção de um maior coeficiente de multiplicação e melhor qualidade dos explantes em sistemas de imersão temporários (Castro & Gonzáles 2002; de Oliveira et al. 2014), uma vez que controla a absorção de nutrientes e a ocorrência de hiperhidricidade (de Oliveira et al. 2014; Etienne & Berthouly 2002). Vários estudos corroboram também a importância do ambiente gasosos dos recipientes de cultura no desenvolvimento vegetal (Afreeen 2006; Chakrabarty et al. 2006; de Oliveira et al. 2014 Gaspar 1991b; Ziv 1995, 1991b), assim como o arejamento e as trocas gasosas como medida de prevenção a situações de stresse como a hiperhidricidade (de Oliveira et al. 2014; Majada et al. 2000; Park et al. 2004). Lai et al. (2005) relatam a importância da ventilação na redução da humidade relativa no interior do recipiente, assim como na remoção de etileno, CO₂ e outros componentes voláteis que possam contribuir para a ocorrência de vitrificação.

A utilização de um suporte físico para colocar os explantes, promovendo o seu contacto parcial com o meio de cultura, apresentou efeitos positivos na diminuição de ocorrência de hiperhidricidade, afetando consecutivamente a mortalidade, a capacidade de indução e o número de novos rebentos formados. O mesmo foi observado para a micropropagação da castanha híbrida em biorreator (Vidal et al. 2015).

Quando comparada a capacidade de multiplicação de *Corema album* entre os biorreatores e os frascos de cultura, observa-se que os sistemas BIT nas melhores condições físicas encontradas, são capazes de gerar aproximadamente 3 vezes mais rebentos do que a micropropagação tradicional em meio de cultura gelificado. Estes resultados foram também observados para outras espécies (Businge et al. 2017; Hahn & Paek 2005; Ross & Castillo 2009). Um dos motivos que favorece a multiplicação em biorreator face ao frasco de cultura é o facto do meio de cultura líquido promover um maior contacto entre o explante e o meio de cultura, facilitando a absorção de água e nutrientes, assim como como a diluição de exudados tóxicos (Monteiro et al. 2018; Weckx et al. 2019). Por outro lado, a percentagem de indução de novos rebentos é inferior quando comparada aos frascos de cultura, o que poderá ser explicado pela

ausência de desenvolvimento dos explantes devido à ocorrência de vitrificação, pois uma das limitações associadas a este fenómeno é a perda irreversível da capacidade de multiplicação e do potencial de regeneração (Sreedhar et al. 2009), conduzindo por vezes à morte (Machado et al. 2014).

Embora na multiplicação da camarinha a utilização de sistemas de imersão temporária suplementados de suportes físicos para os explantes tenha permitido a formação de mais e maiores rebentos, a melhoria da sua qualidade poderá ser conseguida através da otimização da frequência e duração do período de imersão e arejamento.

O enraizamento de rebentos produzidos *in vitro* é uma fase extremamente importante aquando do processo de micropropagação (Dabski & Parzymies 2007). No entanto, este é também um dos maiores obstáculos da cultura de tecidos vegetais (de Klerk 2002), sobretudo para espécies lenhosas (Singh et al. 2014).

As propriedades de enraizamento das auxinas e a sua importância na propagação vegetal foram reconhecidas há muito tempo atrás (Thimann & Went 1934) e embora estas sejam os principais fatores envolvidos no processo de enraizamento, outros fatores endógenos e exógenos também são capazes de influenciar a rizogénese, nomeadamente a concentração do meio de cultura basal, a concentração de carbohidatos, a luz ou obscuridade, assim como a presença e ausência de compostos fenólicos no meio de cultura (Zavattieri et al. 2007).

A necessidade de aplicação de auxinas exógenas com o intuito de induzir a formação radicular nos rebentos foi reportada para uma grande diversidade de espécies (Caboni et al. 1997; Edson et al. 1996; Fett-Neto et al. 2001; Greenwood & Weir 1994; Qaddoury & Amssa 2004; Thimann & Went 1934). Na micropropagação de vários elementos pertencentes à família Ericaceae, as auxinas AIB, AIA e ANA são as mais utilizadas para a formação de raízes *in vitro* (Cüce & Sökmen 2015; Cüce et al. 2013; Magnitskiy et al. 2011; Mohamed et al. 2018).

No primeiro estudo, verificou-se que a utilização individual ou combinada das auxinas anteriormente mencionadas, através da sua incorporação no meio de cultura ou pela metodologia de *dipping*, conjuntamente com a redução da concentração dos macronutrientes do meio WPM para metade, e da sacarose para 20 mg/L não conduziu à formação de raízes em *Corema album*. A redução da força iónica do meio de cultura, através da diminuição da concentração dos macronutrientes para metade, acompanhada pela redução simultânea da concentração de sacarose é uma das metodologias mais utilizadas para o melhoramento do enraizamento *in vitro* (Canhoto

2010). Apesar da formulação de WPM com metade da sua concentração ser utilizada no enraizamento de outras espécies pertencentes à família Ericaceae (Han et al. 2013; Woo & Wetzstein 2008), não apresentou qualquer efeito no enraizamento da camarinha. Por outro lado, no que diz respeito ao comprimento dos rebentos não enraizados, AIB foi a auxina que melhor promoveu o alongamento dos rebentos, sobretudo pela sua incorporação no meio de cultura na concentração de 2 mg/L ou por *dipping* dos rebentos durante 2 minutos. O efeito positivo desta auxina no alongamento já foi demonstrado em espécies como *Pisum sativum* (Yang & Davies 1999).

Tendo em consideração os resultados obtidos no primeiro ensaio de enraizamento *in vitro*, realizou-se um novo ensaio com o objetivo de encontrar combinações de tratamentos indutores e promotores de rizogénese. Desta forma, avaliou-se a indução radicular recorrendo a duas concentrações distintas de AIB, a influência da obscuridade na fase de indução e a adição de carvão ativado na fase de expressão e alongamento radicular.

Uma vez que o AIB é a auxina mais utilizada para estimular o enraizamento devido à sua propensão para promover a iniciação radicular e à sua fraca toxicidade e elevada estabilidade quando comparada com o AIA e ANA (Namli et al. 2011), foi estudada a sua capacidade de indução radicular em duas concentrações distintas e superiores às utilizadas anteriormente. Apesar da adição de AIB ao meio de cultura não ter promovido o enraizamento para nenhum dos tratamentos, verificou-se que a sua presença ajuda na promoção do alongamento, já que para todas as condições onde não ocorreu indução com este regulador de crescimento, o comprimento dos rebentos é inferior quando comparado com os tratamentos onde ocorreu indução com auxina.

A literatura suporta que para muitas plantas lenhosas, o enraizamento é superior quando os rebentos são incubados em obscuridade durante a fase inicial, com posterior transferência para ambiente luminoso (McCown 1988; Sanchez et al. 1996). No caso da camarinha, a fase de indução (fase inicial) teve uma duração de 5 dias, com posterior transferência para meio de cultura sem reguladores de crescimento, na presença de luz, com ou sem carvão ativado. Neste estudo, verificou-se que a presença ou ausência de luz na fase indutora não teve qualquer influência na formação de raízes, no entanto observou-se que para os tratamentos com utilização de auxina, os piores resultados no alongamento estão associados à fase de indução na presença de luz. Apesar do AIB apresentar uma estabilidade superior quando comparado com outras auxinas, este pode sofrer alguma decomposição na presença de luz, e consequentemente reduzir a sua atividade (Nor et al. 2009).

O carvão ativado é frequentemente utilizado na cultura de tecidos vegetais com o intuito de promover o crescimento e desenvolvimento celular (Buckseth et al. 2018). O efeito estimulador do carvão ativado ao nível do enraizamento encontra-se relacionado com a redução da intensidade luminosa na base do rebento, providenciando um ambiente propício à acumulação de auxinas, dos seus cofatores ou de ambos, assim como a adsorção de substâncias como compostos fenólicos e excesso de auxinas e citocininas provenientes de um meio de cultura anterior (Arthur et al. 2006; Thwe et al. 2015). Embora a adição de carvão ativado no meio de cultura tenha apresentado os melhores resultados na formação de raízes para *Vaccinium myrtillus* (Ericaceae) (Cüce & Sökmen 2015), no presente estudo a adição deste composto não teve qualquer influência no enraizamento ou no alongamento dos rebentos não enraizados. Desta forma, a indução radicular com AIB, associada à ausência de luz nesta fase, com posterior transferência para um novo meio de cultura sem auxinas na presença de luz, suplementado ou não por carvão ativado é a combinação que melhor promove o alongamento dos rebentos em *Corema album*.

Ambas as metodologias, apesar de não promoverem a formação radicular permitem o alongamento dos rebentos para posterior enraizamento *ex vitro*. Apesar de não ter sido testado o meio de cultura base, sem a redução dos macronutrientes e da sacarose e, portanto, não ser possível excluir o meio utilizado como motivo de não ocorrência de enraizamento, considera-se que a regeneração de raízes *in vitro* para a espécie *Corema album* é de grande dificuldade, verificando-se recalcitrante para esta etapa. A recalcitrância é a inabilidade das células, tecidos e órgãos vegetais responderem à cultura de tecidos. Esta pode ocorrer em todas as fases da cultura (Benson 2000) e geralmente apresenta uma conotação genética (Mccown 2000) ou está relacionada a fatores como a fisiologia vegetal ou o stresse da cultura *in vitro* (Benson 2000; Carra et al. 2019). Para muitas espécies vegetais, que apresentam dificuldades de enraizamento em condições *in vitro* ou durante a aclimatização, a utilização de metodologias de enraizamento *ex vitro* surge como resposta a estas problemáticas (Annapurna and Rathore 2010; Benmahioul et al. 2012a; Huang et al. 2011; Saiju 2006).

A maioria dos estudos relacionados com o enraizamento *ex vitro* focam-se sobretudo no tratamento auxínico aplicado nos rebentos não enraizados (Aygün & Dumanoglu 2015; Benmahioul et al. 2012; Shekafandeh & Shahcheraghi 2017), no entanto, ao longo dos anos houve um interesse crescente por parte da comunidade científica no efeito de outros fatores no sucesso desta fase. De entre esses fatores, é possível destacar a utilização de diferentes substratos (Doina et al. 2015), as condições

de luminosidade (Wozny & Miler 2016), a aplicação de citocininas em fases prévias da cultura (Benmahiou et al. 2012b), o número de subculturas (Leva 2011) e o tipo e concentração da fonte de carbono (Bohra et al. 2016). Neste estudo, avaliou-se o efeito do choque auxínico com diferentes concentrações de AIB combinadas com dois substratos distintos na formação e no desenvolvimento radicular de *Corema album*.

A indução radicular foi realizada recorrendo às concentrações de 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1,0% AIB, com posterior desenvolvimento radicular em substrato *jiffy* ou P+V. Várias espécies foram enraizadas e aclimatizadas com sucesso em ambos os substratos (Clapa et al. 2013; Dodds 1983; Vescan et al. 2012). No entanto, em *Corema album*, verificou-se que a indução radicular foi baixa para todos os tratamentos testados, sobretudo para a concentração de 0,3% AIB associada a qualquer um dos substratos, com uma capacidade de indução inferior aos controlos. Tendo em consideração que todas as outras concentrações apresentaram resultados superiores face aos controlos, a fraca indução de 0,3% AIB, poderá estar sobretudo relacionada com o estado físico do regulador de crescimento, demonstrando que a utilização de hormona em gel apresenta efeitos negativos na indução radicular de *Corema album*. O facto das condições controlo (sem indução com AIB) apresentarem indução radicular, ainda que reduzida, ocorre, provavelmente, devido à concentração endógena de AIA. Esta auxina, que é naturalmente produzida nas plantas, desloca-se em direção à parte inferior e aumenta a sua concentração ao nível da base, o que conjuntamente com outras substâncias endógenas, estimula a formação radicular (Lone et al. 2010).

De acordo com Martins et al. (2013), o bom desenvolvimento do sistema radicular no que diz respeito ao número de raízes e ao seu comprimento é fundamental para a maior exploração do solo, promovendo a absorção de água e nutrientes e melhorando o crescimento da planta. Desta forma, a associação entre 0,2% AIB com substrato P+V foi a combinação que se observou mais promissora, permitindo simultaneamente a indução radicular (perto do valor máximo observado para *Corema album*) e um número razoável de raízes com o maior comprimento observado. Apesar de este ser o primeiro registo relativo ao enraizamento de rebentos de camarinha provenientes de multiplicação *in vitro*, um estudo relacionado com o enraizamento *ex vitro* de estacas de *Corema album*, também evidenciou esta associação como a mais promissora, com percentagem de indução radicular de 60% (Álvarez-Cansino et al. 2017).

A rizogénese *ex vitro* oferece a oportunidade de melhorar a micropropagação, não apenas do ponto de vista biológico, mas também económico. As plantas

desenvolvidas a partir do enraizamento *ex vitro* apresentam múltiplas vantagens comparativamente aquelas desenvolvidas *in vitro*, nomeadamente um melhor sistema radicular, com um maior número de raízes, que facilita a aclimatização e conduz a uma maior percentagem de plantas sobreviventes (Benmahioul et al. 2012; Gonçalves et al. 1998; Yan et al. 2010). Para além disso, o enraizamento *ex vitro* diminui os custos e a manipulação da cultura, uma vez que o enraizamento e a aclimatização (pré-aclimatização) são realizados simultaneamente (Phulwaria et al. 2012). Durante a fase de aclimatização pretende-se preparar as plantas para as condições exteriores pela: 1) diminuição gradual das taxas de transpiração dos estomas e da cutícula através da regulação da abertura estomática e do desenvolvimento da espessura cuticular, conseguida pela diminuição controlada da humidade relativa (HR%) (Pospíšilová et al. 1999); 2) adaptação dos cloroplastos e toda a maquinaria fotossintética ao aumento da intensidade luminosa, com transição de um regime de heterotrofia/mixotrofia para autotrofia (Kozai 1991) e 3) regulação da absorção e translocação de água e nutrientes, conseguido pelo bom desenvolvimento e condutividade do sistema radicular (Fila et al. 1998). Tendo em consideração que neste estudo a taxa de sobrevivência das plantas foi de 100% para todos os tratamentos testados, verifica-se que todos estes objetivos foram atingidos através da utilização simultânea da metodologia de enraizamento *ex vitro* e pré-aclimatização. Vários estudos apresentaram valores idênticos de sobrevivência para o enraizamento *ex vitro* de outras espécies (Shekhawat & Manokari 2015; Yan et al. 2010b).

2. Estabilidade de ploidia das plantas micropropagadas

A ocorrência de instabilidade genética é um dos maiores obstáculos aquando da propagação *in vitro* (Tawar et al. 2008). Geralmente, as plântulas derivadas da cultura de tecidos são reconhecidas por exibirem variações somaclonais (Larkin & Scowcroft 1981), frequentemente resultantes de um elevado número de subculturas, mudanças na relação auxina/citocinina, tipo de explante (Modgil et al. 2005), elevada concentração de reguladores de crescimento (Bairu et al. 2011), assim como pelo stresse oxidativo que conduz à produção de radicais livres e conseqüentemente ao dano no ADN (Jackson et al. 1998). Estas variações podem manifestar-se sobretudo através de alterações epigenéticas (eg: acetilação/metilação das histonas ou metilação do ADN), mutações que podem ser pontuais (eg: em bases), ou grandes mutações que implicam alterações da ploidia (eg: euploidias ou aneuploidias) (Krishna et al. 2016).

A variação somaclonal geralmente altera a morfologia das plantas produzidas *in vitro*, podendo ser detetada visualmente. No entanto, para uma análise mais precisa são

frequentemente aplicadas técnicas de rastreio moleculares (eg: microssatélites) e/ou de análise da ploidia (Sliwinska 2018). A citometria de fluxo, associada à utilização do iodeto de propídio (um fluorocromo específico para ácidos nucleicos), tem-se mostrado uma técnica simples, rápida e reprodutível para a determinação do conteúdo de ADN e da variação da ploidia na cultura de tecidos vegetais (Escobedo-Gracia-Medrano et al. 2018).

O uso da citometria de fluxo no estudo do conteúdo genómico das plantas micropropagadas de *Corema album* permitiu descartar a ocorrência de variação somaclonal associada a alterações de ploidia, validando o protocolo de micropropagação para a obtenção de plantas *true-to-type* desta espécie. A qualidade da análise de citometria de fluxo foi estabelecida através do valor do coeficiente de variação (%), que é um critério elementar para a validação de métodos citológicos (Loureiro & Santos 2004). Galbraith et al. (2002) estabeleceram um $CV < 5\%$ como critério de aceitação. Embora em algumas amostras de *Corema album*, os valores sejam superiores ao comumente aceite, para muitas espécies recalcitrantes, como muitas plantas lenhosas, a obtenção dos valores recomendados é muito difícil ou até mesmo impossível (Loureiro & Santos 2004). Apesar de não se verificarem alterações na ploidia através do uso da citometria de fluxo, esta técnica dá informação limitada acerca de outras alterações que podem ter ocorrido na planta, nomeadamente as mutações pontuais. Desta forma, posteriormente, será interessante utilizar outras metodologias (eg: marcadores moleculares) para descartar este tipo de instabilidade.

Este é também um dos primeiros estudos reportando a quantificação do genoma desta espécie.

3. Estado oxidativo das plantas micropropagadas

A homeostasia de espécies reativas de oxigénio nas células é conseguida através do balanço entre a produção de ERO e a sua eliminação pelos compostos e enzimas antioxidantes (Mittler et al. 2004). Neste estudo, avaliou-se o estado oxidativo das plantas aclimatizadas de *Corema album* utilizando como referência plantas da mesma espécie recolhidas em campo. O principal foco recaiu no envolvimento dos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos na eliminação de ERO.

O estado oxidativo das plantas foi seguido através da determinação dos níveis de ERO ($O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2). Verificou-se que o anião superóxido se encontra presente em níveis mais elevados na planta micropropagadas, contrariamente aos níveis de H_2O_2 , que são aproximadamente 15,6 vezes superiores na planta de campo. Tendo em consideração que o $O_2^{\cdot -}$ possui uma meia vida bastante reduzida e é produzido

localmente, a determinação quantitativa dos seus níveis nem sempre descreve com precisão aquilo que está a acontecer na planta (Demidchik 2015), porém a maior quantidade de H_2O_2 nas plantas de campo pode ocorrer devido à rápida e eficiente dismutação do superóxido. Os níveis elevados de H_2O_2 na planta de campo foram acompanhados por uma elevada atividade da SOD, a enzima responsável pela dismutação do O_2^- em H_2O_2 e O_2 (Banowetz et al. 2004; Fridovich 1975). Na planta micropropagada, a maior acumulação de O_2^- , provavelmente consequência do stresse aquando da micropropagação sobretudo durante a fase de aclimatização, está de acordo com a menor atividade da SOD.

Uma vez que H_2O_2 é uma ERO com uma meia vida mais longa que o anião superóxido, com capacidade de se difundir entre as membranas e em concentrações mais elevadas gerar dano oxidativo em regiões distantes do seu local de produção (Sharma et al. 2012), existem vários mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos capazes de controlar os níveis celulares desta ERO. Neste estudo, a APX, CAT e GPX são as enzimas antioxidantes responsáveis pelo controlo dos níveis de H_2O_2 .

Em geral, não se verificaram alterações significativas na atividade da CAT entre plantas micropropagadas e de campo. Esta enzima, contrariamente à APX e à GPX, não necessita de um substrato como dador de eletrões para a redução do H_2O_2 (Sharma et al. 2012), e o facto da sua atividade não variar significativamente entre as plantas de campo e as plantas micropropagadas poderá ser explicada pelo papel menos relevante da catalase na remoção do H_2O_2 em *Corema album*, comparativamente às outras peroxidases. Por exemplo, isto poderá acontecer porque nos cloroplastos e mitocôndrias (organelos chave dos processos energéticos) onde a maioria do O_2^- é formado, a sua presença é menor (Halliwell 2006).

Tal como na CAT, também não se observam diferenças significativas no envolvimento da APX entre as plantas micropropagadas e as de campo, sugerindo que nesta espécie a via da APX pode ter pouca relevância no controlo antioxidante.

Já a atividade da GPX é significativamente maior nas plantas de campo, sugerindo uma ativação desta enzima para controlar os elevados níveis de H_2O_2 destas plantas comparativamente às plantas micropropagadas. No caso da GPX, para que esta enzima possa decompor o H_2O_2 é necessário que certos compostos fenólicos (eg: guaiacol) sejam utilizados como dadores de eletrões (Asada 1994). Desta forma, a maior atividade desta peroxidase nas plantas de campo também poderá estar relacionada com a maior acumulação de compostos fenólicos.

Relativamente ao conteúdo total de proteínas solúveis, verificou-se que as plantas de campo apresentam uma maior riqueza proteica. Tendo em consideração que a RuBisCO representa 30-50% do total de proteínas solúveis das folhas das plantas C3 (Erb & Zarzycki 2018), já seria de esperar a maior riqueza das plantas de campo face às micropropagadas, devido à maior taxa fotossintética esperada. No entanto, posteriormente, esta hipótese deve ser confirmada através de estudos moleculares.

Para além dos sistemas enzimáticos, as plantas podem recorrer aos antioxidantes não enzimáticos, como os compostos fenólicos, para a redução dos níveis de ERO. Os compostos fenólicos representam o grupo mais importante de antioxidantes naturais (Gonçalves et al. 2017; Huyut et al. 2017) e a sua atividade antioxidante relaciona-se sobretudo com as suas propriedades redox, que apresentam um papel importante na adsorção e neutralização de radicais livres, na quelatação de singletos e tripletos de oxigénio e na decomposição de peróxidos (Khateeb et al. 2017; Zheng & Wang 2001). Neste estudo, a quantificação da totalidade dos compostos fenólicos revelou que as plantas de campo possuem aproximadamente 2,8 vezes mais compostos fenólicos comparativamente às plantas obtidas *in vitro*. Para além disso, através da avaliação da atividade antiradicalar, verificou-se que as plantas de campo apresentam uma capacidade antioxidante bastante superior às plantas micropropagadas, observando-se uma correlação positiva entre os dois parâmetros estudados. Esta correlação foi previamente demonstrada por vários autores (Cai et al. 2004; Maizura et al. 2011; Moldovan et al. 2011; Shan et al. 2005; Wong et al. 2006; Wu et al. 2006). Diversos estudos também evidenciam a maior acumulação de compostos fenólicos e a maior atividade antioxidante em plantas de campo quando comparadas com as micropropagadas. Por exemplo Costa et al. (2012) referem que o conteúdo total de compostos fenólicos e a atividade antioxidante das plantas selvagens de *Thymus lotocephalos* é superior quando comparada com as plantas desenvolvidas *in vitro*. Outro estudo comparativo, concluiu que as plantas de campo de *Arnica montana* apresentam uma maior atividade antiradicalar, assim como uma maior riqueza em polifenóis quando comparada com as amostras de plantas em estufas resultantes da metodologia *in vitro* (Nikolova et al. 2013).

Em suma, verifica-se que os dois tipos de material vegetal apresentam acumulação de ERO de forma distinta, o que sugere diferentes vias de formação/neutralização destas moléculas. No entanto, estas diferenças não se encontram apenas dependentes do tipo e origem das plantas (micropropagada vs zigótica), existem outros fatores como a idade e as condições de crescimento que

podem contribuir para estes resultados. No que diz respeito às plantas de campo, a grande acumulação de H_2O_2 está sobretudo relacionada com a maior atividade da SOD, no entanto no caso das plantas micropropagadas a menor atividade desta enzima sugere um ajuste da sua atividade ao longo do tempo. A semelhança da atividade enzimática da CAT e APX entre as plantas micropropagadas e as plantas de campo sugere a menor relevância destas enzimas na eliminação de H_2O_2 em *Corema album*, que parece ser sobretudo realizada pelos compostos fenólicos, diretamente como antioxidantes, ou pela sua participação como substrato de enzimas (GPX).

Tendo em consideração que uma das principais aplicações do protocolo de micropropagação de *Corema album* é a regeneração não natural das suas populações, é de esperar que quando transferidas para o seu *habitat* natural, as plantas resultantes da metodologia *in vitro* desenvolvam os mecanismos antioxidantes de forma semelhante à planta de campo, com uma maior acumulação de compostos fenólicos e possivelmente com uma maior resposta da GPX ao aumento dos níveis de H_2O_2 .

Apesar da acumulação de $O_2^{\cdot-}$ observada não atingir níveis letais para a planta micropropagada, deverão ser realizados outros estudos mais informativos que envolvam a quantificação de ERO mais reativos (eg: OH^{\cdot}), assim como estudos relacionados com a integridade membranar. Para além disso, será interesse estudar a fisiologia da planta não apenas do ponto de vista oxidativo, mas também relacionada com a sua performance fotossintética.

Conclusões e perspectivas futuras

Corema album tem despertado um interesse crescente por parte da população e da comunidade científica devido ao seu interesse como fonte alimentar e ao seu potencial medicinal maioritariamente associado às propriedades antioxidantes das suas folhas e frutos. No entanto, tal como outras espécies, neste momento, a camarinha encontra-se em perigo de extinção, sobretudo devido à regressão do seu *habitat* natural, consequência dos efeitos antropogénicos.

Esta dissertação permitiu o desenvolvimento e otimização de um protocolo robusto (figura 26) de micropropagação de *Corema album*, que permitirá a regeneração de plantas para potencial uso industrial e/ou replantação em *habitats* naturais. Para além de robusto, o protocolo mostrou-se eficiente em termos de multiplicação, com uma capacidade de indução de 100% e com a formação de um número médio de 6,8 rebentos na 2ª subcultura. Embora o enraizamento *in vitro* não tenha sido alcançado para esta espécie, indicando a sua recalcitrância para esta fase, foram encontradas várias condições propícias ao alongamento *in vitro* dos rebentos após a multiplicação e antes do seu enraizamento/pré-aclimatização em condições *ex vitro*. O enraizamento *ex vitro* apresenta já uma taxa de sucesso aceitável em termos de indução radicular, e permitiu a formação de um sistema radicular desenvolvido, que conjuntamente com as restantes adaptações da planta durante a pré aclimatização/ aclimatização conduziu a uma sobrevivência de 100% dos indivíduos enraizados. No entanto, futuramente deverão ser realizados mais estudos de forma otimizar estas ou outras condições no sentido de aumentar a taxa de enraizamento (eg: avaliar o efeito da redução do número de subculturas do material vegetal na melhoria da capacidade de rizogénese).

A utilização de biorreatores de imersão temporária também se mostrou uma opção viável para a multiplicação em larga escala da camarinha. No entanto, e apesar de no geral, os resultados obtidos terem sido melhores comparativamente à multiplicação em meio de cultura gelificado, a ocorrência de desordens fisiológicas como a hiperhidricidade afetou a eficiência deste protocolo. Desta forma, deverão ser feitas algumas otimizações, sobretudo ao nível da frequência e duração do período de imersão e arejamento, com intuito de reduzir a incidência de vitrificação e consecutivamente melhorar a sua eficiência.

A aplicação da técnica de citometria de fluxo excluiu a possibilidade de ocorrência de instabilidade genética durante a micropropagação de *Corema album*, evidenciando a eficácia deste protocolo para a produção de plantas *true-to-type* desta espécie. Não obstante, outros estudos poderão ser realizados com o intuito de excluir

mutações que não podem ser determinadas através desta metodologia, nomeadamente a utilização de marcadores moleculares para a identificação de mutações pontuais.

Por último, a avaliação do estado oxidativo das plantas aclimatizadas, através da comparação com uma referência (plantas de campo) apresentou diferenças na acumulação de ERO e nas vias de neutralização/eliminação destes compostos. No entanto, estas diferenças para além de estarem relacionadas com o tipo de material vegetal (micropropagado vs zigótico), relacionam-se ainda com as suas condições de crescimento e idade. Apesar destes mecanismos se apresentarem em geral aparentemente menos ativos nas plantas micropropagadas face às de campo, são suficientes para evitar que os níveis de ERO observados sejam letais durante a aclimatização. Uma vez transferidas as plantas micropropagadas para o seu *habitat* natural, é de esperar que os mecanismos antioxidantes se desenvolvam de forma semelhante nos dois tipos de materiais vegetais. Futuramente, deverão realizar-se mais estudos com o intuito de avaliar a possível acumulação de ERO mais reativas (eg: OH[•]), a integridade membranar, assim como a performance fotossintética destas plantas.

Em suma, conclui-se o desenvolvimento de um protocolo robusto, eficiente (na maioria das etapas de micropropagação) e eficaz que permite a produção de plantas geneticamente iguais à planta-mãe e que apresentam mecanismos antioxidantes suficientemente desenvolvidos, que impedem a morte e permitem o desenvolvimento da planta.

Futuramente, será também interessante avaliar a riqueza nutritiva dos frutos de *Corema album* obtidos a partir das plantas micropropagadas, assim como confirmar as possíveis potencialidades farmacológicas destas plantas através da determinação da sua composição fenólica (eg: estudos metabolómicos) e dos efeitos quimio-protetores contra o stresse oxidativo das suas folhas e frutos (eg: efeitos bioativos dos extratos após exposição a linhas celulares).

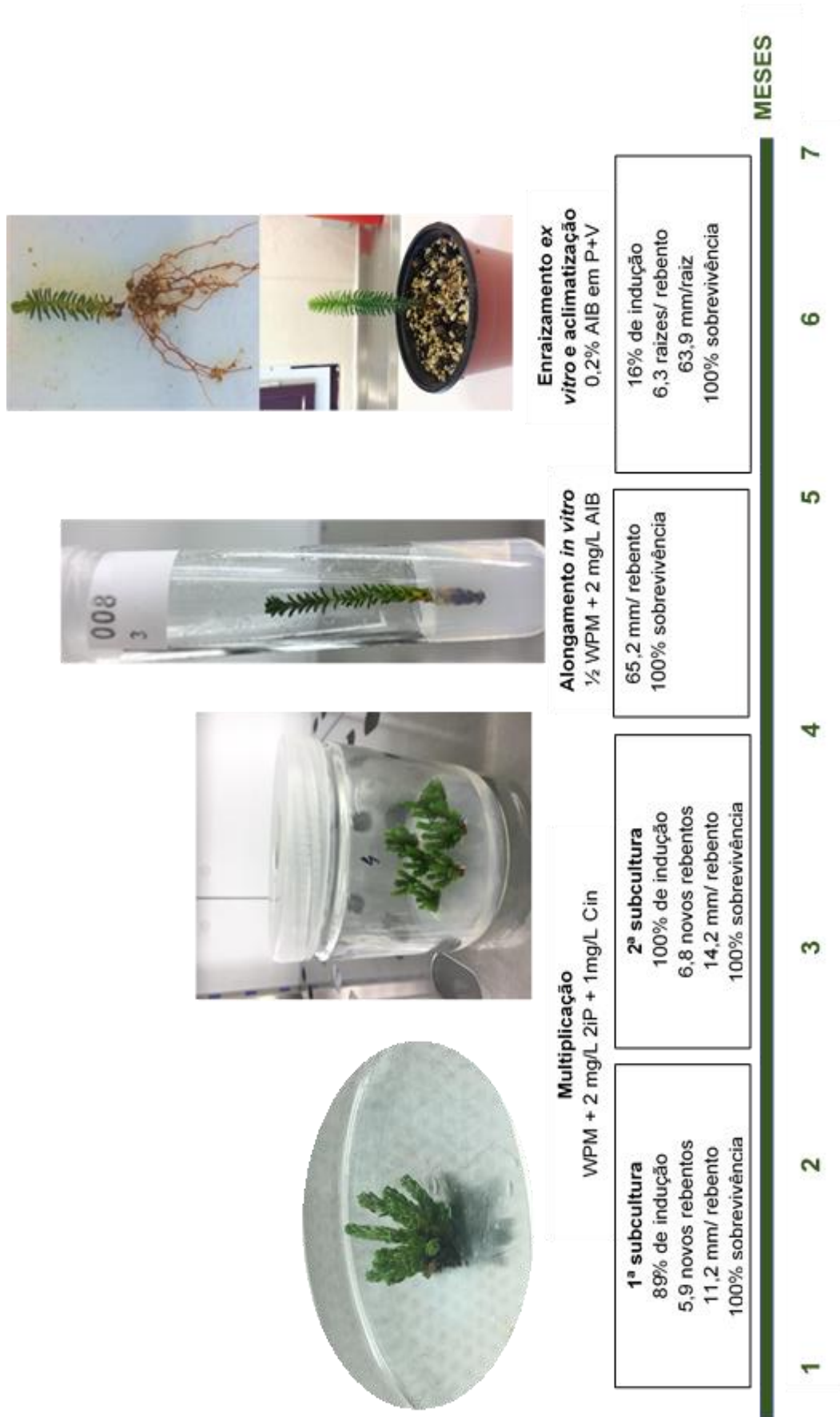


Figura 26: Resumo do protocolo otimizado para a micropropagação de *Corema album*.

Referências bibliográficas

- Adan, A., G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, & A. Nalbant. 2017. "Flow Cytometry: Basic Principles and Applications." *Critical Reviews in Biotechnology* 37 (2): 163–76.
- Afendi, F. M., N. Ono, Y. Nakamura, K. Nakamura, L. k. Darusman, N. Kibinge, A. H. Morita, H. Horai, M. Ataf-UI-Amin, & S. Kanaya. 2013. "Data Mining Methods for Omics and Knowledge of Crude Medicinal Plants toward Big Data Biology." *Coputational and Structural Biotechnology Journal* 4 (5): e201301010.
- Afreen, F. 2006. "Temporary Immersion Bioreactor – Engineering Considerations and Applications in Plant Micropropagation." In *Plant Tissue Culture Engineering*, edited by S. D. Gupta and Y. Ibaraki, 187–201. Springer.
- Ahmad, P., C. A. Jaleel, M. A. Salem, G. Nabi, & S. Sharma. 2010. "Roles of Enzymatic and Nonenzymatic Antioxidants in Plants during Abiotic Stress." *Critical Reviews in Biotechnology* 30 (3): 161–75.
- Ahmadian, M., A. Babaei, S. Shokri, & S. Hessami. 2017. "Micropropagation of Carnation (*Dianthus Caryophyllus* L.) in Liquid Medium by Temporary Immersion Bioreactor in Comparison with Solid Culture." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15: 309–15.
- Aitken-Christie, J., & C. Jones. 1987. "Towards Automation Radiata Pine Shoot Hedges in Vitro." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8: 185–96.
- Altafin, V. L. 2005. "Estudo Da Micropropagação. Aclimação e Econômico Prévio Do Plantio Em Campo de Musa Ssp." Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista.
- Álvarez-Cansino, L., M. Zunzunegui, & M. C. D. Barradas. 2017. "Germination and Clonal Propagation of the Endemic Shrub *Corema Album*, a Vulnerable Species with Conservation Needs and Commercial Interest." *Natural Product Communications* 12 (2): 267–72.
- Álvarez-Cansino, L., M. Zunzunegui, M. C. Díaz Barradas, & M. P. Esquivias. 2010. "Gender-Specific Costs of Reproduction on Vegetative Growth and Physiological Performance in the Dioecious Shrub *Corema Album*." *Annals of Botany* 106: 989–98.
- Amoo, S. O., & J. Van Staden. 2012. "Influence of Plant Growth Regulators on Shoot Proliferation and Secondary Metabolite Production in Micropropagated *Huernia Hystrix*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 112: 249–56.
- Anderson, W. C. 1984. "A Revised Tissue Culture Medium for Shoot Multiplication of *Rhododendron*." *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109: 343–47.
- Andrade, S. C. 2016. "Estudo Das Propriedades Físico-Químicas e Avaliação de Compostos Bioativos Em Camarinhas (*Corema Album* D. Don)." Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu.
- Andrade, S. C., F. Gonçalves, & R. Guiné. 2017. "Contribution for the Physical-Chemical Characterization of Portuguese Crowberry (*Corema Album*)." *International Journal of Food Science and Nutrition* 2 (4): 9–14.
- Anwar, F., P. Sharmila, & P. P. Saradhi. 2008. "An Optimal Protocol for in Vitro Regeneration, Efficient Rooting and Transplantation of Chickpea." *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14 (4): 329–35.
- Apel, K., & H. Hirt. 2004. "Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction." *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–99.

Arab, M. A., A. Yadollahi, A. Shojaeiyan, S. Shokri, & S. M. Ghoghah. 2014. "Effects of Nutrient Media, Different Cytokinin Types and Their Concentrations on in Vitro Multiplication of G x N15 (Hybrid of Almond x Peach) Vegetative Rootstock." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 12: 81–87

Aremu, A. O., M. W. Bairu, K. Doležal, J. F. Finnie, & J. Van Staden. 2012. "Topolins: A Panacea to Plant Tissue Culture Challenges?" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 1–16.

Arezki, O., P. Boxus, C. Kevers, & T. Gaspar. 2000. "Hormonal Control of Proliferation in Meristematic Agglomerates of *Eucalyptus Camaldulensis* Dehn." *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 36: 398–401.

Arthur, G. D., W. A. Stirk, & J. Van Staden. 2006. "Effects of Autoclaving and Charcoal on Root-Promoting Substances Present in Water Extracts Made from Gelling Agents." *Bioresource Technology* 97 (15): 1942–50.

Asada, K. 1994. "Production and Action of Active Oxygen Species in Photosynthetic Tissues." In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, edited by C. Foyer & P.M. Mullineaux, 77–100. CRC Press.

———. 2006. "Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions." *Plant Physiology* 141: 391–96.

Asada, K., & M. Takahashi. 1987. "Production and Scavenging of Active Oxygen in Photosynthesis." In *Photoinhibition*, edited by D. J. Kyle, C. B. Osmund, and C. J. Arntzen, 227–87. Elsevier.

Aygun, A., & H. Dumanoglu. 2015. "In Vitro Shoot Proliferation and in Vitro and Ex Vitro Root Formation of *Pyrus Elaeagrifolia* Pallas." *Frontiers in Plant Science* 6: 225.

Azevedo, H., C. G. C. Pinto, & C. Santos. 2005. "Cadmium Effects in Sunflower: Membrane Permeability and Changes in Catalase and Peroxidase Activity in Leaves and Calluses." *Journal of Plant Nutrition* 28 (12): 2233–41.

Bairu, M. W., A. O. Aremu, & J. Van Staden. 2011. "Somaclonal Variation in Plants: Causes and Detection Methods." *Plant Growth Regulation* 63: 147–73.

Balunas, M. J., & A. D. Kinghorn. 2005. "Drug Discovery from Medicinal Plants." *Life Sciences* 78: 431–41.

Banko, T. J., & M. A. Stefani. 1996. "Oxydendrum Arboreum (L.) DC (Sourwood)." In *Trees IV. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, edited by Y. P. S. Bajaj, 231–42. Springer.

Barrett, C., & A. C. Cassells. 1994. "An Evaluation of Antibiotics for the Elimination of *Xanthomonas Campestris* Pv. *Pelargonii* (Brown) from *Pelargonium* x *Domesticum* Cv. 'Grand Slam' Explants in Vitro." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3 (2): 169–75.

Benmahioul, B., N. Dorion, M. Kaid-Harche, & F. Daguin. 2012a. "Micropropagation and Ex Vitro Rooting of Pistachio (*Pistacia Vera* L.)." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 353–58.

Benson, E. E. 2000. "In Vitro Plant Recalcitrance in Vitro Plant Recalcitrance: An Introduction." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36: 141–48.

Bertoncelli, D. J., I. Hasse, & M. C. Oliveira. 2009. "Desinfecção e Estabelecimento in Vitro de Explantes de Jacaranda *Mimosaeifolia* D. Don." In *III Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária- Engenharia Florestal*.

- Bettini, P. P., E. Cosi, D. Bindi, & M. Buiatti. 2008. "Reactive Oxygen Species Metabolism in Plants: Production, Detoxification and Signaling in the Stress Response." *Plant Stress* 2 (1): 28–39.
- Bhatia, S., & K. Sharma. 2015. "Micropropagation." In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 109–15. Academic Press.
- Bhojwani, S. S., & M.K. Razdan. 1996. "Clonal Propagation." In *Plant Tissue Culture Theory and Practice, a Revised Edition*, 483–536. Elsevier.
- Bhuyan, D. J., & A. Basu. 2017. "Phenolic Compounds: Potential Health Benefits and Toxicity." In *Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Production Waste*, 27–59. CRC Press.
- Blake, J. 1988. "Mites and Thrips as Bacterial and Fungal Vectors between Plant Tissue Cultures." *Acta Horticulturae*, no. 225: 163–66.
- Bohra, P., A. A. Waman, B. N. Sathyanarayana, & K. Umesha. 2016. "Concurrent Ex Vitro Rooting and Hardening in Ney Poovan Banana (*Musa AB*): Effect of Carbon Sources and Their Concentrations." *Erwerbs-Obstbau* 58: 193–98.
- Borkowska, B. 2001. "Morphological and Physiological Characteristics of Micropropagated Strawberry Plants Rooted in Vitro or Ex Vitro." *Scientia Horticulturae* 89: 195–206.
- Brito, G., T. Lopes, J. Loureiro, E. Rodriguez, & C. Santos. 2010. "Assessment of Genetic Stability of Two Micropropagated Wild Olive Species Using Flow Cytometry and Microsatellite Markers." *Trees* 24: 723–32.
- Buckseth, T., R. K. Singh, A. K. Sharma, S. Sharma, V. Moudgil, & A. Saraswati. 2018. "Optimization of Activated Charcoal on in Vitro Growth and Development of Potato (*Solanum Tuberosum* L.)." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7 (10): 3543–48.
- Businge, E., A. Trifonova, C. Schneider, P. Rödel, & U. Egertsdotter. 2017. "Evaluation of a New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation of Cultivars of Eucalyptus, Birch and Fir." *Forests* 8: 196.
- Caboni, E., M. G. Tonelli, P. Lauri, P. Iacovacci, C. Kevers, C. Damiano, & T. Gaspar. 1997. "Biochemical Aspects of Almond Microcuttings Related to in Vitro Rooting Ability." *Biologia Plantarum*
- Cai, Y., Q. Luo, M. Sun, & H. Corke. 2004. "Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer." *Life Sciences* 74: 2157–84.
- Calviño-Cancela, M. 2005. "Fruit Consumer & Seed Dispersers of the Rare Shrub *Corema Album*, Empetraceae in Coastal Sand Dunes." *Revue d'Écologie (Terre Vie)* 60: 97–106.
- Calviño-Cancela, M. 2002. "Spatial Patterns of Seed Dispersal & Seedling Recruitment in *Corema Album* (Empetraceae): The Importance of Unspecialized Dispersers for Regeneration." *Journal of Ecology* 90: 775–84.
- Canhoto, J. M. 2010. *Biotecnologia Vegetal: Da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra/ Coimbra University Press.
- Canhoto, J. M., M. L. Lopes, & G. S. S Cruz. 1999. "Somatic Embryogenesis in Myrtaceous Plants." In *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, edited by S. M. Jain, P. K. Gupta, and R. J. Newton, 293–340. Springer.

Carra, A., C. Catalano, O. Badalamenti, F. Carimi, S. Pasta, A. Motisi, L. Abbate, F. La Bella, L. Fazan, G. Kozłowski, & G. Garfi 2019. "Overcoming Sexual Sterility in Conservation of Endangered Species: The Prominent Role of Biotechnology in the Multiplication of *Zelkova Sicala* (Ulmaceae), a Relict Tree at the Brink of Extinction." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 137: 139–48.

Castellano, G., J. Tena, & F. Torrens. 2012. "Classification of Phenolic Compounds by Chemical Structural Indicators and Its Relation to Antioxidant Properties of *Posidonia Oceanica* (L.) Delile." *MATCH: Communications in Mathematical and in Computer Chemistry* 67: 231–50.

Castro, D., & J. Gonzáles. 2002. "Micropropagación de Eucalipto (*Eucalyptus Grandis* Hill Ex Maiden) En El Sistema de Inmersión Temporal." *Agricultura Tecnica (Chile)* 62 (1): 68–78.

Ceron-Garcia, A., I. Vargas-Arispuro, E. Aispuro-Hernandez, & M. A. Martinez-Tellez. 2012. "Oligoglucan Elicitor Effects During Plant Oxidative Stress." In *Cell Metabolism-Cell Homeostasis and Stress Response*. IntechOpen.

Chakrabarty, D., S. Y. Park, M. B. Ali, K. S. Shin, & K. Y. Paek. 2006. "Hyperhydricity in Apple: Ultrastructural and Physiological Aspects." *Tree Physiology* 26: 377–88.

Chandana, B. C., N. H. C. Kumari, S. K. Shashikala, & D. Lakshamana. 2018. "Role of Plant Tissue Culture in Micropropagation, Secondary Metabolites Production and Conservation of Some Endangered Medicinal Crops." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 246–51.

Chandra, S., R. Bandopadhyay, V. Kumar, & R. Chandra. 2010. "Acclimatization of Tissue Cultured Plantlets: From Laboratory to Land." *Biotechnology Letters* 32: 1199–1205.

Clapa, D., A. Fira, & J. Nirmal . 2013. "An Efficient Ex Vitro Rooting and Acclimatization Method for Horticultural Plants Using Float Hydroculture." *HortScience* 48 (9): 1159–67.

Clavijo, A., M. C. Díaz-Barradas, M. Zunzunegui, F. Ain Lhout, L. Álvarez-Cansino, . Correia, & F. García Novo. 2003. "A Conservação de *Corema Album* No Litoral Atlântico Da Península Ibérica; a Influência de Dispersores Animais Na Regeneração Natural." *Revista Biológica* 21 (January): 43:56.

Clavijo, A., Mari Cruz Diaz-Barradas, F. Ain-Lhout, M. Zunzunegui, & O. Correia. 2002. "A Fragmentação Como Causa Principal Da Redução Do Habitat de *Corema Album* Na Sua Área de Distribuição." *Revista de Biologia* 20 (June 2014): 109–20.

Conover, C. A., & R.T. Poole. 1984. "Acclimatization of Indoor Foliage Plants." In *Horticultural Reviews*, edited by Jules Janick, 119–54. Wiley.

Corpas, F. J., J. M. Palma, L. M. Sandalio, R. Valderrama, J. B. Barroso, & L. A. del Río 2008. "Peroxisomal Xanthine Oxidoreductase: Characterization of the Enzyme from Pea (*Pisum Sativum* L.) Leaves." *Journal of Plant Physiology* 165: 1319–30.

Côrte-Real, M., F. Sansonetty, P. Ludovico, C. Prudêncio, F. Rodrigues, M. Fortuna, M. Sousa, M. Silva, & C. Leão. 2002. "Contributos Da Citologia Analítica Para Estudos de Biologia de Leveduras." *Boletim de Biotecnologia* 71: 19–33.

Costa, C. A. 2011. "Factores Que Condicionam a Dispersão e o Recrutamento Da Camarinha Em Sistemas Dunares." Universidade de Lisboa.

Costa, P., S. Gonçalves, P. Valentão, P. Andrade, N. Coelho, & A. Romano. 2012. "Thymus Lotocephalus Wild Plants and in Vitro Cultures Produce Different Profiles of Phenolic Compounds with Antioxidant Activity." *Food Chemistry* 135: 1253–60.

- Cüce, M., E. Bektaş, & A. Sökmen. 2013. "Micropropagation of *Vaccinium Arctostaphylos* L. via Lateral-Bud Culture." *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 37: 40–44.
- Cüce, M., & A. Sökmen. 2015. "Micropropagation of *Vaccinium Myrtillus* L. (Bilberry) Naturally Growing in the Turkish Flora." *Turkish Journal of Biology* 39: 233–40.
- D'Antonio, C. M. 1990. "Seed Production and Dispersal in the Non-Native, Invasive Succulent *Carpobrotus Edulis* (Aizoaceae) in Coastal Strand Communities of Central California." *Journal of Applied Ecology* 27 (2): 693–702.
- Dabski, M., & M. Parzymies. 2007. "The Effect of Auxins: IAA, IBA and NAA on Rooting of *Hebe Buchananii* (Hook) and *Hebe Canterburiensis* (J.B.ARMSTR.) 'Prostata' in Vitro." *Acta Scientiarum Polonorum: Hortorum Cultus* 6 (1): 9–14.
- Dar, R. A., M. Shahnawaz, & P. H. Qazi. 2017. "General Overview of Medicinal Plants: A Review." *The Journal of Phytopharmacology* 6 (6): 349–51.
- Das, K., & A. Roychoudhury. 2014. "Reactive Oxygen Species (ROS) and Response of Antioxidants as ROS-Scavengers during Environmental Stress in Plants." *Frontiers in Environmental Science* 2.
- Dat, J., E. Vandenabeele, E. Vranová, M. Van Montagu, D. Inzé, & F. Van Breusegem. 2000. "Dual Action of the Active Oxygen Species during Plant Stress Responses." *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779–95.
- Deb, C. R., & T. Imchen. 2010. "An Efficient in Vitro Hardening Technique of Tissue Culture Raised Plants." *Biotechnology* 9 (1): 79–83.
- Debergh, P., J. Aitken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. Von Arnold, R. Zimmerman, & M. Ziv. 1992. "Reconsideration of the Term 'vitrification' as Used in Micropropagation." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 135–40.
- Debergh, P. C. 1983. "Effects of Agar Brand and Concentration on the Tissue Culture Medium." *Physiologia Plantarum* 59: 270–76.
- Debergh, P. C., & L. J. Maene. 1981. "A Scheme for Commercial Propagation of Ornamental Plants by Tissue Culture." *Scientia Horticulturae* 14: 335–45.
- Debnath, Mousumi, C. Malik, & P. Bisen. 2006. "Micropropagation: A Tool for the Production of High Quality Plant-Based Medicines." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7 (1): 33–49.
- Debnath, S. C. 2004. "Clonal Propagation of Dwarf Raspberry (*Rubus Pubescens* Raf.) through in Vitro Axillary Shoot Proliferation." *Plant Growth Regulation* 43: 179–86.
- . 2011. "Bioreactors and Molecular Analysis in Berry Crop Micropropagation - a Review." *Canadian Journal of Plant Science* 91: 147–57.
- Demidchik, V. 2015. "Mechanisms of Oxidative Stress in Plants: From Classical Chemistry to Cell Biology." *Environmental and Experimental Botany* 109: 212–28.
- Denchev, P. D., A. I. Kuklin, & A. H. Scragg. 1992. "Somatic Embryo Production in Bioreactors." *Journal of Biotechnology* 26: 99–109.
- Devika, R., & J. Koilpillai. 2012. "An Overview on Plant Secondary Metabolites : Its Medicinal Importance." *Journal of Pharmacy Research* 5 (2): 984–86.

- Dewanto, V., W. Xianzhong, K. K. Adom, & R. H. Liu. 2002. "Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (10): 3010–14.
- Dias, M. C., H. Oliveira, A. Costa, & C. Santos. 2014. "Improving Elms Performance under Drought Stress: The Pretreatment with Abscisic Acid." *Environmental and Experimental Botany* 100: 64–73.
- Díaz-Barradas, M. C., A. Clavijo, M. Zunzunegui, F. Ain Lhout, F. G. Novo, & O. Correia. 2002. "Ecosistemas Peninsulares. Dunas de Camarina." *Investigación y Ciencia*, no. 308: 21–23.
- Díaz-Barradas, M. C., C. Costa, O. Correia, A. J. León-González, I. Navarro-Zafra, M. Zunzunegui, L. Alvarez-Cansino, & C. Martín-Cordero. 2016. "Pentacyclic Triterpenes Responsible for Photoprotection of *Corema Album* (L.) D. Don White Berries." *Biochemical Systematics and Ecology* 67: 103–9.
- Díaz-Barradas, M. C., M. Zunzunegui, O. Correia, F. Ain-Lhout, M. P. Esquivias, & L. Álvarez-Cansino. 2018. "Gender Dimorphism in *Corema Album* across Its Biogeographical Area and Implications under a Scenario of Extreme Drought Events." *Environmental and Experimental Botany* 155: 609–18.
- Dixon, R.A., & D. Strack. 2003. "Phytochemistry Meets Genome Analysis , and Beyond." *Phytochemistry* 62: 815–16.
- Dobrąnszki, J., & J. A. Teixeira da Silva. 2010. "Micropropagation of Apple - a Review." *Biotechnology Advances* 28: 462–88.
- Dodds, J. H. 1983. *Tissue Culture of Trees*. Springer Science & Business Media.
- Doina, C., A. Fira, & M. Simu. 2015. "The Role of Rooting Substrate in Blackberry Ex Vitro Rooting and Acclimatization Stage." *ProEnvironment* 8: 280–84.
- Doležel, J., J. Greilhuber, & J. Suda. 2007. *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes, and Genomes*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Drażkiewicz, M., E. Skórzyńska-Polit, & Z. Krupa. 2014. "Copper-Induced Oxidative Stress and Antioxidant Defence in *Arabidopsis Thaliana*." *BioMetals* 17: 379–87.
- Ducos, J. P., B. Terrier, & D. Courtois. 2010. "Disposable Bioreactors for Plant Micropropagation and Mass Plant Cell Culture." *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 115: 89–115.
- Dunwiddie, P. W. 1990. "Rare Plants in Coastal Heathlands: Observations on *Corema Conradii* (Empetraceae) and *Helianthemum Dumosum* (Cistaceae)." *Rhodora* 92 (869): 22–26.
- Edson, J. L., D. L. Wenny, R. K. Dumroese, & A. Leege-Brusven. 1996. "Mass Propagation of Rocky Mountain Juniper from Shoot Tip Cuttings." *Tree Planters' Notes* 47 (3): 94–99.
- Ehirim, B. O., M. N. Ishaq, S. Agboire, C. Solomon, A. N. Ejizu, & A. Diarra. 2014. "Acclimatization: An Important Stage in Tissue Culture." *Asian American Plant Science Research Journal* 1: 1–7.
- Elmaghabi, A. M., S. Hammud, & E. Abugnia. 2017. "In Vitro Plant Regeneration of Libyan Wild Plants: Edible Species (*Arbutus Pavarii*) and Endanger Species [*Haplophyllum Tuberculatum* (Forsk.) Juss]." *Journal of Aegean Agricultural Research Institute* 27 (2): 127–32.
- Enjalric, F., M. P. Carron, & L. Lardet. 1987. "Contamination of Primary Cultures in Tropical Areas: The Case of *Hevea Brasiliensis*." *Acta Horticulturae* 225: 57–66.

Erb, T. J., & J. Zarzycki. 2018. "A Short History of RubisCO: The Rise and Fall (?) Of Nature's Predominant CO₂ Fixing Enzyme." *Current Opinion in Biotechnology* 49: 100–107.

Erofeeva, E. A. 2015. "Dependence of Guaiacol Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation Rate in Drooping Birch (*Betula Pendula* Roth) and Tillet (*Tilia Cordata* Mill) Leaf on Motor Traffic Pollution Intensity." *Dose-Response* 13 (2): 1–6.

Escobedo-Gracia-Medrano, R. M., M. J. Burgos-Tan, J. R. Ku-Cauich, & A. Quiroz-Moreno. 2018. "Using Flow Cytometry Analysis in Plant Tissue Culture Derived Plants." In *Plant Cell Culture Protocols*, 317–32. Humana Press.

Etienne, H., & M Berthouly. 2002. "Temporary Immersion Systems in Plant Micropropagation." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215–31.

Fang, C., A. R. Fernie, & J. Luo. 2019. "Exploring the Diversity of Plant Metabolism." *Trends in Plant Science* 24 (1): 83–98.

Ferreira, L. A. S. 2018. "A Contribution to the Valorisation of a Maritime Plant: The *Corema Album* (L.) D. Don." Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Fett-Neto, A. G., J. P. Fett, L. W. V. Goulart, G. Pasquali, R. R. Termignoni, & A. G. Ferreira. 2001. "Distinct Effects of Auxin and Light on Adventitious Root Development in *Eucalyptus Saligna* and *Eucalyptus Globulus*." *Tree Physiology* 21: 457–64.

Fila, G., J. Ghashghaie, J. Hoarau, & G. Cornic. 1998. "Photosynthesis, Leaf Conductance and Water Relations of in Vitro Cultured Grapevine Rootstock in Relation to Acclimatisation." *Physiologia Plantarum* 102: 411–18.

Firmo, W. C. A., V. J. M. de Menezes, C. E. C. Passos, C. N. Dias, L. P. L. Alves, I. C. L. Dias, M. S. Neto, & R. S. G. Olea. 2011. "Contexto Histórico, Uso Popular e Concepção Científica Sobre Plantas Medicinais." *Cadernos de Pesquisa* 18: 90–95.

Flickinger, M. C. 2010. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. John Wiley & Sons.

Foyer, C. H., & G. Noctor. 2013. "Redox Signaling in Plants." *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (16): 2087–90.

Franklin, G., C. J. Sheeba, & G. L. Sita. 2004. "Regeneration of Eggplant (*Solanum Melongena* L.) from Root Explants." *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 40: 188–91.

Gajdošová, A., M. G. Ostrolucká, G. Libiaková, & E. Ondrušková. 2007. "Protocol for Micropropagation of *Vaccinium Vitis-Idaea* L." In *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, edited by S. M. Jain and H. Häggman, 457–64. Springer.

Gajewska, E., & M. Skłodowska. 2007. "Effect of Nickel on ROS Content and Antioxidative Enzyme Activities in Wheat Leaves." *BioMetals* 20: 27–36.

Galleano, M., S. V. Verstraeten, P. I. Oteiza, & C. G. Fraga. 2010. "Antioxidant Actions of Flavonoids: Thermodynamic and Kinetic Analysis." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501 (1): 23–30.

Gaspar, T. 1991a. "Vitrification in Micropropagation." In *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micropropagation I*, edited by Y. P. S. Bajaj, 117–26. Berlin: Springer-Verlag.

———. 1991b. "Vitrification in Micropropagation." In *Biotechnology in Agriculture and Forestry – High-Tech and Micropropagation I*, edited by Y. P. S. Bajaj, 116–26. Berlin: Springer.

Gentile, A., M. Jàquez Gutiérrez, J. Martinez, A. Frattarelli, P. Nota, & E. Caboni. 2014. "Effect of Meta-Topolin on Micropropagation and Adventitious Shoot Regeneration in *Prunus* Rootstocks." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118 (3): 373–81.

George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1: The Technology*. Westbury, UK: Exegetics Limited.

George, E. F., M. A. Hall, & G. Klerk, eds. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Netherlands: Springer.

George, E. F., M. A. Hall, & G. J. de Klerk. 2008. "The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients." In *Plant Propagation by Tissue Culture*, 65–113. Dordrecht: Springer.

Gharekhani, M., M. Ghorbani, & N. Rasoulnejad. 2012. "Microwave-Assisted Extraction of Phenolic and Flavonoid Compounds from *Eucalyptus Camaldulensis* Dehn Leaves as Compared with Ultrasound-Assisted Extraction." *Latin American Applied Research* 42: 305–10.

Giannopolitis, C. N., & S. K. Ries. 1977. "Superoxide Dismutases I. Occurrence in Higher Plants." *Plant Physiology* 59 (2): 309–14.

Gil-López, M. J. 2011. "Etnobotánica de La Camarina (*Corema Album*, Empetraceae) En Cádiz." *Acta Botanica Malacitana* 36: 137–44.

Gill, S. S., N. A. Khan, N. A. Anjum, & N. Tuteja. 2011. "Amelioration of Cadmium Stress in Crop Plants by Nutrient Management: Morphological, Physiological and Biochemical Aspects." *Plant Stress* 5 (1): 1–23.

Gill, S. S., & N. Tuteja. 2010. "Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909–30.

Givan, A. L. 2013. *Flow Cytometry: First Principles*. John Wiley & Sons.

Gomes, F., & J. M. Canhoto. 2009. "Micropropagation of Strawberry Tree (*Arbutus Unedo* L.) from Adult Plants." *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 45: 72–82.

Gomes, M. F. F. N. 2011. "Strategies for the Improvement of *Arbutus Unedo* L. (Strawberry Tree): In Vitro Propagation, Mycorrhization and Diversity Analysis." Universidade de Coimbra.

Gonçalves, J. C., G. Diogo, & S. Amâncio. 1998. "In Vitro Propagation of Chestnut (*Castanea Sativa* x *C. Crenata*): Effects of Rooting Treatments on Plant Survival, Peroxidase Activity and Anatomical Changes during Adventitious Root Formation." *Scientia Horticulturae* 72: 265–75.

Gonçalves, J. C., & R. F. Pinto. 2019. "Micropropagação de *Corema Album*: Primeiros Resultados." *Pequenos Frutos*, 12–13.

Gonçalves, S., E. Moreira, C. Grosso, P. B. Andrade, P. Valentão, & A. Romano. 2017. "Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Enzyme Inhibitory Activities of Extracts from Aromatic Plants Used in Mediterranean Diet." *Journal of Food Science and Technology* 54 (1): 219–27.

Gonzales, G., ed. 2011. *Los Arboles y Arbustos de La Peninsula Ibérica e Islas Baleares*. Vol. 2. Mundi-Prensa, Madrid, Spain.

Greenwood, M. S., & R. J. Weir. 1994. "Genetic Variation in Rooting Ability of Loblolly Pine Cuttings: Effects of Auxin and Family on Rooting by Hypocotyl Cuttings." *Tree Physiology* 15: 41–45.

Greidziak, N., B. Diettrich, & M. Luckner. 1990. "Batch Cultures of Somatic Embryos of *Digitalis Lanata* in Gaslift Fermenters . Development and Cardenolide Accumulation." *Planta Medica* 56: 175–78.

Guitián, P., M. Medrano, & M. Rodríguez. 1997. "Reproductive Biology of *Corema Album* (L.) D. Don (Empetraceae) in the Northwest Iberian Peninsula." *Acta Botanica Gallica* 144 (1): 119–28.

Gupta, A., D. Vakhare, & S. R. Chaphalkar. 2016. "Flow Cytometry: An Overview in Optical System and Application in Biological Studies." *European Journal of Biological Research* 6 (3): 186–92.

Guri, A. Z., & K. N. Patel. 1998. Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. *U.S. Patent No. 5,750,402*, issued 1998.

Haag, J. 2019. *Managing Reactive Oxygen Species In Sports Turf*. Lulu.com.

Hagimori, M., T. Matsumoto, & Y. Mikami. 1984. "Jar Fermenter Culture of Shoot-Forming Cultures of *Digitalis Purpurea* L . Using a Revised Medium." *Agricultural and Biological Chemistry* 48 (4): 965–70.

Hahn, E. J., & K. Y. Paek. 2005. "Multiplication of Chrysanthemum Shoots in Bioreactors as Affected by Culture Method and Inoculation Density of Single Node Stems." *Plant Cell ,Tissue and Organ Culture* 81: 301–6.

Halliwell, B. 2006. "Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life." *Plant Physiology* 141: 312–22.

Han, K., H. Hu, S. Li, H. Xv, H. Lin, & Q. Zhang. 2013. "Micropropagation of *Vaccinium Bracteatum* Thunb." *African Journal of Biotechnology* 12 (7): 695–701.

Han, M. S., S. Y. Park, H. K. Moon, & Y. J Kang. 2010. "Micropropagation of a Rare Tree Species, *Empetrum Nigrum* Var. *Japonicum* K. Koch via Axillary Bud Culture." *Journal of Korean Forest Society* 99 (4): 568–72.

Harkat-Madouri, L., B. Asma, K. Madani, Z. B. O. S. Said, P. Rigou, D. Grenier, H. Allalou, H. Remini, A. Adjaoud, & L. Boulekbache-Makhlouf. 2015. "Chemical Composition , Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oil of *Eucalyptus Globulus* from Algeria." *Industrial Crops and Products* 78: 148–53.

Hatz, S., J. D. C. Lambert, & P. R. Ogilby. 2007. "Measuring the Lifetime of Singlet Oxygen in a Single Cell: Addressing the Issue of Cell Viability." *Photochemical and Photobiological Sciences* 6 (10): 1037–1128.

Hazarika, B. N. 2003. "Acclimatization of Tissue-Cultured Plants." *Current Science* 85 (12): 1704–12.

Henderson, W.E., & A. M. Kinnersley. 1988. "Corn Starch as an Alternative Gelling Agent for Plant Tissue Culture." *Plant Cell ,Tissue and Organ Culture* 15: 17–22.

Hesar, A. A., B. Kaviani, A. Tarang, & S. B. Zanjani. 2011. "Effect of Different Concentrations of Kinetin on Regeneration of Ten Weeks (*Matthiola Incana*)." *Plant Omics Journal* 4 (5): 236–38.

Hesketh, T., & W. X. Zhu. 1997. "Traditional Chinese Medicine: One Country, Two Systems." *Bmj* 315.

Horemans, N., C. H. Foyer, & H. Asard. 2000. "Transport and Action of Ascorbate at the Plant Plasma Membrane." *Trends in Plant Science* 5 (6): 263–67.

Hu, X., D. L. Bidney, N. Yalpani, J. P. Duvick, O. Crasta, O. Folkerts, & G. Lu. 2003. "Overexpression of a Gene Encoding Hydrogen Peroxide-Generating Oxalate Oxidase Evokes Defense Responses in Sunflower." *Plant Physiology* 133: 170–81.

Huang, P. L., L. J. Liao, C. C. Tsai, & Z. H. Liu. 2011. "Micropropagation of Bromeliad *Aechmea Fasciata* via Floral Organ Segments and Effects of Acclimatization on Plantlet Growth." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 73–78.

Humphreys, A. M., R. Govaerts, S. Z. Ficinski, E. N. Lughadha, & M. S. Vorontsova. 2019. "Global Dataset Shows Geography and Life Form Predict Modern Plant Extinction and Rediscovery." *Nature Ecology and Evolution* 3: 1043–47.

Hussain, S., S. D. Lane, & D. N. Price. 1994. "A Preliminary Evaluation of the Use of Microbial Culture Filtrates for the Control of Contaminants in Plant Tissue Culture Systems." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36 (1): 45–51.

Huyut, Z., S. Beydemir, & I. Gülçin. 2017. "Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds." *Biochemistry Research International*.

Hvoslef-Eide, A. K., & W. Preil, eds. 2005. *Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation*. Springer Science & Business Media.

Imlay, J. A., & S. Linn. 1988. "Damage and Oxygen Radical." *Science* 240: 1302–9.

Iqbal, M., R. Khan, & N. A. Khan. 2017. *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. Springer.

Ishikawa, T., K. Sakai, T. Takeda, & S. Shigeoka. 1995. "Cloning and Expression of cDNA Encoding a New Type of Ascorbate Peroxidase from Spinach." *FEBS Letters* 367: 28–32.

Ishikawa, T., K. Sakai, K. Yoshimura, T. Takeda, & S. Shigeoka. 1996. "cDNAs Encoding Spinach Stromal and Thylakoid-Bound Ascorbate Peroxidase, Differing in the Presence or Absence of Their 3'-Coding Regions." *FEBS Letters* 384: 289–293.

Ishikawa, T., K. Yoshimura, K. Sakai, M. Tamoi, T. Takeda, & S. Shigeoka. 1998. "Molecular Characterization and Physiological Role of a Glyoxysome-Bound Ascorbate Peroxidase from Spinach." *Plant Cell Physiology* 39 (1): 23–34.

Isutsa, D. K., & M. P. Pritts. 1994. "Rapid Propagation of Blueberry Plants Using Ex Vitro Rooting and Controlled Acclimatization of Micropropagules." *HortScience* 29 (10): 1124–26.

Izhaki, I., & U. N. Safriel. 1990. "The Effect of Some Mediterranean Scrubland Frugivores upon Germination Patterns." *Journal of Ecology* 78 (1): 56–65.

Jackson, A. L., R. Chen, & L. A. Loeb. 1998. "Induction of Microsatellite Instability by Oxidative DNA Damage." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 12468–73.

Jain, S. M., & H. Häggman, eds. 2007. *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer.

Jajic, I., T. Sarna, & K. Strzalka. 2015. "Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species." *Plants* 4: 393–411.

Jesionek, A., A. Kokotkiewicz, P. Wlodarska, B. Zabiegala, A. Bucinski, & M. Luczkiewicz. 2017. "Bioreactor Shoot Cultures of *Rhododendron tomentosum* (Ledum palustre) for a Large-Scale Production of Bioactive Volatile Compounds." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 131 (1): 51–64.

- Karuppanapandian, T., J. C. Moon, C. Kim, K. Manoharan, & K. Wook. 2011. "Reactive Oxygen Species in Plants : Their Generation , Signal Transduction , and Scavenging Mechanisms." *Australian Journal of Crop Science* 5 (6): 709–25.
- Katagi, H., E. Takahashi, & K. Nakao. 1986. "Shoot-Forming Cultures of *Pelargonium Graveolens* by Jar Fermentation." *Nippon Nogei Kagaku Kaish* 6: 15–17.
- Kennedy, D. O., & E. L. Wightman. 2011. "Herbal Extracts and Phytochemicals : Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function." *Advances in Nutrition* 2 (1): 32–50.
- Kevers, C., T. Franck, R. J. Strasser, J. Dommes, & T. Gaspar. 2004. "Hyperhydricity of Micropropagated Shoots: A Typically Stress-Induced Change of Physiological State." *Plant Cell , Tissue and Organ Culture* 77: 181–91.
- Khateeb, W. A., R. Kanaan, T. El-Elimat, M. Alu'datt, J. Lahham, & A. El-Oqlah. 2017. "In Vitro Propagation, Genetic Stability, and Secondary Metabolite Analysis of Wild Lavender (*Lavandula Coronopifolia* Poir.)." *Horticulture Environment and Biotechnology* 58 (4): 393–405.
- Kim, W. S., K. Kågedal, & G. M. Halliday. 2014. "Alpha-Synuclein Biology in Lewy Body Diseases." *Alzheimer's Research & Therapy* 6 (5): 73.
- Klerk, G. de, W. van der Krieken, & J. C. de Jong. 1999. "The Formation of Adventitious Roots: New Concepts, New Possibilities." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 35: 189–99.
- Klerk, G. J. de. 2002. "Rooting of Microcuttings: Theory and Practice." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38: 415–22.
- Klerk, Geert-Jan de. 1997. "Effectiveness of Indoleacetic Acid, Indolebutyric Acid and Naphthaleneacetic Acid during Adventitious Root Formation in Vitro in *Malus 'Jork 9'*." *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49: 39–44.
- Konig, J., M. Muthuramalingam, & K. J. Dietz. 2012. "Mechanisms and Dynamics in the Thiol/Disulfide Redox Regulatory Network: Transmitters , Sensors and Targets." *Current Opinion in Plant Biology* 15: 261–68.
- Koszeghi, S., C. Bereczki, A. Balog, & K. Benedek. 2014. "Comparing the Effects of Benzyladenine and Meta-Topolin on Sweet Basil (*Ocimum Basilicum*) Micropropagation." *Notulae Scientia Biologicae* 6 (4): 422–27.
- Kozai, T. 1991. "Micropropagation under Photoautotrophic Conditions." In *Micropropagation: Technology and Application*, edited by P.C. Debergh and R.H. Zimmerman, 447–69. Kluwer Academic Publishers.
- Krieger-Liszkay, A., C. Fufezan, & A. Trebst. 2008. "Singlet Oxygen Production in Photosystem II and Related Protection Mechanism." *Photosynthesis Research* 98: 551–64.
- Krikorian, A. D. 1995. "Hormones in Tissue Culture and Micropropagation." In *Plant Hormones*, edited by Davies P.J., 774–96. Springer, Dordrecht.
- Krishna, H., M. Alizadeh, D. Singh, U. Singh, N. Chauhan, M. Eftekhari, & R. K. Sadh. 2016. "Somaclonal Variations and Their Applications in Horticultural Crops Improvement." *3 Biotech* 6 (1): 54.
- Krueger, S., C. Robacker, and W. Simonton. 1981. "Culture of *Amelanchier x Grandiflora* in a Programmable Micropropagation Apparatus." *Plant Cell , Tissue and Organ Culture* 27 (2): 219–26.

- Kumar, K., & I. U. Rao. 2012. "Morphophysiological Problems in Acclimatization of Micropropagated Plants In-Ex Vitro Conditions." *Journal of Ornamental and Horticultural Plants* 2 (4): 271–83.
- Labudda, M., & F. M. S. Azam. 2014. "Glutathione-Dependent Responses of Plants to Drought: A Review." *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 83 (1): 3–12.
- Lai, C. C., H. M. Lin, S. M. Nalawade, W. Fang, & H. S. Tsay. 2005. "Hyperhydricity in Shoot Cultures of *Scrophularia Yoshimurae* Can Be Effectively Reduced by Ventilation of Culture Vessels." *Journal of Plant Physiology* 162: 355–61.
- Larkin, P. J., & W. R. Scowcroft. 1981. "Somaclonal Variation - a Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement." *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197–214.
- Larrinaga, A. R., & P. Guitián. 2016. "Intraspecific Variation in Fruit Size and Shape in *Corema Album* (Ericaceae) along a Latitudinal Gradient: From Fruits to Populations." *Biological Journal of the Linnean Society* 118 (4): 940–50.
- Ledford, H. K., & K. K. Niyogi. 2005. "Singlet Oxygen and Photo-Oxidative Stress Management in Plants and Algae." *Plant, Cell and Environment* 28: 1037–45.
- Leggat, I., W.M. Waites, C. Leifert, & J. Nicholas. 1988. "Characterisation of Micro-Organisms Isolated from Plants during Micropropagation." *Acta Horticulturae* 225: 93–102.
- Leifert, C., C. E. Morris, & W. M. Waites. 1994. "Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue Culture and Field-Grown Plants: Reasons for Contamination Problems in Vitro." *Critical Reviews in Plant Science* 13 (2): 139–83.
- Leifert, C, W. M. Waites, & J. R. Nicholas. 1989. "Bacterial Contaminants of Micropropagated Plant Cultures." *Journal of Applied Bacteriology* 67: 353–61.
- León-González, A., P. Truchado, F. Tomás-Barberán, M. López-Lázaro, M. C. D. Barradas, & C. Martín-Cordero. 2013. "Phenolic Acids, Flavonols and Anthocyanins in *Corema Album* (L.) D. Don Berries." *Journal of Food Composition and Analysis* 29: 58–63.
- León-gonzález, A. J., R. Mateos, S. Ramos, M. A. Martín, B. Sarriá, C. Martín-cordero, M. López-Lázaro, L. Bravo, & L. Goya. 2012. "Chemo-Protective Activity and Characterization of Phenolic Extracts from *Corema Album*." *Food Research International* 49: 728–38.
- Leonardis, S. De, N. Dipierro, & S. Dipierro. 2000. "Purification and Characterization of an Ascorbate Peroxidase from Potato Tuber Mitochondria." *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 773–79.
- Leva, A. 2011. "Innovative Protocol for 'Ex Vitro Rooting' on Olive Micropropagation." *Central European Journal of Biology* 6 (3): 352–58.
- Li, Jianhua, John Alexander, Tom Ward, Peter Del Tredici, & Rob Nicholson. 2002. "Phylogenetic Relationships of Empetraceae Inferred from Sequences of Chloroplast Gene *MatK* and Nuclear Ribosomal DNA ITS Region." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25 (2): 306–15.
- Liao, Z., M. Chen, X. Sun, & K. Tang. 2006. "Micropropagation of Endangered Plant Species." In *Plant Cell Culture Protocols*, 179–85. Humana Press.
- Lima, G. P. P., R. A. da Silva Campos, L. G. Willadino, T. J. R. Câmara, & F. Vianello. 2012. "Polyamines, Gelling Agents in Tissue Culture, Micropropagation of Medicinal Plants and Bioreactors Chapter." In *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*. IntechOpen.

- Linsmaier, E. M., & F. Skoog. 1965. "Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Culture." *Physiologia Plantarum* 18 (1): 100–127.
- Lisboa, A. C. O. 2017. "Germinação de Sementes e Desenvolvimento Embrionário de *Corema Album*: Efeito Dos Tratamentos Físicos e Químicos." Universidade de Lisboa.
- Litwinczuk, W. 2007. "Rozmnażanie Borówki Wysokiej (*Vaccinium Corymbosum* L.) w Kulturach in Vitro." In *Wpływ Mikrorozmnażania Na Wzrost i Owocowanie Krzewów*. Rzeszów: Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego.
- Lloyd, G. B., & B. H. McCown. 1980. "Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia Latifolia*, by Use of Shoot-Tip." *Proceedings - International Plant Propagators' Society* 30: 421–27.
- Lone, A. B., L. K. Unemoto, L. Y. Yamamoto, L. Costa, J. A. Schnitzer, A. J. Sato, W. S. Ricce, A. M. de Assis, & S. R. Roberto. 2010. "Enraizamento de Estacas de Azaleia (*Rhododendron Simsii* Planch.) No Outono Em AIB e Diferentes Substratos." *Ciencia Rural* 40 (8): 1720–25.
- Lopes, M. R. M. 2015. "O Coelho-Bravo Como Facilitador Da Invasão Do Chorão Nos Sistemas Dunares: Implicações Para a Conservação de Uma Espécie Endêmica." Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- López-Dóriga, Inés L. 2018. "The Archaeobotany and Ethnobotany of Portuguese or White Crowberry (*Corema Album* (L.) D. Don)." *Ethnobiology Letters* 9 (2): 19–32. <https://doi.org/10.14237/ebl.9.2.2018.1069>.
- Loureiro, J., E. Rodriguez, J. Doležel, & C. Santos. 2007. "Two New Nuclear Isolation Bufferes for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species." *Annals of Botany* 100: 875–88. <https://doi.org/10.1093/annbot/mcm152>.
- Loureiro, J., & C. Santos. 2004. "Aplicação Da Citometria de Fluxo Ao Estudo Do Genoma Vegetal." *Boletim de Biotecnologia* 77: 18–29.
- Macedo, D., L. Tavares, G. J. McDougall, H. V. Miranda, D. Stewart, R. B. Ferreira, S. Tenreiro, T. F. Outeiro, & C. N. Santos. 2015. "(Poly)Phenols Protect from α -Synuclein Toxicity by Reducing Oxidative Stress and Promoting Autophagy." *Human Molecular Genetics* 24 (6): 1717–32.
- Machado, M. P., A. L. L. da Silva, L. A. Biasi, C. Deschamps, J. C. B. Filho, & F. Zanette. 2014. "Influence of Calcium Content of Tissue on Hyperhydricity and Shoot-Tip Necrosis of in Vitro Regenerated Shoots of *Lavandula Angustifolia* Mill." *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57 (5): 636–43.
- Mackay, W. A. 1996. "Micropropagation of Texas Madrone, *Arbutus Xalapensis* H.B.K." *HortScience* 31 (6): 1028–29.
- Magnitskiy, S., G. M. Ligarreto, & H. O. Lancheros. 2011. "Rooting of Two Types of Cuttings of Fruit Crops *Vaccinium Floribundum* Kunth and *Disterigma Alaternoides* (Kunth) Niedenzu (Ericaceae)." *Agronomía Colombiana* 29 (2): 361–71.
- Maizura, M., A. Aminah, & W. M. Wan Aida. 2011. "Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Kesum (*Polygonum Minus*), Ginger (*Zingiber Officinale*) and Turmeric (*Curcuma Longa*) Extract." *International Food Research Journal* 18: 529–34.
- Majada, J. P., F. Tadeo, M. A. Fal, & R. Sánchez-Tamés. 2000. "Impact of Culture Vessel Ventilation on the Anatomy and Morphology of Micropropagated Carnation." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 207–14.

- Mamun, N. H. A., U. Egertsdotter, & C. K. Aidun. 2015. "Bioreactor Technology for Clonal Propagation of Plants and Metabolite Production." *Frontiers in Biology* 10 (2): 177–93.
- Mariz-Ponte, N., R. J. Mendes, S. Sario, J. M.P. Ferreira de Oliveira, P. Melo, & C. Santos. 2018. "Tomato Plants Use Non-Enzymatic Antioxidant Pathways to Cope with Moderate UV-A/B Irradiation: A Contribution to the Use of UV-A/B in Horticulture." *Journal of Plant Physiology* 221: 32–42.
- Martine, C. T., D. Lubertazzi, & A. Dubrul. 2005. "The Biology of *Corema Conradii*: Natural History, Reproduction, and Observations of a Post-Fire Seedling Recruitment." *Northeastern Naturalist* 12 (3): 267–86.
- Martins, J. P. R., E. R. Schimildt, R. S. Alexandre, B. R. Santos, & G. C. Magevski. 2013. "Effect of Synthetic Auxins on in Vitro and Ex Vitro Bromeliad Rooting." *Pesquisa Agropecuária Tropical* 43 (2): 138–46.
- Mathur, A., A. K. Mathur, P. Verma, S. Yadav, M. L. Gupta, & M. P. Darokar. 2008. "Biological Hardening and Genetic Fidelity Testing of Micro-Cloned Progeny of *Chlorophytum Borivillianum* Sant. et Fernand." *African Journal of Biotechnology* 7 (8): 1046–53.
- McClelland, M. T., M. A.L. Smith, & Z. B. Carothers. 1990. "The Effects of in Vitro and Ex Vitro Root Initiation on Subsequent Microcutting Root Quality in Three Woody Plants." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23: 115–23.
- Mccown, B. H. 2000. "Recalcitrance of Woody and Herbaceous Perennial Plants: Dealing with Genetic Predeterminism." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36: 149–54.
- McCown, B. H. 1988. "Adventitious Rooting of Tissue Cultured Plants." In *Adventitious Root Formation in Cuttings*, edited by T.M. Davis, B.H. Haissig, and N. Shankhla, 289–302. Discorides Press.
- Mcewen, M. C. 1894. "The Comparative Anatomy of *Corema Alba* and *Corema Conradii*." *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 21 (7): 277–85.
- Mehrotra, S., M. K. Goel, A. K. Kukreja, & B. N. Mishra. 2007. "Efficiency of Liquid Culture Systems over Conventional Micropropagation : A Progress towards Commercialization." *African Journal of Biotechnology* 6 (13): 1484–92.
- Mehta, Y. R., & D. C. Angra. 2000. "Somaclonal Variation for Disease Resistance in Wheat and Production of Dihaploids through Wheat x Maize Hybrids." *Genetics and Molecular Biology* 23 (3): 617–22.
- Mhamdi, A., & F. Van Breusegem. 2018. "Reactive Oxygen Species in Plant Development." *Development* 145 (15).
- Miguel, C., & L. Marum. 2011. "An Epigenetic View of Plant Cells Cultured in Vitro: Somaclonal Variation and Beyond." *Journal of Experimental Botany* 62 (11): 3713–25.
- Mihaljevic, I., K. Dugalic, V. Tomas, M. Viljevac, A. Pranjic, Z. Cmelik, B. Puskar, & Z. Jurkovic. 2013. "In Vitro Sterilization Procedures for Micropropagation of 'Oblacinska' Sour Cherry." *Journal of Agricultural Sciences* 58 (2): 117–26.
- Miller, G., N. Suzuki, S. Ciftci-yilmaz, & R. Mittler. 2010. "Reactive Oxygen Species Homeostasis and Signalling during Drought and Salinity Stresses." *Plant, Cell and Environment* 33: 453–67.
- Mittler, R. 2002. "Oxidative Stress , Antioxidants and Stress Tolerance." *Trends in Plant Science* 7 (9): 1360–65.

- . 2016. "ROS Are Good." *Trends in Plant Science* 22 (1): 11–19.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, & F. Van Breusegem. 2004. "Reactive Oxygen Gene Network of Plants." *Trends in Plant Science* 9 (10): 1360–85.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V. B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulaev, & F. Van Breusegem. 2011. "ROS Signaling: The New Wave?" *Trends in Plant Science* 16 (6): 300–309.
- R. Sharma, & R. C. Sobti. 2005. "Molecular Analysis of Genetic Stability in Micropropagated Apple Rootstock MM106." *Scientia Horticulturae* 104 (2): 151–60.
- Moghe, G. D., & R. L. Last. 2015. "Something Old , Something New : Conserved Enzymes and the Evolution of Novelty in Plant Specialized Metabolism." *Update on Metabolic Evolution* 169: 1512–23.
- Mohamed, G., L.Z. Khusnetdinova, & O.A. Timofeeva. 2018. "Elaboration of Micropropagation Protocol for *Vaccinium Corymbosum* Cv." Sunt Blue Giant ." *Asian Journal of Plant Science and Research* 8 (5): 1–11.
- Moldovan, L., A. Gaspar, L. Toma, O. Craciunescu, & C. Saviuc. 2011. "Comparison of Polyphenolic Content and Antioxidant Capacity of Five Romanian Traditional Medicinal Plants." *Revista de Chimie* 62 (3): 299–303.
- Molnár, Z., E. Virág, & V. Ördög. 2011. "Natural Substances in Tissue Culture Media of Higher Plants." *Acta Biologica Szegediensis* 55 (1): 123–27.
- Monteiro, T. R., E. O. Freitas, G. F. Nogueira, & J. E. Scherwinski-Pereira. 2018. "Assessing the Influence of Subcultures and Liquid Medium during Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.)." *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 93 (2): 196–203.
- Moubayidin, L., R. D. Mambro, & S. Sabatini. 2009. "Cytokinin-Auxin Crosstalk." *Trends in Plant Science* 14 (10): 557–62.
- Mulabagal, V., & H. Tsay. 2004. "Plant Cell Cultures - an Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites." *International Journal of Applied Science and Engineering* 2 (1): 29–48.
- Munné-Bosch, S. 2005. "The Role of A-Tocopherol in Plant Stress Tolerance." *Journal of Plant Physiology* 162: 743–48.
- Murashige, T. 1974. "Plant Propagation through Yissue Cultures." *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135–66.
- Murashige, T., & F. Skoog. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture." *Physiologia Plantarum* 15: 473–97.
- Namli, S., Ç Isikalan, F. Akbas, & D. Basaran. 2011. "Improved in Vitro Rooting of Almond (*Amygdalus Communis*) Cultivar 'Nonpareil .' " *Plant Omics Journal* 4 (1): 14–18.
- Narayana, P. S., D. Varalakshmi, & T. Pullaiah. 2016. *Research Methodology In Plant Science*. Scientific Publishers.
- Nikolova, M., M. Petrova, E. Zayova, A. Vitkova, & L. Evstatieva. 2013. "Comparative Study of in Vitro, Ex Vitro and in Vivo Grown Plants of *Arnica Montana*-Polyphenols and Free Radical Scavenging Activity." *Acta Botanica Croatica* 72 (1): 13–22.

- Nitsch, J.P., & C. Nitsch. 1969. "Haploid Plants from Pollen Grains." *Science* 163 (3862): 85–87.
- Noctor, G., & C. H. Foyer. 1998. "Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249–79.
- Nor Aini, A. S., B. L. Goh, & R. Ridzuan. 2009. "The Effects of Different Indole-3-Butyric Acid (IBA) Concentrations , Two Light Regimes of in Vitro Rooting and Acclimatization of in Vitro Teak (*Tectona Grandis* L . f) Plantlets." *African Journal of Biotechnology* 8 (22): 6158–61
- Norton, M. E., & C. R. Norton. 1986. "Change in Shoot Proliferation with Repeated in Vitro Subculture of Shoots of Woody Species of Rosaceae." *Plant Cell Tissue Organ Culture* 5: 187–97.
- Nowakowska, K., A. Pacholczak, & W. Tepper. 2019. "The Effect of Selected Growth Regulators and Culture Media on Regeneration of *Daphne Mezereum* L. 'Alba.'" *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali* 30: 197–205.
- Odutayo, O. I., N. A. Amusa, O. O. Okutade, & Y. R. Ogunsanwo. 2007. "Sources of Microbial Contamination in Tissue Culture Laboratories in Southwestern Nigeria." *African Journal of Agricultural Research* 2 (3): 67–72.
- Oksman-Caldentey, K., & D. Inzé. 2004. "Plant Cell Factories in the Post-Genomic Era: New Ways to Produce Designer Secondary Metabolites." *Trends in Plant Science* 9 (9): 433–40.
- Oliveira, M. L. de, A. Xavier, R. M. P. Filho, & J. P. dos Reis. 2014. "Efeito Do Intervalo de Imersão e de Injeção de Ar Na Multiplicação in Vitro de *Eucalyptus Grandis* x *Eucalyptus Urophylla* Em Biorreator de Imersão Temporária." *Ciência Florestal* 24 (1): 37–45.
- Oliveira, P. B. de, & A. Dale. 2012. "Corema Album (L.) D. Don, the White Crowberry-a New Crop." *Journal of Berry Research* 2: 123–33.
- Oliveira, P. B., T. Valdivieso, S. Trindade, I. Evaristo, F. Nóbrega, A. A. Lima, A. R. Silva, M. Santos, T. Magalhães, A. Lisboa, & C. M. Oliveira. 2016. "Os Primeiros Passos Na Investigação Em Corema Album (Camarinha)." *Vida Rural*, 29–31.
- Ormonde, J. M., & J. P. Constância. 1991. "Contributo Para o Conhecimento Da Flora Vascular Dos Açores. I: Anotações e Esclarecimentos Relativos à Ilha Do Pico." 2 (1977): 79–98.
- Ostrolucká, M. G., A. Gajdošová, G. Libiaková, K. Hrubíková, & M. Bezo. 2007. "Protocol for Micropropagation of Selected *Vaccinium*." In *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, edited by S. M. Jain and Häggman, 445–55. Berlin: Springer.
- Ostrolucká, M. G., A. Gajdošová, E. Ondrušková, M. Lateèková, & G. Libiaková. 2010. "Effect of Medium PH on Axillary Shoot Proliferation of Selected *Vaccinium Vitis-Idaea* L. Cultivars." *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 52 (2): 92–96.
- Overvoorde, P., H. Fukaki, & T. Beeckman. 2010. "Auxin Control of Root Development." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (6): 1–17.
- Oyebanji, O. B., O. Nweke, O. Odebunmi, N. B. Galadima, M. S. Idris, U. N. Nnodi, A. S. Afolabi, & G. H. Ogbadu. 2009. "Simple , Effective and Economical Explant-Surface Sterilization Protocol for Cowpea , Rice and Sorghum Seeds." *African Journal of Biotechnology* 8 (20): 5395–99.
- Ozougwu, J. C. 2016. "The Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Oxidative Stress." *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences* 3 (6): 1–8.

Paek, K. Y., D. Chakrabarty, & E. J. Hahn. 2005. "Application of Bioreactor Systems for Large Scale Production of Horticultural and Medicinal Plants." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 287–300.

Paek, K. Y., E. J. Hahn, & S. H. Son. 2001. "Application of Bioreactors for Large-Scale Micropropagation Systems of Plants." *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 37: 149–57.

Pagare, S., M. Bhatia, N. Tripathi, S. Pagare, & Y. K. Bansal. 2015. "Secondary Metabolites of Plants and Their Role: Overview." *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 9 (3): 293–304.

Park, S. W., J. H. Jeon, H. S. Kim, Y. M. Park, C. Aswath, & H. Joung. 2004. "Effect of Sealed and Vented Gaseous Microenvironments on the Hyperhydricity of Potato Shoots in Vitro." *Scientia Horticulturae* 99: 199–205.

Phulwaria, M., M. K. Rai, Harish, A. K. Gupta, K. Ram, & N. S. Shekhawat. 2012. "An Improved Micropropagation of Terminalia Bellirica from Nodal Explants of Mature Tree." *Acta Physiologiae Plantarum* 34 (1): 299–305.

Pichersky, E., & E. Lewinsohn. 2011. "Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism." *Annual Review of Plant Biology* 62: 549–66.

Pierik, R. L. M. 1997. "Sterilization of Plant Material." In *In Vitro Culture of Higher Plants*, 89–94. Springer, Dordrecht.

Pinto, E., T. C. S. Sigaud-Kutner, M. A. S. Leitão, O. K. Okamoto, D. Morse, & P. Colepicolo. 2003. "Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae." *Journal of Phycology* 39: 1008–18.

Poonam, R. Bhardwaj, R. Sharma, N. Handa, H. Kaur, R. Kaur, G. Sirhindi, & A. K. Thukral. 2014. "Prospects of Field Crops for Phytoremediation of Contaminants." In *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*, edited by P. Ahmad & S. Rasool, 2:449–70. Academic Press.

Pospíšilová, J., I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel, & Š. Plzánková. 1999. "Acclimatization of Micropropagated Plants to Ex Vitro Conditions." *Biologia Plantarum* 42 (4): 481–97.

Prakash, S., M. I. Hoque, & T. Brinks. 2002. "Culture Media and Containers." In *Low Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries. Proceedings of a Technical Meeting*, 29–40. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.

Prediere, S. 2001. "Mutation Induction and Tissue Culture in Improving Fruits." *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64: 185–210.

Pruski, K. W., T. Lewis, T. Astatkie, & J. Nowak. 2000. "Micropropagation of Chokecherry and Pincherry Cultivars." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 93–100.

Qaddoury, A., & M. Amssa. 2004. "Effect of Exogenous Indole Butyric Acid on Root Formation and Peroxidase and Indole-3-Acetic Acid Oxidase Activities and Phenolic Contents in Date Palm Offshoots." *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45: 127–31.

Quiala, E., M. V. Jiménez-Tello, R. Barbón, M. Chavez, M. de Fera, M. La O, & M. Pérez. 2014. "Influence of 6-Benzyladenine and Gelling Agent on the Reduction of Hyperhydricity in Tectona Grandis L." *Revista Colombiana de Biotecnología* 16 (1): 129–36.

Racchi, M. L. 2013. "Antioxidant Defenses in Plants with Attention to Prunus and Citrus Spp." *Antioxidants* 2: 340–69.

- Rai, A., K. Saito, & M. Yamazaki. 2017. "Integrated Omics Analysis of Specialized Metabolism in Medicinal Plants." *The Plant Journal* 90 (4): 764–87.
- Raja, A., P. Gajalakshmi, & M. Raja. 2010. "Drugs from the Natural Bio Sources for Human Disease." *International Journal of Pharmacology* 6 (4): 360–63.
- Ramawat, K. G., S. Dass, & M. Mathur. 2009. "The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potential of Medicinal Plants." In *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, 7–32. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Ranaweera, K. K., M. T K Gunasekara, & J. P. Eeswara. 2013. "Ex Vitro Rooting: A Low Cost Micropropagation Technique for Tea (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntz) Hybrids." *Scientia Horticulturae* 155: 8–14.
- Rani, V., & S. N. Raina. 2000. "Genetic Fidelity of Organized Meristem-Derived Micropropagated Plants: A Critical Reappraisal." *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 36 (5): 319–30.
- Raskin, I., D. M. Ribnicky, S. Komarnytsky, N. Ilic, A. Poulev, N. Borisjuk, A. Brinker, D. A. Moreno, C. Ripoll, N. Yakobi, J. M. O'neal, T. Cornwell, I. Pastor, & B. Fridlender. 2002. "Plants and Human Health in the Twenty-First Century." *Trends in Biotechnology* 20 (12): 522–31.
- Rates, S. M. K. 2001. "Plants as Source of Drugs." *Toxicon* 39: 603–13.
- Remphrey, W. R., C. E. Palmer, & M. J. Blouw. 1993. "In Vitro Branching in Relation to Repeated Subculture in Two Cultivars of *Potentilla Fruticosa*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 235–40.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, & G. Paganga. 1996. "Structure - Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids." *Free Radical Biology & Medicine* 20 (7): 933–56.
- Río, L. A. del, F. J. Corpas, L. M. Sandalio, J. M. Palma, M. Gómez, & J. B. Barroso. 2002. "Reactive Oxygen Species, Antioxidant Systems and Nitric Oxide in Peroxisomes." *Journal of Experimental Botany* 53 (372): 1255–72.
- Río, L. A. del, & R. P. Donaldson. 1995. "Production of Superoxide Radicals in Glyoxysomal Membranes from Castor Bean Endosperm." *Journal of Plant Physiology* 146: 283–87 (2): 1–8.
- Roy, A. 2017. "A Review on the Alkaloids an Important Therapeutic Compound from Plants." *International Journal of Plant Biotechnology* 3 (2): 1–9.
- Rungsung, W., K. K. Ratha, S. Dutta, A. K. Dixit, & J. Hazra. 2015. "Secondary Metabolites of Plants in Drugs Discovery." *World Journal of Pharmaceutical Research* 4 (7): 604–13.
- Russell, W., & G. Duthie. 2011. "Plant Secondary Metabolites and Gut Health: The Case for Phenolic Acids." *Proceedings of the Nutrition Society* 70: 389–96.
- Saad, A. I., & A. M. Elshahed. 2012. "Plant Tissue Culture Media." In *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*, 29–40. InTech.
- Sacerdoti, F. M., A. Giordano, & C. Cavaliere, eds. 2016. *Advanced Imaging Techniques in Clinical Pathology*. Springer.
- Saha, S., H. Mori, & K. Hattori. 2007. "Synergistic Effect of Kinetin and Benzyl Adenine Plays a Vital Role in High Frequency Regeneration from Cotyledon Explants of Bottle Gourd (*Lagenaria Siceraria*) in Relation to Ethylene Production." *Breeding Science* 57: 197–202.

Saiju, H. K. 2006. "Tree Tissue Culture and Ex Vitro Sand Rooting for Reforestation." In *Plantation Technology in Tropical Forest Science*, edited by K. Suzuki, i K. Ishi, S. Sakurai, and S. Sasaki, 151–54. Springer.

Saito, K., & F. Matsuda. 2010. "Metabolomics for Functional Genomics , Systems Biology, and Biotechnology." *Annual Review of Plant Biology* 61: 463–89.

Sanchez, M. C., M. C. San-Jose, A. Ballester, & A. M. Vieitez. 1996. "Requirements for in Vitro Rooting of *Quercus Robur* and *Q. Rubra* Shoots Derived from Mature Trees." *Tree Physiology* 16: 673–80.

Sandalio, L. M., V. M. Fernández, F. L. Rupérez, & L. A. Del Río. 1988. "Superoxide Free Radicals Are Produced in Glyoxysomes." *Plant Physiology* 87: 1–4.

Sandalio, L. M., M. Rodríguez-Serrano, M. C. Romero-Puertas, & L. A. del Río. 2013. "Role of Peroxisomes as a Source of Reactive Oxygen Species (ROS) Signaling Molecules." In *Peroxisomes and Their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism*, 231–55. Springer.

Santos, C. 2016. "Estágio Micropropagação - Documento Pedagógico." Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Santos, M. S., C. M. de Oliveira, T. Valdivieso, & P. B. de Oliveira. 2014. "Effects of Pretreatments on *Corema Album* (L.) D. Don (Subsp. *Album*) Seeds' Germination." *Journal of Berry Research* 4: 183–92.

Sathyanarayana, B .N., & D. B. Verghese, eds. 2007. *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols*. IK International Publishing House Pvt. Ltd.

Scandalios, J. G. 2005. "Oxidative Stress : Molecular Perception and Transduction of Signals Triggering Antioxidant Gene Defenses." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 995–1014.

Scartezzini, P., & E. Speroni. 2000. "Plants of Indian Traditional Medicine with Antioxidant Activity." *Journal of Ethnopharmacology* 71: 23–43.

Schenk, R. U., & A. C. Hildebrandt. 1972. "Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures." *Canadian Journal of Botany* 50 (1): 199–204.

Shan, B., Y. Z. Cai, M. Sun, & H. Corke. 2005. "Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7749–59.

Shani, E., R. Weinstain, Y. Zhang, C. Castillejo, E. Kaiserli, J. Chory, R. Y. Tsien, & M. Estelle. 2013. "Gibberellins Accumulate in the Elongating Endodermal Cells of *Arabidopsis* Root." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (12): 4834–39.

Sharma, P., A. B. Jha, R. S. Dubey, & M. Pessarakli. 2012. "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions." *Journal of Botany*.

Shastri, V. 2006. *Industrial Biotechnology*. Gyan Publishing House.

Shekafandeh, A., & S. T. Shahcheraghi. 2017. "Ex Vitro Rooting and Survival of Regenerated Shoots from Three Fig(*Ficus Carica* L.) Genotypes." *Agriculturae Conspectus Scientificus* 82: 383–87.

Shekhawat, M. S., & M. Manokari. 2015. "Efficient in Vitro Propagation by Ex Vitro Rooting Methods of *Artemisia Absinthium* L., an Ethnobotanically Important Plant." *Chinese Journal of Biology* 2015.

Shigeoka, S., T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, & K. Yoshimura. 2002. "Regulation and Function of Ascorbate Peroxidase Isoenzymes." *Journal of Experimental Botany* 53 (372): 1305–19.

Silva, G. M., J. P. Alvarenga, S. K.V. Bertolucci, M. C. Tavares, M. A. Rodrigues, & J. E.B.P. Pinto. 2017. "Effect of Chemical and Physical Factors in in Vitro Propagation and Volatile Fraction Analysis of *Aloysia Triphylla* (L'Herit) Britton." *Acta Horticulturae* 1155: 309–16.

Silva, Jaime A. Teixeira da, ed. 2006. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Global Science Books.

Silva, L., E. Ojeda Land, & J. L. Rodriguez Luengo, eds. 2008. *Invasive Terrestrial Flora and Fauna of Macaronesia. Top 100 in Azores, Madeira and Canaries*. Ponta Delgada: ARENA.

Singh, M., S. Sonkusale, Ch. Niratker, and P. Shukla. 2014. "Micropropagation of *Shorea Robusta*: An Economically Important Woody Plant." *Journal of Forest Science* 60 (2): 70–74.

Singh, R. 2015. "Medicinal Plants : A Review." *Journal of Plant Sciences* 3 (1–1): 50–55.

Singh, R., S. Singh, P. Parihar, R. K. Mishra, D. K. Tripathi, V. Singh, D. K. Chauchan, & S. M. Prasad. 2016. "Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants ' Developmental Processes." *Frontiers in Plant Science* 7: 1299.

Singh, V. P., S. Singh, J. Kumar, & S. M. Prasad. 2015. "Hydrogen Sulfide Alleviates Toxic Effects of Arsenate in Pea Seedlings through Up-Regulation of the Ascorbate-Glutathione Cycle: Possible Involvement of Nitric Oxide." *Journal of Plant Physiology* 181: 20–29.

Sliwinska, E. 2018. "Flow Cytometry - a Modern Method for Exploring Genome Size and Nuclear DNA Synthesis in Horticultural and Medicinal Plant Species." *Folia Horticulturae* 30 (1): 103–28.

Smirnov, N. 1993. "The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation." *New Phytologist* 125 (1): 27–58.

Sota, V., & E. Kongjika. 2014. "The Effect of Nutrient Media in Micropropagation and in Vitro Conservation of Wild Population of Mahaleb Cherry (*Prunus Mahaleb* L.)." *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Science* 3 (6): 453–56.

Sovari, S. 1986. "Comparison of Anther Cultures of Barley Cultivars in Barley-Starch and Agar Gelatinized Media." *Annales Agriculturae Fenniae* 25 (4): 249–54.

Sreedhar, R. V., L. Venkatachalam, & B. Neelwarne. 2009. "Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in *Vanilla* (*Vanilla Planifolia*)." *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 46–57.

Štefančič, M., F. Štampar, & G. Osterc. 2005. "Influence of IAA and IBA on Root Development and Quality of *Prunus* 'GiSelA 5' Leafy Cuttings." *HortScience* 40 (7): 2052–55.

Steingroewer, J., T. Bley, V. Georgiev, I. Ivanov, F. Lenk, A. Marchev, & A. Pavlov. 2013. "Bioprocessing of Differentiated Plant in Vitro Systems." *Engineering in Life Sciences* 13 (1): 26–38.

Stirk, W. A., & J. V. Staden. 2014. "Plant Growth Regulators in Seaweeds: Occurrence, Regulation and Functions." In *Advances in Botanical Research*, 71:125–59. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00005-6>.

Stuart, D.A., S.G. Strickland, & K.A. Walker. 1987. "Bioreactor Production of Alfalfa Somatic Embryos." *Horticulture Science* 22: 800–803.

Suda, J., P. Kron, B. C. Husband, & P. Trávníček. 2007. "Flow Cytometry and Ploidy: Applications in Plant Systematics, Ecology and Evolutionary Biology." In *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*, edited by J. Doležal, J. Greilhuber, and J. Suda, 103–30. Weinheim: Wiley-VCH.

Suman, S. 2017. "Plant Tissue Culture: A Promising Tool of Quality Material Production with Special Reference to Micropropagation of Banana." *Biochemical and Cellular Archives* 17 (1): 1–26.

Suthanthiraraj, P. P. A., & S. W. Graves. 2013. "Fluidics." *Current Protocols Cytometry* 65: 1–2.

Sutter, E. G. 1996. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Edited by Gray and R. N. Trigiano. New York: CRC Press.

Suzuki, N., S. Koussevitzky, R. Mittler, & G. Miller. 2012. "ROS and Redox Signalling in the Response of Plants to Abiotic Stress." *Plant, Cell and Environment* 35: 259–70.

Takayama, S. 1986. "Mass Propagation of Plants through Shake Culture Techniques." *Plant Tissue Culture Letters* 1: 8–13.

Takayama, S., & M. Akita. 1994. "The Types of Bioreactors Used for Shoots and Embryos." *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39: 147–56.

Tarkowská, D., K. Doležal, P. Tarkowski, C. Astot, J. Holub, K. Fuksová, T. Schmulling, G. Sandberg, & M. Strnad. 2003. "Identification of New Aromatic Cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x Canadensis* Leaves by LC-(+)-ESI-MS and Capillary Liquid Chromatography/Fritfast Atom Bombardment Mass Spectrometry." *Physiologia Plantarum* 117: 579–90.

Tawar, P. N., R. A. Sawant, S. G. Dalvi, A. A. Nikam, P. G. Kavar, & R. M. Devarumath. 2008. "An Assessment of Somaclonal Variation in Micropropagated Plants of Sugarcane by RAPD Markers." *Sugar Tech* 10 (2): 124–27.

Teranishi, Y., A. Tanaka, S. Fukui, & M. Osumi. 1974. "Catalase Activities of Hydrocarbon-Utilizing *Candida* Yeasts." *Agricultural and Biological Chemistry* 38 (6): 1213–20.

Terashima, T., & S. Nishimura. 1991. "Mass Propagation of Somatic Embryos in Carrot (*Daucus Carota*) Using Bioreactor. The Effects of Stirring Methods and Dissolved Oxygen Concentration on the Embryogenesis." *Ikusyugaku Zasshi* 41 (2): 234–35.

Thimann, K. V., & F.W. Went. 1934. "On the Chemical Nature of the Rootforming Hormone." *Proceedings of the Royal Academy of Sciences at Amsterdam* 37 (7): 456–59.

Thwe, A. A., H. H. Kim, H. H. Kim, & S. U. Park. 2015. "Enhancement of in Vitro Rooting by Gelling Agents and Activated Charcoal in *Rehmannia glutinosa* L." *Online Journal of Biological Sciences* 15 (2): 49–52.

Tisserat, B., & C. Vandercook. 1985. "Development of an Automated Plant Culture System." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5 (2): 107–17.

- Topoonyanont, N., S. Jaikanta, & P. Boonmanee. 2011. "Curcuma Alismatifolia Gagnep. Micropropagation in Twin-Flasks Temporary Immersion Bioreactor." In *X International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials*, 886:267–71.
- Torres, K. C. 1989. "Tissue Culture Media-Composition." In *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*, 26–51. Springer, Boston, MA.
- Traveset, A. 1998. "Effect of Seed Passage through Vertebrate Frugivores' Guts on Germination: A Review." *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 1 (2): 151–90.
- Tuteja, N., P. Ahmad, B. B. Panda, & R. Tuteja. 2009. "Genotoxic Stress in Plants: Shedding Light on DNA Damage, Repair and DNA Repair Helicases." *Mutation Research* 681: 134–49.
- Usman, A. B., S. Abubakar, C. Alaku, & O. Nnadi. 2014. "Plant: A Necessity of Life." *International Letters of Natural Sciences* 20: 151–59.
- Vaahtera, L., M. Brosché, M. Wrzaczek, & J. Kangasjarvi. 2014. "Specificity in ROS Signaling and Transcript Signatures." *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (9): 1422–41.
- Vardja, R., & T. Vardja. 2001. "The Effect of Cytokinin Type and Concentration and the Number of Subcultures on the Multiplication of Some Decorative Plants." *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* 50 (1): 22–32.
- Veeresham, C. 2012. "Natural Products Derived from Plants as a Source of Drugs." *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 3 (4): 200–201. <http://www.japtr.org/text.asp?2012/3/4/200/104709>.
- Verma, O. P. 2012. "Standardization of Auxin Concentration for Root Induction in Chrysanthemum Morifolium." *Advances in Applied Science Research* 3 (3): 1449–53.
- Vescan, L. A., D. Clapa, A. Fira, & D. Pamfil. 2012. "Micropropagation of Cold Resistant Blackberry Cultivar 'Gazda.'" *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies* 69: 1–2.
- Vidal, N., B. Blanco, & B. Cuenca. 2015. "A Temporary Immersion System for Micropropagation of Axillary Shoots of Hybrid Chestnut." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123: 229–43.
- Vrána, J., P. Cápál, M. Bednářová, & J. Doležel. 2014. "Flow Cytometry in Plant Research: A Success Story." In *Applied Plant Cell Biology. Plant Cell Monographs*, edited by P. Nick and Z. Opatrny, 395–430. Springer.
- Vujović, T., Dj. Ružić, & R. Cerović. 2012. "In Vitro Shoot Multiplication as Influenced by Repeated Subculturing of Shoots of Contemporary Fruit Rootstocks." *Horticulture Science* 39 (3): 101–7.
- Wagner, D., D. Przybyla, R. Op Den Camp, C. Kim, F. Landgraf, P. L. Keun, M. Würsch, C. Laloi, M. Nater, E. Hideg, & K. Apel. 2004. "The Genetic Basis of Singlet Oxygen-Induced Stress Response of Arabidopsis Thaliana." *Science* 306: 1183–85.
- Wagner, U., R. Edwards, D. P. Dixon, & F. Mauch. 2002. "Probing the Diversity of the Arabidopsis Glutathione S -Transferase Gene Family." *Plant Molecular Biology* 49: 515–32.
- Wang, P. J., & C. Y. Hu. 1980. "Regeneration of Virus-Free Plants through in Vitro Culture." In *Advances in Biochemical Engineering*, edited by A. Fiechter, 61–99. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Weaver, J. L. 2000. "Introduction to Flow Cytometry." *Methods* 21: 199–201.

- Weckx, S., D. Inzé, & L. Maene. 2019. "Tissue Culture of Oil Palm: Finding the Balance between Mass Propagation and Somaclonal Variation." *Frontiers in Plant Science* 10.
- Weng, J. K. 2014. "The Evolutionary Paths towards Complexity: A Metabolic Perspective." *New Phytologist* 201 (4): 1141–49.
- Westhuizen, A. van der. 2014. "The Use of Meta-Topolin as an Alternative Cytokinin in the Tissue Culture of Eucalyptus Species." *Acta Horticulturae*, no. 1055: 25–28.
- Wilkerson, M. J. 2012. "Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion." *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 42 (1): 53–71.
- Willekens, H., R. Villarroel, M. Van Montaglp, D. Inzé, & W. Van Camp. 1994. "Molecular Identification of Catalases from *Nicotiana Plumbaginifolia* (L.)." *FEBS Letters* 352: 79–83.
- Williams, R. R., & A. M. Taji. 1991. "Effect of Temperature, Gel Concentration and Cytokinins on Vitrification of *Olearia Microdisca* (J.M. Black) in Vitro Shoot Cultures." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26: 1–6.
- Wink, M., ed. 2010. "Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites." In *Annual Plant Reviews*, 1–19. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Wong, C. C., H. B. Li, K. W. Cheng, & F. Chen. 2006. "A Systematic Survey of Antioxidant Activity of 30 Chinese Medicinal Plants Using the Ferric Reducing Antioxidant Power Assay." *Food Chemistry* 97: 705–11.
- Woo, S. M., & H. Y. Wetzstein. 2008. "An Efficient Tissue Culture Regeneration System for Georgia Plume , *Elliottia Racemosa* , a Threatened Georgia Endemic." *Horticultural Science* 43 (2): 447–53.
- Wozny, A., & N. Miler. 2016. "LEDs Application in Ex Vitro Rooting and Acclimatization of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum x Grandiflorum/Ramat./Kitam*)." *Eletronical Journal of Polish Agricultural Universities* 19: 1–8.
- Wu, C., F. Chen, X. Wang, H. J. Kim, G. Q. He, V. Haley-Zitlin, & G. Huang. 2006. "Antioxidant Constituents in Feverfew (*Tanacetum Parthenium*) Extract and Their Chromatographic Quantification." *Food Chemistry* 96: 220–27.
- Y. H., H. N. Murthy, M. H. Ammar, S. S. Alghamdi, N. A. Al-Suhaibani, A. A. Alsadon, & K. Y. Paek. 2016. "In Vitro Rooting of Leguminous Plants: Difficulties, Alternatives, and Strategies for Improvement." *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 57 (4): 311–22.
- Yan, H., C. Liang, L. Yang, & Y. Li. 2010. "In Vitro and Ex Vitro Rooting of *Siratia Grosvenorii*, a Traditional Medicinal Plant." *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 115–20.
- Yang, T., & P. J. Davies. 1999. "Promotion of Stem Elongation by Indole-3-Butyric Acid in Intact Plants of *Pisum Sativum* L." *Plant Growth Regulation* 27: 157–60.
- Zavattieri, A., M. Lima, V. Sobral, P. Oliveira, & A. Costa. 2007. "Effects of Carbon Source, Carbon Concentration and Culture Conditions on in Vitro Rooting of *Pinus Pinea* L. Microshoots." In *III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants*, 812:173–80.
- Zhang, B., Z. Niu, A. Zhou, D. Zhang, Q. Xue, W. Liu, J. Chen, J. Shen, & X. Ding. 2019. "Micropropagation of *Dendrobium Nobile* Lindl. Plantlets by Temporary Immersion Bioreactor." *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 13: 395–400.

Zheng, W., & S. Y. Wang. 2001. "Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5165–70.

Ziv, M. 1991a. "Morphogenic Patterns of Plants Micropropagated in Liquid Medium in Shaken Flasks or Large-Scale Bioreactor Cultures." *Israel Journal of Botany* 40 (2): 145–53.

———. 1991b. "Vitrification: Morphological and Physiological Disorders of in Vitro Plants." In *Micropropagation*, edited by P. C. Debergh and R.H. Zimmerman, 45–69. Springer.

———. 1995. "The Control of Bioreactor Environment for Plant Propagation in Liquid Culture." *Acta Horticulturae* 393: 25–38.

———. 2000. "Bioreactor Technology for Plant Micropropagation." *Horticultural Reviews* 24: 1–30.

———. 2005. "Simple Bioreactors for Mass Propagation of Plants." *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81: 277–85.

Zróbek-Sokolnik, A., A. Ślipiko, M. Kucewicz, M. Milewicz, & C. Hołdyński. 2011. "Micropropagation of *Chamaedaphne Calyculata* (L.) Moench by Direct Shoot Organogenesis." *Polish Journal of Natural Sciences* 26 (3): 207–15.

Zunzunegui, M., M. C. Díaz Barradas, A. Clavijo, L. Alvarez Cansino, F. Ain Lhout, & F. García Novo. 2006. "Ecophysiology, Growth Timing and Reproductive Effort of Three Sexual Forms of *Corema Album* (Empetraceae)." *Plant Ecology* 183: 35–46.