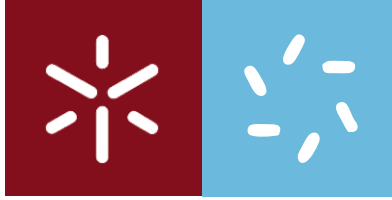


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Daniela Filipa Fernandes Ferreira

Conservação de recursos genéticos: otimização de protocolos para a manutenção *in vitro* de *Malus domestica* L. e *Pyrus communis* L.



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Daniela Filipa Fernandes Ferreira

**Conservação de recursos genéticos:
otimização de protocolos para a
manutenção *in vitro* de *Malus domestica* L.
e *Pyrus communis* L.**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Ana Cristina Gomes Cunha

e da
Engenheira Ana Maria Barata

DECLARAÇÃO

Nome: Daniela Filipa Fernandes Ferreira

Endereço eletrónico: danielafferreira@gmail.com

Telefone: 932592618

Número do Bilhete de Identidade/Cartão Cidadão: 13964600 0 ZX4

Titulo da dissertação: Conservação de recursos genéticos: otimização de protocolos para a manutenção *in vitro* de *Malus domestica* L. e *Pyrus communis* L.

Orientadores:

Professora Doutora Ana Cristina Gomes Cunha

Engenheira Ana Maria Barata

Ano de conclusão: 2018

Designação do Mestrado: Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura:

Pelo sonho é que vamos,
comovidos e mudos.

Chegamos? Não chegamos?
Haja ou não haja frutos,
pelo sonho é que vamos.

Basta a fé no que temos.
Basta a esperança naquilo
que talvez não teremos.
Basta que a alma demos,
com a mesma alegria,
ao que desconhecemos
e ao que é do dia a dia.

Chegamos? Não chegamos?
– Partimos. Vamos. Somos.

Sebastião da Gama

AGRADECIMENTOS

Todo o processo tem um início, um meio e um fim. Todo o processo traz pessoas novas ao caminho, mantendo as que já vinham de processos anteriores, trazendo desafios, evolução e aprendizagem.

À Professora Ana Cunha, um obrigado pela disponibilidade, o profissionalismo, o carinho, a orientação e o esforço prestado para que eu possa concluir este ciclo.

À Engenheira Ana Maria Barata um obrigado dos mais sinceros, pela oportunidade, por me abrir as portas da “casa” sem qualquer entrave, pela confiança e pelo incentivo contínuo.

À Isabel Gomes pelo acompanhamento, pelo saber, por estar presente, por todas as palavras de conforto e por ter sido o meu braço direito ao longo desta etapa. Sem ela, não seria impossível, mas seria um processo mais difícil.

Aos assistentes do Banco Português de Germoplasma Vegetal, Fátima e Eugénio, por me acolherem tão bem e partilharem comigo este processo recheado de sorrisos.

À minha família: avó, pai, tias e tios, primos, irmã, afilhado e Apeles por me aceitaram na fragilidade do meu ser e me deixarem voar para onde o meu coração reconhece a palavra casa, obrigada.

Ao meu pai, o mais especial dos obrigados, por ser o meu maior pilar, por me deixar sonhar e nunca desistir de mim. Obrigada por seres o melhor coração que conheço.

Às minhas estrelas guias e brilhantes, mas entre elas, a mais importante: a minha mãe. Obrigada por me deixares encontrar-te no quarto mais seguro do meu coração, por me teres ensinado a ser a mulher que sou hoje e por me mostrares que o amor supera o mais frio dos mundos.

Ao Bruno, obrigada pelo companheirismo, a amizade, a sinceridade, o amor e o apoio incondicional em todos os processos do meu caminho.

Aos meus amigos, os de infância, os dos escuteiros, os da universidade, os da vida, aos meus verdadeiros amigos, obrigada pelo apoio, a amizade e o amor incondicionais que me enriquecem a cada passo do caminho.

RESUMO

Os recursos genéticos são uma fonte inigualável de materiais relevantes e específicos para muitas áreas (agroalimentar, farmacêutica, têxtil, combustível), e a sua conservação representa uma questão crucial para a manutenção dos ecossistemas e dos agrossistemas. A conservação no setor agroalimentar é baseada no trabalho de instituições como os bancos de germoplasma vegetal, onde se aplicam várias técnicas de conservação *in situ* e *ex situ*.

Este trabalho enquadra-se no esforço de conservação do Banco Português de Germoplasma Vegetal (BPGV), por técnicas de cultura *in vitro*, de variedades de maçã (*Malus domestica* L.) e de pêra (*Pyrus communis* L.) presentes nas suas coleções. Tanto a maçã como a pêra são frutos de grande importância global, contribuindo, assim, a sua conservação, para a segurança alimentar mundial. Por esta razão são também considerados importantes germoplasmas hortícolas em todo o mundo. Protocolos de desinfecção e estabelecimento de explantes, proliferação e enraizamento de rebentos de variedades de macieira e protocolos de proliferação de rebentos de variedades e clones de pereira foram testados. Para uma desinfecção e estabelecimento bem sucedidos são cruciais protocolos que minimizem a contaminação e o escurecimento fenólico (oxidação de compostos fenólicos) dos explantes recolhidos. Este fenómeno é frequente em árvores frutíferas, com ênfase nas macieiras, podendo levar à necrose dos explantes. Neste trabalho foram testados os efeitos do ácido ascórbico (AA), do carvão ativado (AC) e da polivinilpirrolidona (PVP). Aumentar a capacidade de proliferação/multiplicação das variedades Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria de macieira para sustentabilidade da sua conservação no BPGV também foi um dos principais objetivos. O efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) no meio de cultura e da qualidade da luz de crescimento foram avaliados. Os resultados sugerem a necessidade de trocas periódicas para o estabelecimento dos explantes de *Malus*, a fim de reduzir a fenolização, e demonstram a importância da ação da PVP nesta questão. Os resultados da proliferação em *Malus* mostraram que a concentração de 1,0 mg/L de BAP e as luzes vermelha e branca, conduziram a uma maior produção de rebentos a partir de segmentos apicais e nodais. A proliferação em segmentos apicais e nodais de *Pyrus* foi mais elevada sob a influência de meio MS com sorbitol e 4 mg/L de BAP e, como *Malus*, respondeu melhor à luz vermelha e branca. É importante realçar que os genótipos não responderam da mesma maneira a um único procedimento *in vitro* havendo, portanto, a necessidade de ajustar procedimentos para cada variedade.

Palavras-chave: *Malus domestica* L., *Pyrus communis* L., recursos genéticos, conservação, cultura *in vitro*, BAP, qualidade da luz.

ABSTRACT

Genetic resources are an unrivaled source of specific relevant materials in many areas (agri-food, pharmaceutical, textile, fuel), and their conservation represents a crucial issue for the maintenance of ecosystems and agrosystems. Conservation in the agri-food sector is based on the work of institutions as the plant germplasm banks, where several *in situ* and *ex situ* techniques are applied.

This work fits in the effort of conservation of the Banco Português de Germoplasma Vegetal (BPGV), by *in vitro* culture techniques, apple (*Malus domestica* L.) and pear varieties (*Pyrus communis* L.). Both apples and pears are fruits of great global importance, thus contributing their adequate conservation for world food security. Therefore, they are important horticultural germplasm worldwide. Protocols of disinfection, establishment, proliferation and rooting in varieties of *Malus*, and protocols of proliferation in varieties and clones of *Pyrus* were tested. For successful disinfection and establishment, protocols that minimize contamination and phenolic browning (oxidation of phenolic compounds) of the collect explants are pivotal. This phenomenon is frequent in fruit trees, with emphasis to apple trees and can lead to explant necrosis. In this work, the effects of the ascorbic acid (AA), the activated carbon (AC) and the polyvinylpyrrolidone (PVP) were tested. Achieving an increment in the proliferation/multiplication capacity of varieties Camoesa Rosa do Menezes and Camoesa Sta Maria for sustainability of their conservation in BPGV was also a major goal. The effect of different 6-benzylaminopurine (BAP) concentrations in the culture medium, as well as light quality, was evaluated. The results show the need for periodic exchanges in the establishment of the *Malus* explants, to reduce the release of phenolic agents, and show the importance of the action of PVP in this issue. Results of proliferation/multiplication in *Malus* showed that explants respond better to a concentration of 1,0 mg/L of BAP and to red and white light, in order to produce more buds. *Pyrus* proliferation/multiplication in apical and nodal segments was more productive under the influence of a medium MS supplemented with sorbitol and 4 mg/L of BAP, and, as *Malus*, responds better to red and white light.

It's important to highlight that the studied genotypes didn't respond the same way to a single *in vitro* procedure, thus there is a future need to fine tune specific procedures for each variety.

Key words: *Malus domestica* L., *Pyrus communis* L., genetic resources, conservation, *in vitro* culture, BAP, light quality.

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xix
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	xxi
1. Introdução	1
1.1 Recursos genéticos vegetais e a sua importância	2
1.2 Conservação de recursos genéticos vegetais	4
1.2.1 Conservação <i>in situ</i>	4
1.2.2 Conservação <i>ex situ</i>	5
1.2.2.1. Conservação de germoplasma de espécies com propagação seminal.....	6
1.2.2.2. Conservação de germoplasma de espécies com propagação vegetativa.....	7
1.3 Propagação e conservação <i>in vitro</i> de plantas	8
1.3.1 Fatores determinantes da propagação <i>in vitro</i>	9
1.3.1.1. Condições de assepsia	10
1.3.1.2. Meio de cultura	10
1.3.1.3. Elementos minerais.....	11
1.3.1.4. Vitaminas	11
1.3.1.5. Fonte de carbono e energia	12
1.3.1.6. pH do meio de cultura.....	12
1.3.1.7. Hormonas vegetais ou reguladores de crescimento vegetal	12
1.3.1.8. Fatores físicos e armazenamento das culturas	15
1.3.2 Vantagens e desvantagens associadas à conservação <i>in vitro</i>	17
1.4 Conservação de recursos genéticos em Portugal	18
1.4.1 Banco Português de Germoplasma Vegetal	18
1.4.2 Conservação de fruteiras: os casos da macieira e da pereira	20
1.4.2.1. Macieira (<i>Malus domestica</i> L.)	20
1.4.2.2. Pereira (<i>Pyrus communis</i> L.)	23
1.5 Enquadramento e objetivos do trabalho	25

2. Materiais e Métodos	27
2.1 Otimização de protocolos para o estabelecimento, propagação, enraizamento e conservação <i>in vitro</i> de <i>Malus domestica</i> L.....	28
2.1.1 Material biológico.....	28
2.1.2 Estabelecimento de rebentos apicais e nodais de <i>Malus domestica</i> L. em cultura <i>in vitro</i>	29
2.1.2.1. Desinfecção dos explantes	29
2.1.2.2. Inoculação dos segmentos apicais e nodais em meio de estabelecimento	30
2.1.3 Proliferação de duas variedades de <i>Malus domestica</i> L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: efeito da concentração de BAP.....	32
2.1.4 Proliferação de duas variedades de <i>Malus domestica</i> L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: influência da qualidade de luz.....	32
2.1.5 Enraizamento de duas variedades de <i>Malus domestica</i> L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: efeito de tratamento bifásico com presença de auxinas no escuro e ausência de auxinas no meio de cultura à luz.....	34
2.2 Otimização de protocolos para a propagação e conservação <i>in vitro</i> de <i>Pyrus communis</i> L.	34
2.2.1 Material biológico.....	34
2.2.2 Proliferação de sete variedades e clones de <i>Pyrus communis</i> L.: efeito de BAP e sorbitol na aplicação do meio MS em multiplicação.....	35
2.2.2.1 Desinfecção dos explantes	35
2.2.2.2 Inoculação dos explantes apicais e internodais em meios de proliferação	35
2.2.3 Proliferação de sete variedades e clones de <i>Pyrus communis</i> L.: influência da qualidade de luz	36
2.3 Análise dos dados.....	37
3. Resultados e Discussão	39
3.1 Estabelecimento de rebentos apicais e nodais de 10 variedades de <i>Malus domestica</i> L. em cultura <i>in vitro</i>	40
3.1.1 A eficiência de desinfecção varia com o tipo de explante e com a variedade de macieira.....	40
3.1.2 A oxidação dos explantes por libertação de compostos fenólicos varia com a variedade de macieira.....	42
3.2 Proliferação de duas variedades de <i>Malus domestica</i> L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: concentrações mais altas de BAP induzem proliferação dos rebentos	44
3.3 Proliferação de duas variedades de <i>Malus domestica</i> L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: luz vermelha e branca promovem a produção de novos rebentos	47

3.4	Enraizamento de duas variedades de <i>Malus domestica</i> L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: insucesso no efeito de tratamento bifásico com presença de auxinas no escuro e ausência de auxinas no meio de cultura à luz.....	51
3.5	Proliferação de sete variedades e clones de <i>Pyrus communis</i> L.: meio MS suplementado com sorbitol e BAP promove a proliferação de rebentos	52
3.6	Proliferação de sete variedades e clones de <i>Pyrus communis</i> L.: luz vermelha e branca promovem a produção de novos rebentos.....	54
4.	Conclusões e Perspetivas Futuras	57
	Bibliografia.....	61
	Anexo I – Protocolo BPGV: Estabelecimento de <i>Malus domestica</i> L.	71
	Anexo II – Protocolo BPGV: Multiplicação de <i>Malus domestica</i> L.....	71
	Anexo III – Protocolo BPGV: Multiplicação de <i>Pyrus communis</i> L.	72
	Anexo IV – Intensidades das cinco qualidades de luz	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Coleções *in vitro* de macieiras e pereiras, armazenadas em câmaras de crescimento, conservadas pelo Banco Português de Germoplasma Vegetal..... 9
- Figura 2** - Sequência de desinfecção de explantes de *Malus domestica* L., em placa de agitação magnética, com diferentes soluções e diferentes tempos de permanência em cada solução. 10
- Figura 3** - Fórmula estrutural de diversas auxinas. Em A, auxinas naturais, cuja produção ocorre endogenamente nas plantas, e em B, um exemplo de uma auxina sintetizada em laboratório. (imagem adaptada de Vega-Celedón *et al.*, 2016)..... 13
- Figura 4** - Fórmula estrutural da citocinina sintética: 6-benzilaminopurina (Merck, 2018)..... 14
- Figura 5** - Estrutura química das giberelinas (imagem adaptada de Taiz *et al.*, 2017). 14
- Figura 6** - Estrutura química do ácido abscísico na forma ativa que ocorre naturalmente: (S) - *cis* - ABA (imagem adaptada de Taiz *et al.*, 2017)..... 15
- Figura 7** - Estrutura oficial do Banco Português de Germoplasma Vegetal, vista da entrada principal.19
- Figura 8** - Estrutura da coleção conservada pelo BPGV, com o número total de acessos conservados, por grupos de espécies (imagem adaptada de Barata *et al.*, 2017)..... 19
- Figura 9** - Dados relativos à comercialização de maçã produzida em território nacional, na União Europeia (UE) e em Portugal (PT), segundo o GPP em GlobalAgriMar, 2018..... 20
- Figura 10** - Exemplares de maçã e macieiras cultivadas numa das estruturas do INIAV, o Polo de Alcobaça. Na imagem à esquerda, é possível observar exemplares do fruto, enquanto que na imagem à direita observam-se exemplares das macieiras cultivadas na coleção de campo de fruteiras. 21
- Figura 11** - Dados relativos à comercialização de pêra produzida em território nacional, na União Europeia (UE) e em Portugal (PT), segundo o GPP em GlobalAgriMar 2018..... 23
- Figura 12** - Exemplares de pêra e pereiras cultivadas numa das estruturas do INIAV, o Polo de Alcobaça. Na imagem à esquerda, é possível observar exemplares do fruto, enquanto que na imagem à direita observam-se exemplares das macieiras cultivadas na coleção de campo de fruteiras..... 24
- Figura 13** - Segmento de um dos ramos de *Malus domestica* L., no qual é possível visualizar rodeado a vermelho o segmento apical, e rodeado a azul o primeiro segmento nodal..... 28

Figura 14 - Explantes de duas variedades de <i>Malus domestica</i> L. conservados com recurso à cultura <i>in vitro</i> no BPGV. À esquerda encontra-se a variedade Camoesa Rosa do Menezes e à direita Camoesa Sta Maria.	28
Figura 15 - Processo inicial de desinfecção aplicado na preparação dos segmentos apicais e nodais de <i>Malus domestica</i> L.. Segmentos de ramos novos da variedade Pêro de Borbela (A), remoção das folhas e excisão de ramo não necessário (B), lavagem com água e sabão para remoção de resíduos superficiais (C) e divisão do segmento apical do primeiro segmento nodal (D).	29
Figura 16 - Esquema representativo da série sequencial aplicada na desinfecção dos explantes das dez variedades de <i>Malus</i> destinadas a estabelecimento.	30
Figura 17 - Remoção de material vegetal desnecessário com o intuito de reduzir a contaminação. À esquerda temos o explante antes da remoção e à direita após remoção, visualizando-se claramente o gomo do segmento nodal.	30
Figura 18 - Explantes de <i>Malus domestica</i> L. inoculados em meios de cultura para estabelecimento, em câmaras de crescimento climatizadas no BPGV.	31
Figura 19 - Explantes de <i>Malus domestica</i> L. inoculados em meio com 1,0 mg/L de BAP, conservados no BPGV. À esquerda temos a variedade Camoesa Rosa do Menezes e à direita Camoesa Sta Maria.	32
Figura 20 - Explantes de <i>Malus domestica</i> L. inoculados e conservados no BPGV, sob influência de diferentes qualidades de luz.	33
Figura 21 - Explantes de cada variedade ou clone de <i>Pyrus communis</i> L. que se encontravam comprometidos em conservação no BPGV, no momento inicial da inoculação.	35
Figura 22 - Explantes de <i>Pyrus</i> em câmaras de crescimento climatizadas. À esquerda vemos o clone Enf3 com 1 explante inoculado no frasco e à direita o clone C2 com dois explantes inoculados no frasco.	36
Figura 23 - Explantes de todas as variedades e clones de <i>Pyrus communis</i> L. resultantes deste ensaio, colocados numa câmara de crescimento climatizada no BPGV.	37
Figura 24 - Percentagem de contaminação por fungos de ápices (A) e nós (N) para as diversas variedades de <i>Malus domestica</i> L. As fotografias mostram alguns explantes contaminados.	40
Figura 25 - Percentagem de contaminação por bactérias de ápices (A) e nós (N) para as diversas variedades de <i>Malus domestica</i> L.. As fotografias mostram alguns explantes contaminados.	41
Figura 26 - Percentagem de oxidação dos explantes de ápices (A) e nós (N), para as diversas variedades de <i>Malus domestica</i> L.. Imagem A demonstra a oxidação nas placas aquando da troca de meios, e a	

imagem B a oxidação libertada para o meio de cultura quando inoculados, bem como a oxidação do explante.	42
Figura 27 – Explantes apicais da variedade Pardo Lindo com desenvolvimento do rebento 1 mês após estabelecimento.	43
Figura 28 - Número de rebentos por explante e comprimento médio dos rebentos, para duas variedades de <i>Malus domestica</i> L., sob influência de duas concentrações diferentes de BAP no 1º mês (A e B) e apenas uma concentração de BAP no 2º mês (C e D). Nestes ensaios foram inoculados 22 explantes de Camoesa Rosa do Menezes e 6 explantes de Camoesa Sta Maria.	44
Figura 29 - Diferentes explantes de macieira da variedade Camoesa Rosa do Menezes (1 e 2) em resposta a inoculação em meios diferentes: explantes apicais no meio com 0,1 mg/L de BAP (frascos da esquerda em 1.1, 1.2, 2.1, 2.2) e explantes nodais no meio com 1,0 mg/L de BAP (frascos da direita em 1.1, 1.2, 2.1, 2.2). Em 1.3 e 2.3 ambos os explantes estão inoculados no meio com 1,0 mg/L de BAP.....	45
Figura 30 - Diferentes explantes de macieira da variedade Camoesa Sta Maria (1 e 2) em resposta a inoculação em meios diferentes: explantes apicais no meio com 0,1 mg/L de BAP (frascos da esquerda em 1.1, 1.2, 2.1, 2.2) e explantes nodais no meio com 1,0 mg/L de BAP (frascos da direita em 1.1, 1.2, 2.1, 2.2). Em 1.3 e 2.3 ambos os explantes estão inoculados no meio com 1,0 mg/L de BAP.	46
Figura 31 - Espectro de transmissão dos diferentes papéis celofane usados para fornecer tipos de luz distintas às culturas: azul, vermelho, amarelo e verde. Os espectros foram obtidos com espectrofotômetro UV-Vis (UV-2501 PC, UV-VIS Recording Spectrophotometer).	48
Figura 32 - Número médio (n= 1 -5) de rebentos produzidos por explante, pelas duas variedades de <i>Malus domestica</i> L., para cada tipo de luz testada.	48
Figura 33 - Comprimento dos rebentos produzidos pelas duas variedades de <i>Malus domestica</i> L., para cada qualidade de luz diferente aplicada aos explantes.	49
Figura 34 - Espectro de absorção da clorofila a e b (imagem adaptada de Helfrich, 2018).	49
Figura 35 - Registo fotográfico dos explantes de <i>Malus domestica</i> L. mantidos sob a influência dos tipos de luz com maior impacto na proliferação e crescimento dos mesmos, no momento da inoculação (fila superior) e 1 mês após inoculação (fila inferior).	50
Figura 36 - Comprimento médio das raízes (n= 5-15) de rebentos apicais e nodais sujeitos a tratamento bifásico (presença de auxinas no escuro e ausência de auxinas na luz), para cada variedade de <i>Malus domestica</i> L.	51

Figura 37 - Explantes de ambas as variedades de <i>Malus domestica</i> L. sujeitas ao procedimento de enraizamento. À direita podem observar-se melhor as suas raízes.	52
Figura 38 - Número médio de rebentos produzidos por explante (n= 3-8), nas sete variedades e clones de <i>Pyrus communis</i> L., 1 e 2 meses após inoculação.	53
Figura 39 – Comprimento médio dos rebentos produzidos por cada variedade e clone de <i>Pyrus communis</i> L., ao longo de 2 meses de inoculação em meio MS suplementado com sorbitol e BAP....	53
Figura 40 - Explante da variedade Torres Novas, numa fase inicial de inoculação e após 1º e 2º mês de inoculação em meio MS suplementado com sorbitol e BAP.	54
Figura 41 - Número médio (n= 1-9) de rebentos produzidos por explante, pelas sete variedades e clones de <i>Pyrus communis</i> L., para cada tipo de luz testada.	55
Figura 42 - Explantes da variedade Starkimson, em resposta às luzes vermelha e branca, para a qual existiu um maior número de rebentos produzidos, um mês após inoculação em meio MS suplementado com sorbitol e BAP.	55
Figura 43 – Comprimento médio dos rebentos produzidos pelas sete variedades e clones de <i>Pyrus communis</i> L., para cada qualidade de luz diferente aplicada aos explantes.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de sementes usadas na conservação de germoplasma, respetivas características e exemplos de espécies (Das <i>et al.</i> , 2017; Gepts <i>et al.</i> , 2006).	6
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens associadas à conservação de germoplasma, recorrendo ao método <i>in vitro</i> (Canhoto, 2010; Das <i>et al.</i> , 2017).	17
Tabela 3 - Constituintes do meio de estabelecimento de <i>Malus domestica</i> L. formulado no BPGV. ...	71
Tabela 4 – Constituintes do meio de multiplicação de <i>Malus domestica</i> L. formulado no BPGV.....	71
Tabela 5 – Constituintes do meio de multiplicação de <i>Pyrus communis</i> L. formulado no BPGV.....	72
Tabela 6 - Intensidades das cinco diferentes qualidades de luz aplicadas em procedimentos de proliferação em <i>Malus domestica</i> L. e <i>Pyrus communis</i> L., medidas com um radiómetro.	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

- 4-Cl-IAA – ácido 4-cloroindol-3-acético
- A – ápices (segmento apical)
- AA – ácido ascórbico
- ABA – ácido abscísico
- AC – ácido cítrico
- ADN (ou DNA) – ácido desoxirribonucleico
- BAP – 6-benzilaminopurina
- BCBA – Banco do Centro de Biotecnologia dos Açores
- BPGV – Banco Português de Germoplasma Vegetal
- CA – carvão ativado
- COTHN – Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional
- EU – União Europeia
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
- GA₃ – ácido giberélico
- GPP – Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral
- IAA – ácido indol-3-acético
- IBA – ácido indol-3-butírico
- IBPGR – International Board for Plant Genetic Resources
- INE – Instituto Nacional de Estatística
- INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
- ISOPlexis – Banco de Germoplasma da Universidade da Madeira
- MAFDR – Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural
- MC – Meio de cultura
- MMar – Ministério do Mar
- MS – Murashige e Skoog
- N – nó (segmento nodal)
- NAA – ácido naftalenoacético
- nm – nanómetro (medida de comprimento de onda)
- OMS – Organização Mundial de Saúde

PAR – Photosynthetically Active Radiation

PIFs – Phytochrome Interacting Factors

PT – Portugal

PPO – polifenol oxidase

POD – peroxidase

PVP – polivinilpirrolidona

RG – recursos genéticos

1. INTRODUÇÃO

1.1 Recursos genéticos vegetais e a sua importância

São vários os sectores de interesse socioeconómico que assentam em recursos genéticos, desde a agricultura e alimentação, ao vestuário, à saúde, entre outras (Dias *et al.*, 2012; Rao, 2004; Salentijn *et al.*, 2015). Recursos genéticos são, de um modo simplista, materiais genéticos com algum potencial, como o milho, por exemplo, sejam de origem vegetal ou animal, que contenham unidades funcionais de hereditariedade (World Intellectual Property Organization, 2017). No caso específico da origem ser vegetal, caracteriza-se por ser material genético com valor real ou potencial para a alimentação e a agricultura (Barata *et al.*, 2017). O germoplasma, por sua vez, caracteriza-se por ser um tecido vivo (folha, caule, semente) a partir do qual se podem formar novas plantas. O germoplasma contém informações acerca da composição genética de uma espécie, representando por isso um recurso natural de valor inestimável (Seed Biotechnology Center, 2015).

No que concerne ao sector da saúde, em particular na área farmacêutica, os recursos genéticos vegetais são fundamentais na produção de novos medicamentos. Devido à sua composição fitoquímica, as plantas possuem várias propriedades biológicas únicas podendo trazer diversos benefícios e aplicações na saúde (Cragg e Newman, 2013), e o seu uso terapêutico, sob a forma de remédios, poções e óleos tem vindo a ser descrito ao longo da história (Kingham *et al.*, 2011). Estes medicamentos tradicionais com origem vegetal, bem como o conhecimento empírico adquirido, foram a base da maioria dos medicamentos que surgiram no início da era farmacêutica, tendo sido submetidos a estudos clínicos, farmacológicos e químicos (Butler, 2004). A OMS (Organização Mundial de Saúde) estimou que, em 1985, cerca de 65% da população mundial recorria a medicamentos tradicionais de base vegetal para um primeiro tratamento dos sintomas. Como exemplo da importância das plantas neste âmbito, temos o composto quinina que possui propriedades antimaláricas, tendo sido extraído e isolado a partir da casca das espécies de *Cinchona* (*C. officinalis* por exemplo) (Cragg e Newman, 2013). O seu uso formal, no que diz respeito ao tratamento da malária, foi estabelecido em meados do século XIX, momento esse em que os britânicos iniciaram o cultivo mundial da planta (Dias *et al.*, 2012).

No que concerne à indústria têxtil, um dos principais recursos vegetais utilizados é o algodão para produção de fibras e tecidos. O algodão é uma das fibras mais versáteis e populares utilizadas na indústria têxtil, contudo, a sua produção massiva deixa uma pegada ambiental significativa no planeta, sendo a sua plantação responsável por um quarto dos pesticidas utilizados nos Estados Unidos, o maior exportador mundial de algodão (Claudio, 2011). Contudo, novas alternativas de base natural têm despertado atenção, uma que está em voga no momento é o cânhamo (*Cannabis sativa* L.). De facto, a fibra de cânhamo é uma cultura industrial possível, sustentável e de alto rendimento, podendo ajudar

a suprimir a alta procura e necessidade global por fibras (Salentijn *et al.*, 2015). Para além do têxtil, esta espécie tem aplicações noutros sectores industriais, como a produção de energia (Prade *et al.*, 2011; Prade *et al.*, 2012; Ragit *et al.*, 2012) e a produção de bioetanol de segunda geração (González-García *et al.*, 2012).

A maior parte das substâncias naturais de interesse são de natureza química, tendo aplicações na área alimentar, farmacêutica e, mais recentemente, na dos materiais de construção e fibras. A perda de recursos genéticos representa uma perda da diversidade química e, deste modo, de atuais e potenciais aplicações, pelo que se verifica um estímulo crescente para a pesquisa de produtos naturais (McChesney *et al.*, 2007).

Na área agroalimentar há enormes pressões para o aumento da produção, pois a manutenção de uma alimentação segura prende-se com o futuro próximo da humanidade. A agricultura está presente na vida humana há mais de 10 000 anos, tendo ocorrido durante este período uma enorme diversificação de culturas (Piperno e Pearsall, 1998). Ao longo do tempo, a agricultura deixou de se basear apenas na produção para consumo próprio, o que permitiu o desenvolvimento das civilizações iniciais, e deu espaço à produção organizada para comércio e para criação de negócios (Gepts *et al.*, 2006), como hoje conhecemos nas sociedades modernas.

Contudo, a globalização, o aumento populacional mundial, as alterações climáticas, a desflorestação, alterações na prática agrícola e uma série de fatores de risco, têm vindo a ameaçar ao longo do tempo todo o material genético disponível, quer para investigação, quer para a sustentação mundial ambiental e agro-económica (Rao, 2004). O impacto do Homem nos ecossistemas é muito anterior à era moderna (Jordan *et al.*, 1990), todavia, a escala desses impactos aumentou drasticamente com o exponencial aumento populacional (York *et al.*, 2003). Um dos impactos mais cruciais revela-se ao nível do número, distribuição e diversidade de espécies, conduzindo muitas vezes a extinção de fauna e flora. Tudo isto afeta uma das razões pelas quais existimos e prosperamos: a disponibilidade de recursos (Harrison e Pearce, 2000).

Toda esta problemática levanta uma série de questões e preocupações relativas à erosão dos recursos genéticos disponíveis no planeta. Esta temática começou a ser debatida e especialmente estudada em meados do século 20 e, de um modo geral, os estudos focam-se essencialmente na conservação de recursos, incluindo a caracterização genotípica com base nas variações fenotípicas (Gepts *et al.*, 2006). O *status* da diversidade genética, como indicador de sustentabilidade na prática agrícola, é um tema que apresenta grande preocupação, pois a diversidade genética das culturas proporciona uma garantia da disponibilidade dos recursos genéticos futuros e, ainda, uma fonte para

fazer face a ameaças à produção agrícola, como sejam epidemias ou alterações climáticas (Gepts *et al.*, 2006).

Outra questão relevante prende-se com a seleção e adaptabilidade das culturas. À medida que as culturas se dispersam a partir do seu local de domesticação, mesmo num local onde encontram condições favoráveis para o seu crescimento, surge a necessidade de seleção e readaptação ao novo ambiente (Darwin, 1868). Numa primeira fase a cultura responde às novas condições ambientais (bióticas e abióticas), sofrendo ainda, posteriormente, novas alterações face às decisões tomadas pelo agricultor (Gepts *et al.*, 2006).

A base mundial de segurança alimentar são os recursos genéticos assentes na agricultura, devido ao facto de compreenderem diversidade de material genético em inúmeras variedades tradicionais e cultivares modernos e, ainda, em culturas de espécies selvagens (Rao, 2004). De um modo geral, a conservação de recursos genéticos tem vindo a evoluir consideravelmente devido aos avanços na biotecnologia e compreende diversas atividades: a coleção, a conservação, a manutenção e a identificação de material com valor potencial através da caracterização e avaliação para uso subsequente (Rao, 2004).

1.2 Conservação de recursos genéticos vegetais

A conservação de recursos genéticos vegetais é crucial para a manutenção da complexidade dos ecossistemas do nosso planeta, sendo fundamental no que diz respeito ao sector agroalimentar (Canhoto, 2010; Dar *et al.*, 2015). Deste modo, foi necessário criar instituições capazes de levar a cabo este trabalho: os bancos de germoplasma. Atualmente, em Portugal, existem três: o Banco Português de Germoplasma Vegetal (BPGV) situado em São Pedro de Merelim, no concelho Braga, o Banco de Germoplasma ISOPlexis situado no Arquipélago da Madeira e o Banco do Centro de Biotecnologia dos Açores (BCBA), pertencente à Universidade dos Açores, no Arquipélago dos Açores (Barata *et al.*, 2011).

Abordagens à conservação de recursos genéticos envolvem a manutenção dos recursos nos habitats naturais ou nos ecossistemas criados pelo homem e a conservação de recursos genéticos fora de seus habitats naturais através da perpetuação de amostras das populações num ambiente criado artificialmente (Dar *et al.*, 2015). Existem, então, dois tipos de métodos complementares desenvolvidos face à conservação de recursos genéticos: *in situ* e *ex situ* (Ministério da Agricultura e do Mar, 2015).

1.2.1 Conservação *in situ*

A conservação *in situ* consiste na manutenção dos recursos genéticos no seu habitat natural, seja na natureza no seu estado selvagem, em comunidades de plantas selvagens, reservas da biosfera,

parques nacionais ou em campos de cultivo como componentes dos sistemas agrícolas tradicionais (Das *et al.*, 2017). Este tipo de conservação constitui a maneira mais adequada para a conservação dos recursos, no seu habitat natural ou em ecossistemas criados e manuseados pelo Homem (Rao, 2004). Contudo, este método de conservação acaba por ser um método com algumas fragilidades. Por ser um método ao ar livre está sujeito a todos os fatores bióticos e abióticos. Mudanças no clima ao longo do tempo, catástrofes naturais como terremotos, chuvadas intensas, granizo, frio e calor fora dos padrões normais, podem e têm grande impacto nas culturas mantidas em campo. Além da componente climática, existem ainda questões associadas a custos, manutenção dos terrenos e do germoplasma cultivado a ter em consideração e ainda pressões do foro político ou social (Das *et al.*, 2017).

Todavia, uma das vantagens inerentes a este método de conservação é o facto de os agricultores poderem manter e garantir os seus recursos genéticos, não só para manutenção da grande diversidade em campo, mas também para seleccionar características essenciais no seu ambiente particular, permitindo a combinação de diversidade de variedades locais e outros cultivares (Birnbbaum *et al.*, 2003; Gepts *et al.*, 2006; Perales *et al.*, 2003; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2005). Um elemento importante na conservação *in situ* consiste na informação que é obtida através deste conhecimento tradicional, conhecimento esse que acompanha os recursos genéticos locais e respetivos dados socioeconómicos (Gepts *et al.*, 2006).

1.2.2 Conservação *ex situ*

A conservação *ex situ* consiste na conservação e manutenção dos recursos genéticos fora do habitat nativo onde tiveram origem ou no espaço de cultivo, ocorrendo geralmente em locais especializados designados, correntemente, de bancos de germoplasma (Gepts *et al.*, 2006; Ministério da Agricultura e do Mar, 2015). A conservação *ex situ* em bancos de germoplasma pode dar-se em edifícios especializados ou em campo (associado ao edifício) (Rao, 2004). O principal objetivo deste tipo de conservação é assegurar a sobrevivência de espécies ameaçadas e a conservação da diversidade genética associada (Das *et al.*, 2017). O êxito da conservação *ex situ* depende essencialmente da capacidade de representar adequadamente as espécies durante o armazenamento e, conseqüentemente, preservar a utilidade do germoplasma armazenado em futuros esforços de recuperação (Husband e Campbell, 2004; Volis e Blecher, 2010).

A conservação *ex situ* possui inúmeras vantagens comparativamente com a *in situ*, sendo a principal a capacidade de armazenamento de um grande número de acessos (entradas) na coleção em causa. Cada coleção valoriza-se por ser o ponto de acesso do germoplasma para caracterização, avaliação e respetiva distribuição (Gepts *et al.*, 2006). Existem diferentes abordagens intrínsecas à

conservação *ex situ*, entre elas o armazenamento de sementes, tecidos e pólen (Franchi *et al.*, 2011), bancos genéticos de campo, conservação *in vitro*, armazenamento de DNA e, ainda, jardins botânicos. Além disto, diferentes técnicas como o crescimento lento e a criopreservação são aplicadas durante a conservação *ex situ*, sendo consideradas úteis para o auxílio face ao declínio da população de espécies (Das *et al.*, 2017).

1.2.2.1. Conservação de germoplasma de espécies com propagação seminal

Uma das estratégias mais convenientes e usuais relativas à conservação *ex situ* é a conservação por armazenamento de sementes. As sementes podem ser divididas em dois grupos, tendo por base as suas características de armazenamento: ortodoxas ou recalcitrantes (Das *et al.*, 2017) (Tabela 1).

Tabela 1 – Tipos de sementes usadas na conservação de germoplasma, respetivas características e exemplos de espécies (Das *et al.*, 2017; Gepts *et al.*, 2006).

Tipo de semente	Características	Exemplos
Ortodoxa	<ul style="list-style-type: none"> • Tolerantes à dessecação; • Podem ser conservadas a baixos níveis de humidade (3-7 %) e a baixas temperaturas (-20 °C) sem qualquer dano; • Sementes são sujeitas a secagem durante todo o tratamento. 	<p>Cereais: Arroz, milho, trigo.</p> <p>Leguminosas: feijão, lentilhas, soja, grão de bico.</p> <p>Vegetais: família das cebolas, batatas, repolhos e cucurbitáceas.</p>
Recalcitrante	<ul style="list-style-type: none"> • Sensíveis à dessecação, sementes perdem a viabilidade; • Não suportam baixas temperaturas nem baixos níveis de humidade para armazenamento; • Sementes não sofrem período de maturação durante o seu desenvolvimento; • Espécies são conservadas como plantas em campo nos bancos de germoplasma. 	<p>Árvores tropicais: abacateiro (<i>Persea americana</i> Mill.), cacaueteiro (<i>Theobroma cacao</i> L.), coco (<i>Cocos nucifera</i> L.), noz-moscada (<i>Myristica fragrans</i> Houtt.) e mangueira (<i>Mangifera indica</i> L.).</p>

Pode, por ventura, ser considerado um terceiro grupo - sementes intermediárias. Estas demonstram uma capacidade de tolerância à dessecação semelhante à das sementes ortodoxas, contudo, perdem a sua viabilidade quando expostas a um armazenamento a baixas temperaturas como as sementes recalcitrantes (Ellis *et al.*, 1990). Exemplos como as sementes de papaia (*Carica papaya* L.) e de limão (*Citrus limon* L.) fazem parte deste grupo (Das *et al.*, 2017). A notoriedade do armazenamento de germoplasma de espécies de propagação via seminal deve-se, essencialmente, à facilidade de armazenamento de sementes, ao elevado número de acessos, à economia de espaço, ao custo de manutenção relativamente baixo e à isenção de predação e infestação (Schoen e Brown, 2001; Volis e Blecher, 2010).

A conservação dos recursos genéticos feita a partir do armazenamento de sementes permite ainda um modo eficiente e conveniente de distribuição de germoplasma por diversos usuários, desde agricultores e criadores a investigadores. Tendo em conta que as sementes se reconhecem como material biológico menos propenso à transmissão de doenças, o seu uso para troca de germoplasma vegetal pode facilitar os procedimentos de quarentena. O armazenamento de sementes, principalmente ortodoxas, é considerado o método mais praticado de conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais (FAO, 1996). Cerca de 90% dos 6,1 milhões de acessos armazenados em bancos de germoplasma são mantidos como sementes (Engels *et al.*, 2001).

Existem, contudo, várias limitações relativamente ao armazenamento de sementes para conservação de germoplasma. Entre essas limitações temos a dormência das sementes, a não aplicabilidade a espécies propagadas vegetativamente, como é o caso, por exemplo, da batata-doce e do gengibre (Das *et al.*, 2017). Existe ainda a não aplicabilidade dos métodos a sementes recalcitrantes, motivo pelo qual em 90% dos casos a conservação se cinge a sementes ortodoxas com o armazenamento a baixas temperaturas (Gepts *et al.*, 2006). Além disto, temos também associado a este método, os altos custos de mão de obra e respetivo custo de manutenção (Das *et al.*, 2017).

1.2.2.2. Conservação de germoplasma de espécies com propagação vegetativa

A conservação em campo, conhecida como conservação em bancos de germoplasma de campo, serve essencialmente para cultivar e manter espécies de plantas que produzam sementes recalcitrantes, poucas ou até nenhuma semente, ou espécies que se reproduzam vegetativamente (Das *et al.*, 2017). A conservação em campo tem sido o método de armazenamento *ex situ* preferencial para recursos genéticos difíceis de conservar por via seminal. Cerca de 527.000 acessos são preservados em bancos de germoplasma em campo (FAO, 1996).

Embora esta estratégia permita um acesso fácil a recursos genéticos conservados para uso (Das *et al.*, 2017), existem algumas desvantagens que limitam a eficiência do método e ameaçam a segurança dos recursos (Engels *et al.*, 2001). Esta ameaça prende-se com o risco de serem destruídos por desastres naturais e condições ambientais adversas, como já referido atrás, perdas devido a doenças de plantas e/ou pragas (Das *et al.*, 2017) e, ainda, por intervenção errática do Homem ou atos de vandalismo (Volis e Blecher, 2010). A conservação em campo é um método caro, pelo que, a conservação dos recursos genéticos deste modo, se encontra sujeita a decisões económicas. Além disto, é um método mais limitado na manutenção de elevada diversidade genética (Das *et al.*, 2017). No que diz respeito à conservação *ex situ* em jardins botânicos, alguns dos pontos negativos associados dizem respeito à má gestão da questão genética e/ou demográfica, como por exemplo, a débil representação de espécies

com poucos indivíduos, a falta de informação acerca da amostragem de adesão e ainda, por vezes, a incorreta rotulagem dos espécimes (Hurka, 1994; Volis e Blecher, 2010).

Devido à possibilidade de perda do material ou a tornar-se inviável, existem duplicados de segurança das coleções vivas, duplicados esses que são estabelecidos usando estratégias de conservação alternativas. Uma das ferramentas alternativas mais importantes e fundamentais na conservação de recursos genéticos é a biotecnologia. Esta área contribui significativamente para ultrapassar limitações físicas, biológicas e técnicas, tendo a capacidade de fornecer opções complementares de conservação *in vitro* por meio de técnicas de cultura de tecidos.

1.3 Propagação e conservação *in vitro* de plantas

A cultura *in vitro* de plantas, também referida como cultura de tecidos vegetais, cultura celular ou cultura estéril, é considerada uma ferramenta importante e crucial em estudos básicos e aplicados, bem como em aplicações comerciais (Thorpe, 2007). Por ser realizada em condições controladas, uma das suas principais vantagens é o facto de as culturas não se encontrarem sujeitas a perturbações ambientais (Withers e Engelmann, 1997).

Por cultura *in vitro* entende-se o estabelecimento e manutenção em laboratório especializado, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células. Estas culturas são manuseadas e mantidas em condições assépticas de modo a evitar a contaminação por microrganismos e podem ser mantidas sob armazenamento por crescimento lento (Patidar *et al.*, 2013). Podem ser utilizadas com finalidades diversas, entre as quais estão a multiplicação de plantas em larga escala, a regeneração/obtenção de plantas geneticamente modificadas ou a conservação de germoplasma vegetal (Canhoto, 2010).

Na reprodução sexuada, todas as células de um organismo provêm de uma mesma célula - o ovo ou zigoto. É possível afirmar então que, à exceção dos gametófitos, todo o corpo de uma planta é um clone do zigoto. No entanto, quando cultivadas em condições apropriadas, as células vegetais possuem a capacidade de dar origem a novas plantas sem a intervenção de um processo de reprodução sexuada. Esta capacidade intrínseca das células vegetais traduz-se por totipotência e constitui, deste modo, a base da reprodução assexuada nas plantas (Canhoto, 2010).

A cultura *in vitro* de plantas iniciou-se de forma metódica, no início do século 20, com os trabalhos de Gottlieb Haberlandt relativos à cultura de células individuais (Thorpe, 2007). Os primeiros estudos nesta promissora área levaram à cultura de raízes (Robbins, 1922), de embriões e às primeiras culturas de *callus* e tecidos. Entre 1940 e 1960, a cultura *in vitro* sofreu avanços significativos, marcados essencialmente pelo melhoramento das técnicas usadas e desenvolvimento de novas. Um marco

relevante foi a descoberta das auxinas, à qual se sucedeu a descoberta de novos grupos de hormonas vegetais (Thorpe, 2007).

Avanços na biotecnologia, em particular das técnicas da cultura *in vitro*, permitiram então melhorar a conservação e manutenção dos recursos genéticos (Rao, 2004). As coleções *in vitro* de germoplasma (Fig. 1) permitem ainda a possibilidade de armazenar, movimentar e trocar germoplasma,



Figura 1 - Coleções *in vitro* de macieiras e pereiras, armazenadas em câmaras de crescimento, conservadas pelo Banco Português de Germoplasma Vegetal.

que inclui milhares de genótipos, em menos espaço (Patidar *et al.*, 2013). Tradicionalmente, a conservação de germoplasma era tipicamente feita pela via seminal. Contudo, a capacidade de regenerar plantas inteiras a partir de células somáticas e gametofíticas, levou ao uso cada vez mais generalizado da cultura *in vitro* para armazenamento (Thorpe, 2007). Espécies de plantas que se reproduzem apenas por meio de propagação vegetativa ou espécies que não produzam sementes férteis, são geralmente os casos comuns em que se recorre à cultura *in vitro* (Engelmann e Engels, 2002). Este tipo de conservação permite ainda a cultura de plantas livres de patógenos, recorrendo a métodos de esterilização face a contaminações exógenas e endógenas, sendo também uma alternativa viável para apoiar as coleções de campo (Das *et al.*, 2017).

Quanto ao tempo que é possível manter as culturas conservadas, existem dois tipos principais de procedimentos: de crescimento lento e criopreservação. O procedimento de **crescimento lento** consiste em manter os acessos de germoplasma, como tecidos ou plântulas estéreis, em frascos com meios de cultura com nutrientes, oferecendo opções de armazenamento de curto a médio prazo, sendo que o material da planta a clonar possa ser conservado entre 1 a 15 anos, com subcultura periódica, dependendo da espécie (Rao, 2004). A **criopreservação** (Thorpe, 2007) permite preservar as culturas no estado ultracongelado. Os recursos genéticos são armazenados a temperaturas muito baixas, em, por exemplo, dióxido de carbono sólido (-79 °C), em congeladores com temperaturas que rondam os -80 °C, em azoto na fase vapor (-150 °C) ou em azoto líquido (-196 °C) (Patidar *et al.*, 2013). Por norma, o mais utilizado é a preservação e o armazenamento em azoto líquido, com fornecimento periódico de azoto líquido às culturas (Das *et al.*, 2017), possibilitando assim um armazenamento a longo prazo (Patidar *et al.*, 2013).

1.3.1 Fatores determinantes da propagação *in vitro*

Uma planta cultivada no exterior tem acesso a fatores fundamentais para o seu desenvolvimento, como luz, CO₂, e também a água e nutrientes minerais que são captados a partir do solo pelo sistema

radicular. Quando se recorre às técnicas de cultura *in vitro*, realizadas em condições artificiais e geralmente a partir de porções de plantas, várias questões têm de ser tidas em consideração para que o crescimento de novas plantas possa ocorrer com sucesso.

1.3.1.1. Condições de assepsia

Este é um ponto crucial que se for descuidado pode comprometer a viabilidade das culturas. De facto, quando o material vegetal que se quer propagar e estabelecer *in vitro* (explante) provém de campo ou mesmo de estufas, ele transporta naturalmente bactérias e fungos nas suas superfícies. Além destes microrganismos irem contaminar a cultura, também competem com o explante pelos nutrientes do meio limitando a sua viabilidade e crescimento (Canhoto, 2010). A desinfecção superficial do material vegetal é, pois, fundamental, sendo escolhida de acordo com a espécie, o tipo de explante, de onde provém, e ainda com o tipo de estudo que se pretende realizar. É possível ainda controlar, de certo modo, possíveis contaminações *in vitro* realizando transferências periódicas do material vegetal para novos meios ou, até, suplementando o meio com antibióticos (Cardoza, 2008). Apesar de ser possível desinfetar superficialmente os explantes, quando existem microrganismos endógenos que podem surgir numa fase posterior da cultura, o processo é mais complicado de gerir (Cardoza, 2008).

Assim, é necessário desenvolver protocolos específicos de desinfecção para o material biológico em questão (Fig. 2), bem como utilizar material de vidro e meios de cultura esterilizados a altas



Figura 2 - Sequência de desinfecção de explantes de *Malus domestica* L., em placa de agitação magnética, com diferentes soluções e diferentes tempos de permanência em cada solução.

temperaturas, geralmente em autoclave (calor húmido). O material metálico de disseção pode ser esterilizado em estufa a 180 °C (calor seco) ou em aparelhos de infravermelho. É imprescindível manusear o material biológico em câmaras de fluxo laminar esterilizadas previamente por radiação UV, onde o ar circulante é filtrado suprimindo microrganismos. A bancada da câmara de fluxo deve ser superficialmente esterilizada com álcool 70%, antes e após utilização (Canhoto, 2010; Cardoza, 2008).

1.3.1.2. Meio de cultura

Todo o material vegetal conservado com recurso às técnicas de cultura *in vitro* é estabelecido e mantido em meios de cultura artificiais que fornecem todos os compostos necessários ao seu crescimento (George e Klerk, 2008). O meio de cultura fornece assim todas as substâncias necessárias, auxiliando o material biológico inoculado, com propriedades e/ou requisitos metabólicos e fisiológicos distintos da planta mãe, a complementar as suas necessidades vitais (Neumann *et al.*, 2009).

Os primeiros meios de cultura *in vitro* formulados para a cultura *in vitro* de espécies vegetais foram baseados em formulações nutritivas para plantas inteiras. Murashige e Skoog desenvolveram um novo meio (Murashige e Skoog, 1962), com o intuito de proporcionar um crescimento ótimo para *callus* de tabaco, tendo realizado inúmeros testes para otimizar a sua composição em minerais essenciais (George e Klerk, 2008). O meio MS é, atualmente, o meio de cultura mais utilizado em cultura *in vitro* de plantas (George e Klerk, 2008; Thorpe, 2007).

1.3.1.3. Elementos minerais

Os elementos minerais essenciais às plantas podem dividir-se em macronutrientes e micronutrientes tendo por base a quantidade relativa em que existem na biomassa vegetal. Existem diversos macronutrientes essenciais e fundamentais na constituição dos vegetais: azoto, fósforo, enxofre, potássio, magnésio e cálcio. A maioria deles intervêm no equilíbrio existente entre catiões e aniões, determinando por isso o equilíbrio osmótico existente nas células vegetais. São importantes também ao nível da composição de proteínas (ex: azoto e enxofre) e têm papéis centrais em reações que envolvem ATP (ex: fósforo) (Taiz *et al.*, 2017). Relativamente aos micronutrientes, estes têm um papel importante e crucial no que diz respeito a mecanismos enzimáticos, como por exemplo, ativadores ou constituintes de coenzimas. Entre eles, os principais são o boro, cobre, ferro, manganês e zinco (Canhoto, 2010). Estes cinco elementos são fundamentais para a síntese de clorofila e para o funcionamento dos cloroplastos (Sundqvist *et al.*, 1980), têm papéis importantes no que concerne ao funcionamento do aparelho genético e alguns têm envolvimento na atividade de substâncias de crescimento (George e Klerk, 2008). Têm ainda funções vitais nas transferências de eletrões (ex: ferro e cobre) e na constituição de proteínas importantes na fotossíntese, citocromos e ferro-proteínas não heme (ex: ferro) (Taiz *et al.*, 2017). Contudo, os requisitos nestes compostos, variam de acordo com as espécies e com o estado fisiológico e fitossanitário dos tecidos e dos explantes (Canhoto, 2010).

1.3.1.4. Vitaminas

A ausência de vitaminas no meio pode ser considerada um fator limitante no que diz respeito à morfogénese, pelo facto das vitaminas promoverem o crescimento dos tecidos em cultura (Canhoto, 2010) e não estarem a ser adequadamente sintetizadas pelo material em cultura. O *mio*inositol é considerado uma vitamina do complexo B e é muito usado na composição de meios de cultura pois tende a retardar eventos de senescência, devido, possivelmente, à sua interação com as auxinas e citocininas (Canhoto, 2010). As células e tecidos, quando isoladas da planta mãe e postos em cultura, não são capazes de produzir vitaminas em quantidades suficientes para o normal metabolismo de

hidratos de carbono e de azoto, por exemplo. Por este motivo, é crucial ter em atenção na formulação do meio de cultura, a inclusão de vitaminas (Neumann *et al.*, 2009).

1.3.1.5. Fonte de carbono e energia

A necessidade de adicionar uma fonte carbono e energia aos meios de cultura surge do facto de os tecidos em cultura *in vitro* serem, na sua grande maioria, heterotróficos (Canhoto, 2010). Os compostos mais usados para cumprir essa função nas culturas *in vitro* são os hidratos de carbono simples, ou açúcares, atuando como fonte de energia e carbono, mas também como agente osmótico. O açúcar mais universalmente usado em cultura de tecidos é a sacarose, seguida pela glucose, maltose e frutose (Thorpe *et al.*, 2008). Este suplemento é escolhido de acordo com o tipo de explante, a espécie e o objetivo do trabalho que se está a desenvolver (Neumann *et al.*, 2009). Podem, no entanto, usar-se outras fontes, como polióis, sendo exemplo, o sorbitol e o manitol (Santos *et al.*, 2011).

1.3.1.6. pH do meio de cultura

O pH de um meio de cultura para propagação vegetal deve ser avaliado e ajustado a valores adequados ao equilíbrio fisiológico do tecido (Thorpe *et al.*, 2008). Regra geral, o pH inicial do meio de cultura é ajustado entre 5,5 e 6,0, antes de ir ao autoclave. Contudo, desde o momento em que o meio é feito até ser inoculado com os explantes, pode sofrer variações de pH (Owen *et al.*, 1991). Um dos componentes que tem influência no pH do meio é a inclusão de agar, tornando o meio mais ácido, sendo que essa queda no pH é, por norma, proporcional à quantidade de agar presente no meio (Thorpe *et al.*, 2008).

1.3.1.7. Hormonas vegetais ou reguladores de crescimento vegetal

As hormonas vegetais (ou reguladores de crescimento vegetal) são compostos químicos sintetizados pelas plantas, presentes em baixas concentrações nos seus tecidos e com funções reguladoras. Estas hormonas pertencem a grupos químicos muito distintos tendo também funções muito diversas nas plantas, desempenhando um papel fundamental na regulação do crescimento, diferenciação de tecidos e desenvolvimento das plantas, mas também na sua resposta das plantas ao ambiente. As hormonas nas plantas têm um comportamento distinto comparativamente aos animais, devido ao facto de terem efeitos pleiotrópicos, isto é, estão envolvidas no controlo de uma vasta gama de processos de desenvolvimento (van Staden *et al.*, 2008).

Também estes compostos são fundamentais na cultura *in vitro* de plantas, não só porque não são produzidos adequadamente por alguns explantes como são fulcrais para a indução de determinados processos morfogénicos de interesse, como por exemplo, a diferenciação de órgãos adventícios. Existem

diversas classes de reguladores de crescimento vegetal, contudo, serão abordadas aqui apenas as principais: auxinas e citocininas com maior ênfase devido à sua relevância na cultura *in vitro*, giberelinas, ácido abscísico e etileno (Machakova *et al.*, 2008).

Auxinas

Foram as primeiras hormonas a serem descobertas, sendo o IAA (ácido indol-3-acético), a auxina mais comum nas plantas (Canhoto, 2010). A palavra auxina tem origem grega em “*auxein*”, que significa aumentar/expandir e crescer.

Além do IAA, outras auxinas ocorrem de forma endógena, tendo sido demonstradas as suas potencialidades: o 4-cloro-IAA (ácido 4-cloroindol-3-acético) e o IBA (ácido indol-3-butírico). Como exemplo de uma auxina sintética largamente usada em cultura *in vitro* de plantas, temos o NAA (ácido naftalenoacético) (Fig. 3) (Machakova *et al.*, 2008).

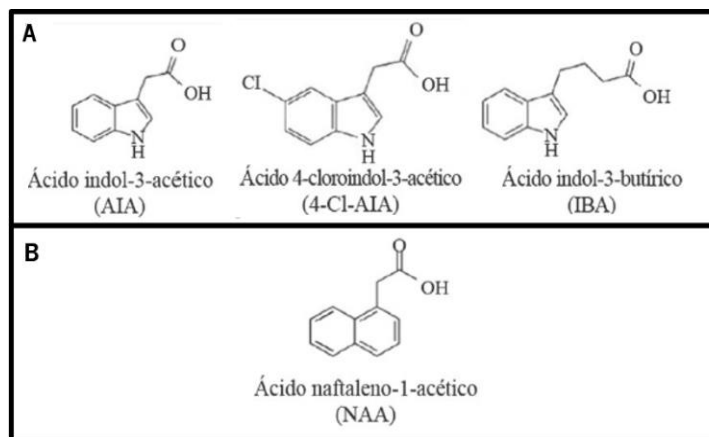


Figura 3 - Fórmula estrutural de diversas auxinas. Em A, auxinas naturais, cuja produção ocorre endogenamente nas plantas, e em B, um exemplo de uma auxina sintetizada em laboratório. (imagem adaptada de Vega-Celedón *et al.*, 2016).

As auxinas têm múltiplas funções. A nível celular estimulam processos como o alongamento das células e o aumento do volume celular e promovem com as citocininas a divisão celular (Machakova *et al.*, 2008). Ao nível da planta estão envolvidas em processos de tropismo, na regulação da dominância apical, na formação dos meristemas florais, no estabelecimento dos padrões de filotaxia. Participam ainda na formação de raízes laterais, na diferenciação de tecidos vasculares e do desenvolvimento de frutos (Canhoto, 2010).

Na cultura *in vitro*, as auxinas são frequentemente utilizadas com diferentes objetivos tais como: a formação e manutenção de *callus* ou suspensões celulares, a indução de rizogénese, a formação de embriões somáticos e a formação de meristemas caulinares adventícios nos processos de organogénese (Machakova *et al.*, 2008).

Citocininas

A primeira citocinina a ser descoberta, denominada de cinetina, foi isolada da planta de tabaco (van Staden *et al.*, 2008). Deste estudo surgiu a primeira citocinina sintética, derivada da purina adenina (Canhoto, 2010). O termo geral citocinina foi posteriormente proposto, após a descoberta de novos compostos promissores, de modo a abranger todos os compostos com atividade similar (Skoog *et al.*, 1965; van Staden *et al.*, 2008). O BAP (6-benzilaminopurina) (Fig. 4) é uma das citocininas sintéticas mais utilizadas em estudos de multiplicação de material biológico em cultura *in vitro*, devido ao facto de promover de forma eficaz a produção de rebentos axilares (Bouza *et al.*, 1994).

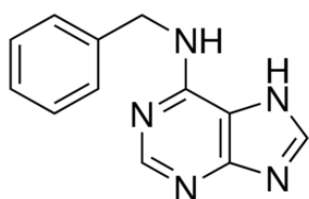


Figura 4 - Fórmula estrutural da citocinina sintética: 6-benzilaminopurina (Merck, 2018).

Posteriormente, foram identificadas citocininas naturais, tendo sido a primeira a zeatina – trans-6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-anilamino) purina – extraída do endosperma de cariopses imaturas de milho (*Zea mays*). De um modo geral, todos os compostos ativos do género das citocininas, são aminopurinas substituídas (Canhoto, 2010).

Desde a sua descoberta, sabe-se que as citocininas são capazes de promover a divisão celular e de controlar os genes envolvidos na regulação do funcionamento dos meristemas (Canhoto, 2010; van Staden *et al.*, 2008). À parte disto, no âmbito das suas funções, estão ainda implicadas na dominância apical e em processos de senescência, funcionando como retardadores (Canhoto, 2010).

Giberelinas

Nenhuma planta aparenta ter ou sintetizar todas as giberelinas existentes, sendo que, algumas foram encontradas em fungos e outras plantas superiores (Moshkov *et al.*, 2008). Este regulador de crescimento vegetal (Fig. 5) foi isolado pela primeira vez a partir do fungo *Gibberella fujikuroi* que, quando infeta plantas de arroz causa o alongamento excessivo do caule. As giberelinas estão implicadas numa vasta gama de respostas de desenvolvimento, tais como: a promoção do alongamento em caules e também a nível celular, a síntese de enzimas que facilitam a mobilização do endosperma e de enzimas envolvidas no catabolismo de compostos de reserva nas sementes. Em diversas plantas, este regulador tem também a capacidade de promover a germinação de sementes e a floração, determinação do sexo e controlo da juvenilidade da planta (Canhoto, 2010; Moshkov *et al.*, 2008). Devido

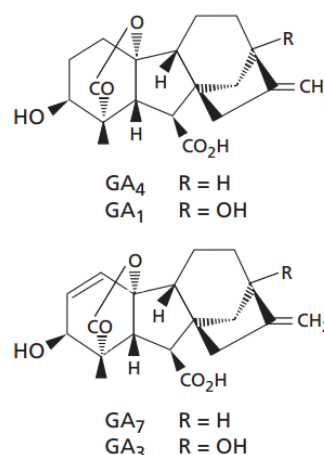


Figura 5 - Estrutura química das giberelinas (imagem adaptada de Taiz *et al.*, 2017).

ao facto de promover o desenvolvimento de frutos, este destaca-se como um composto de considerável interesse comercial. Na cultura de tecidos, a giberelina mais utilizada é o ácido giberélico (GA_3), sendo utilizada para promover o alongamento dos rebentos caulinares, quebrar a dormência de sementes e de embriões somáticos de algumas espécies lenhosas (Canhoto, 2010).

Ácido abscísico

O ácido abscísico (ABA) é um regulador de crescimento que ocorre naturalmente nas plantas e de modo quase omnipresente (Fig. 6). Foi inicialmente considerado pela comunidade científica como

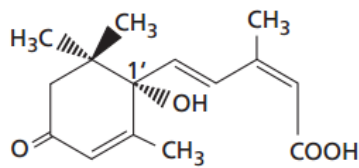


Figura 6 - Estrutura química do ácido abscísico na forma ativa que ocorre naturalmente: (S) - *cis* - ABA (imagem adaptada de Taiz *et al.*, 2017).

tendo essencialmente um efeito inibidor, devido à sua influência na promoção da dormência de gemas e sementes, e na abscisão foliar. Contudo, este apresenta diversos efeitos promotores numa série de processos fisiológicos (Canhoto, 2010). É imprescindível no controlo do estado hídrico da planta, participando na regulação estomática. É ainda capaz de inibir a germinação precoce de sementes e promover uma correta maturação dos embriões através da estimulação da

síntese de proteínas de reserva. Deste modo, é utilizado na cultura *in vitro* com o intuito de promover a maturação eficaz ao evitar a germinação precoce dos embriões somáticos (Canhoto, 2010).

Etileno

A presença de concentrações muito baixas de etileno (C_2H_4) na atmosfera é conhecida por afetar, de diversos modos, o crescimento e desenvolvimento das plantas (Moshkov *et al.*, 2008). Este gás é também produzido pelas plantas onde cumprem funções diversas, entre as quais temos o amadurecimento de frutos climatéricos, como por exemplo, tomate, banana, ameixa, entre outros (Canhoto, 2010; Moshkov *et al.*, 2008). O etileno tem ainda grande influência na senescência e na abscisão foliar (Moshkov *et al.*, 2008). Evidências demonstram o seu envolvimento em processos de desenvolvimento, na quebra de dormência de sementes de algumas espécies, na promoção da diferenciação de pelos radiculares e, ainda, em mecanismos de defesa da planta. De todos os reguladores de crescimento vegetal mencionados previamente, o mais peculiar e desafiante é o etileno pois, sendo um gás, se torna mais difícil de manipular, controlar e dosear quando aplicado a cultura de tecidos (Canhoto, 2010).

1.3.1.8. Fatores físicos e armazenamento das culturas

As culturas trabalhadas em condições de assepsia nas câmaras de fluxo devem ser posteriormente armazenadas em câmaras ou salas de crescimento que permitam o controlo da

temperatura, luz e humidade. Relativamente ao fator humidade, os recipientes utilizados, por norma, asseguram uma humidade suficiente da atmosfera envolvente dos explantes *in vitro* (Canhoto, 2010).

Temperatura

No seu habitat natural, as plantas experienciam temperaturas diferentes ao longo do dia e do ano estando, portanto, adaptadas a ótimos distintos consoante a espécie o local que habitam. Em cultura *in vitro* devemos estar conscientes que temperaturas diferentes ao longo do ciclo diário, influenciam o crescimento das plantas de diversos modos (Langton e Cockshull, 1997), podendo por isso ser aplicadas temperaturas diferenciadas para dia e noite (por exemplo 23 °C e 18 °C) (Canhoto, 2010). Uma das vantagens deste ciclo é o facto de auxiliar a troca de gases por difusão em frascos de cultura (George e Davies, 2008). Tipicamente, a temperatura para manutenção de culturas ronda os 22-25 °C, sendo mais elevada (27-28 °C) para plantas tropicais, ou mais baixas para espécies de regiões mais frias. Em casos excecionais, como a pretensão de reduzir o crescimento de forma a evitar subculturas, as culturas podem ser mantidas a temperaturas mais baixas (Canhoto, 2010).

Luz

A luz é um recurso fundamental para as plantas, estando envolvida essencialmente em três processos: fotossíntese, processo através do qual as plantas convertem a energia da luz em energia química; fotomorfogénese, processo este que determina o desenvolvimento da estrutura ou forma da planta; e o fototropismo, onde é desenvolvida uma resposta de crescimento por parte das plantas induzida por luz lateral (George e Davies, 2008; Morini e Muleo, 2003).

Tal como referido anteriormente em relação à temperatura, também o fotoperíodo (duração do período luminoso diário) pode necessitar de ser ajustado consoante o genótipo, o tipo de explante em cultura e o tipo de estudo. No que diz respeito ao crescimento vegetativo, as plantas demonstram necessidades específicas de fotoperíodo e estas tendem a manifestarem-se durante a cultura *in vitro* (George e Davies, 2008). A influência do fotoperíodo na cultura de tecidos é um assunto pouco estudado, sendo que, por norma, se utilizam fotoperíodos alargados, entre as 14 e as 16 h (Canhoto, 2010). Comumente, as culturas são mantidas em câmaras com controlo de luz artificial e temperatura. O fotoambiente é caracterizado pela energia radiante visível, em que o seu espectro abrange comprimentos de onda desde os 390 nm (violeta) até cerca de 700 nm (região vermelha) (George e Davies, 2008).

Estudos recentes, sobre multiplicação de material vegetal *in vitro* demonstraram que a utilização de diferentes comprimentos de onda de radiação visível, promovem diferentes respostas por parte dos explantes de duas variedades de macieira. Nesse estudo foram testadas cinco qualidades de luz – branca, azul, vermelho, amarelo e verde - e duas concentrações de BAP (Erig e Schuch, 2006). Estudos

antigos que serviram de base a esta investigação demonstraram que o efeito da luz tende a diferir em função da concentração do regulador hormonal no meio (Norton *et al.*, 1987). Observaram que a ação de BAP não se evidencia quando os explantes estão no escuro, mas sim quando se encontram expostos a luz branca, azul ou vermelha, demonstrando, deste modo, que os dois fatores mencionados são imprescindíveis quando se pretende promover a proliferação de plantas. Deste modo, para uma maior concentração de BAP, os explantes com maior capacidade de multiplicação, com maior número de rebentos por explante, surgiram sob a luz branca e a luz vermelha. Relativamente à luz amarela, esta influencia mais o crescimento dos rebentos do que proporciona o rebentamento de gomos (Erig e Schuch, 2006).

1.3.2 Vantagens e desvantagens associadas à conservação *in vitro*

A conservação *in vitro* de recursos genéticos, como todas as técnicas, tem as suas vantagens e desvantagens (Tabela 2).

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens associadas à conservação de germoplasma, recorrendo ao método *in vitro* (Canhoto, 2010; Das *et al.*, 2017).

Conservação <i>in vitro</i>	
Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de menos espaço para a manutenção de um grande número de plantas; • Obtenção de grande número de plantas para ensaios na agricultura num curto espaço de tempo; • Obtenção de plantas a partir de um único explante; • Plantas em ambiente asséptico, livres de pragas e patogénicos; • Plantas não necessitam de divisão e poda; • Encontram-se protegidas contra riscos naturais; • Fácil transporte, com menos restrições de quarentena no que concerne à troca de germoplasma. 	<ul style="list-style-type: none"> • Repetição na subcultura de espécies em conservação, pode originar variações clonais; • Manutenção difícil e trabalhosa; • Possível perda de germoplasma por contaminações da subcultura em série frequente.

De uma maneira sucinta, a técnica de cultura *in vitro* tem por base a padronização dos meios e condições para cada genótipo, com o intuito de se obter uma resposta ótima dos explantes (Ramya *et al.*, 2014). Ainda que a multiplicação *in vitro* tenha vindo a demonstrar notáveis aplicações na agricultura, floricultura, silvicultura e na transformação genética de plantas, esta estratégia, deve ser vista como uma técnica alternativa ou complementar desses mesmos métodos e não como um processo substituto aos métodos tradicionais de multiplicação vegetativa (Canhoto, 2010).

1.4 Conservação de recursos genéticos em Portugal

Atividades associadas à conservação de recursos genéticos iniciou-se em Portugal, relativamente a espécies florestais, no ano de 1991. A primeira espécie para a qual se estabeleceram os primeiros esforços com intuito de conservação genética foi o sobreiro (*Quercus suber* L.), uma espécie amplamente distribuída pelo nosso território e de enorme importância socioeconómica. Foram ainda emitidas recomendações face à conservação genética de espécies de árvores ameaçadas, como o caso de choupos (*Populus nigra* L. e *P. alba* L.), juniperus (*Juniperus* spp.), teixos (*Taxus baccata* L.) e ulmeiros (*Ulmus* spp.) (Varela, 2009).

No ano de 1977, iniciou-se em Portugal uma nova era relacionada com a gestão de recursos genéticos de plantas de interesse alimentar: o Banco Português de Germoplasma Vegetal. A estrutura compreende uma coleção de importância estratégica para promover e garantir a segurança alimentar a nível nacional e mundial, tendo iniciado o seu trabalho essencialmente na colheita de cereais e leguminosas (Barata *et al.*, 2017; Biodiversity International, 2015). Para além do BPGV, existem outras instituições portuguesas que trabalham no mesmo sentido, o de preservar e conservar recursos genéticos com valor acrescido da região, em território nacional, mais especificamente nas ilhas. Nos últimos tempos foram criados o Banco de Germoplasma da Universidade da Madeira (ISOPlexis), situado no Arquipélago da Madeira, e o Banco do Centro de Biotecnologia dos Açores (BCBA), pertencente à Universidade dos Açores, no Arquipélago dos Açores (Barata *et al.*, 2011).

Face a estes empreendimentos é possível afirmar que, durante as últimas décadas, em Portugal, têm sido desenvolvidos projetos e atividades associadas à conservação de recursos genéticos, a fim de sustentar as coleções genéticas de plantas *ex situ*. Isto permitiu não só um avanço a nível nacional aliado à prevenção, mas também à exploração e multiplicação de alguns dos acessos já existentes (Barata *et al.*, 2008).

1.4.1 Banco Português de Germoplasma Vegetal

O BPGV (Fig. 7) surge no ano de 1977 como uma estrutura de conservação de recursos genéticos assentes na alimentação e na agricultura, na senda de estruturas internacionais como a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e do *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR, atualmente *Biodiversity International*), no âmbito da implementação do Programa de Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais do Mediterrâneo. Atualmente integra a unidade do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), pertencente ao Ministério da

Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, tendo completado 40 anos da sua existência no ano de 2017 (Barata *et al.*, 2017).



Figura 7 - Estrutura oficial do Banco Português de Germoplasma Vegetal, vista da entrada principal.

O BPGV conserva, de momento, 44 752 acessos, englobando 255 espécies e 143 géneros de plantas cultivadas e silvestres. Estes acessos são resultado de aproximadamente 130 missões de colheita de germoplasma nacional e internacional, sendo conservados sob a forma de semente e por propagação vegetativa. A maioria dos acessos conservados correspondem a cereais havendo, também, espécies hortícolas, leguminosas, entre outras (Fig. 8) (Barata *et al.*, 2017).

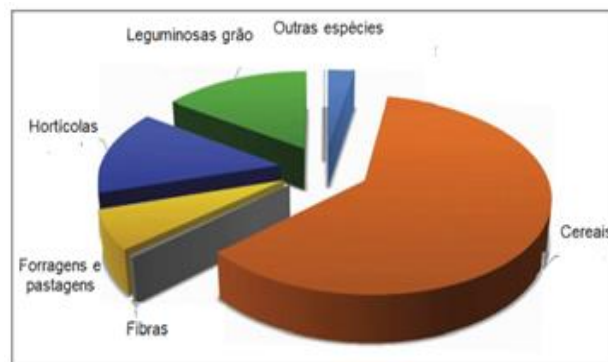


Figura 8 - Estrutura da coleção conservada pelo BPGV, com o número total de acessos conservados, por grupos de espécies (imagem adaptada de Barata *et al.*, 2017).

As variedades locais portuguesas são consideradas repositórios de conhecimento tradicional, de valores culturais e históricos, possibilitando, assim, a transmissão de uma herança cultural nossa, de como as gerações anteriores viviam, praticavam a agricultura e geriam as suas variedades (Barata *et al.*, 2011; Barata *et al.*, 2017). É, então, no sentido de preservar as raízes ancestrais, a variabilidade genética, de consolidar e preservar conhecimentos, que o BPGV trabalha para a conservação do futuro que será nosso e dos nossos. Sendo assim, a sua missão, de um modo geral, prende-se com a conservação da diversidade genética das espécies vegetais, tendo existido, por sua parte, um foco exclusivo na conservação de fruteiras nos últimos anos, devido à colaboração no projeto *PRODER-*

49448 InovPomo - Melhoramento do processo produtivo de pêras e maçãs através da conservação e caracterização do material vegetal Investimento que decorreu entre 2014 e 2017 (COTHN, 2017).

1.4.2 Conservação de fruteiras: os casos da macieira e da pereira

1.4.2.1. Macieira (*Malus domestica* L.)

Situação atual a nível nacional e internacional

O Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (GPP) visa apoiar a definição de linhas estratégicas, de prioridades e de objetivos no que concerne às políticas do Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural (MAFDR) e do Ministério do Mar (MMar) (GPP, 2018). Dados trabalhados pelo Instituto Nacional de Estatística (revistos em agosto de 2018), segundo o GPP, permitem-nos ter uma visão clara da importância da maçã no mercado nacional e internacional, ter acesso a dados de produção nacional, de exportação, quais os países que mais importam a Portugal, entre outros. A produção de maçã em Portugal tem como público alvo a União Europeia, sendo muito maior a quantidade exportada do que aquela que é comercializada internamente (Fig. 9) (GlobalAgriMar, 2018).

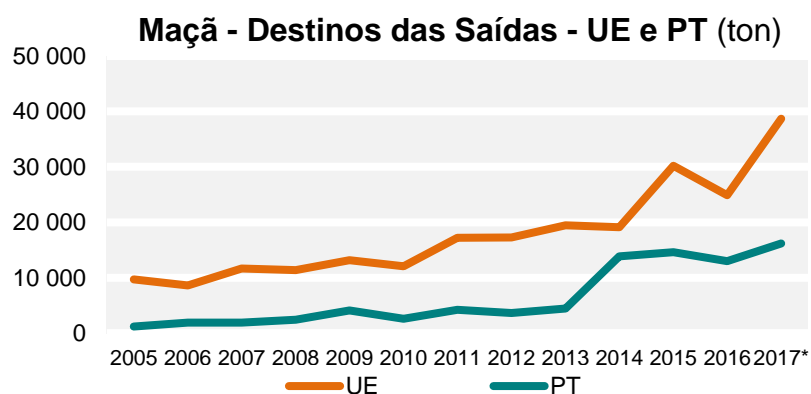


Figura 9 - Dados relativos à comercialização de maçã produzida em território nacional, na União Europeia (UE) e em Portugal (PT), segundo o GPP em GlobalAgriMar, 2018.

No ano de 2017, o principal país comprador da União Europeia identificado no mercado da maçã foi Espanha com aproximadamente 30 toneladas. Seguindo-se a ela, temos o Brasil com 9 toneladas (GlobalAgriMar, 2018).

Como podemos ver na figura 9 é notável o aumento sustentável da exportação desta fruta ao longo dos últimos anos. Em 2017, a produção total duplicou relativamente a 2014. Isto pode estar intimamente associado ao facto de o produto se adaptar com facilidade ao perfil físico-químico e organolético dos consumidores, de existirem boas estratégias de conservação e resistência ao transporte e manuseamento da maçã e, ainda, bons preços de comercialização em variedades como *Royal Gala*

(GlobalAgriMar, 2013). Esta produção total engloba maçã de mau calibre e maçã para produção de sidra, que não é, por isso, contabilizada para exportação ou comércio nacional (GlobalAgriMar, 2018).

Conservação in vitro de germoplasma de macieira

A propagação *in vitro*, ou micropropagação, de macieira desempenha um papel importante na segurança alimentar mundial ao nível da produção de plantas saudáveis e livres de doenças e da rápida multiplicação para diversos fins. O sucesso da conservação *in vitro* de macieira depende de diversos fatores, incluindo condições tanto *ex vitro* (por exemplo, genótipo e/ou estado fisiológico) como *in vitro* (por exemplo, composição do meio de cultura e/ou fotoperíodo) (Dobránszki e da Silva, 2010).

A maçã é um dos frutos mais importantes cultivados em zonas temperadas e subtropicais (Fig. 10). Faz parte da família Rosaceae, ordem Rosales, classe Magnoliopsida. A espécie mais comumente cultivada para produção de maçã é *Malus domestica* L., enquanto que as selvagens e silvestres são *Malus sieversii* e *Malus sylvestris* (Coart *et al.*, 2006). Pensa-se que tenha tido origem na Ásia central (Harris *et al.*, 2002) sendo, atualmente, maioritariamente produzida na China e nos Estados Unidos da América (Bhatti e Jha, 2010).



Figura 10 - Exemplares de maçã e macieiras cultivadas numa das estruturas do INIAV, o Polo de Alcobaça. Na imagem à esquerda, é possível observar exemplares do fruto, enquanto que na imagem à direita observam-se exemplares das macieiras cultivadas na coleção de campo de fruteiras.

O cultivo de maçã é, contudo, altamente dependente das condições climáticas, necessitando, por exemplo, de uma longa exposição a períodos de frio de modo a quebrar a dormência. É considerada ainda uma espécie suscetível a uma série de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus, entre outros, com impacto na produção e comércio. É classificada como uma das culturas hortícolas modelo na era pós-genómica (Shulaev *et al.*, 2008), sendo cultivadas a nível mundial mais de 7500 variedades que variam entre si em tamanho, cor, forma, firmeza, suculência, teor de doçura, entre muitos outros parâmetros (Bhatti e Jha, 2010). A maçã é um fruto com diversos benefícios para a saúde humana, bem como para o tratamento e prevenção de uma série de doenças, contendo vitamina C, cálcio, potássio,

magnésio, ácido tartárico, compostos fenólicos e flavonoides, entre muitos outros (Bhatti and Jha, 2010; Boyer e Liu, 2004; Veeriah *et al.*, 2006).

No que diz respeito à sua conservação *in vitro*, a história da cultura de tecidos em maçã tem início nos finais de 1960 e inícios de 1970, quando rebentos de macieira foram cultivados *in vitro* e o seu crescimento foi relatado pela primeira vez (Elliott, 1972; Jones, 1967; Walkey, 1972). Existem inúmeras vantagens no que refere a este modelo biológico, entre elas a sua excelente capacidade de multiplicar material vegetal, a produção de material vegetal livre de doenças e a possibilidade de multiplicação de genótipos que produzam sementes estéreis (Dobránszki and da Silva, 2010).

Dois parâmetros críticos determinam o sucesso do estabelecimento *in vitro* desta espécie: a desinfecção dos explantes recolhidos e a inibição de um fenómeno designado *phenolic browning* que é o escurecimento do material vegetal produzido pela oxidação de fenóis. Estes são dois problemas geralmente identificados também em outras espécies de árvore de fruto (Pérez-Tornero and Burgos, 2007; Ríoz Leal *et al.*, 2007).

As enzimas polifenol oxidase (PPO) e peroxidases (POD) presentes nos tecidos atuam desencadeando reações de defesa contra o stresse mecânico causado pelos cortes durante a excisão dos explantes (Pan e van Staden, 2000). Durante este processo, a polifenol oxidase (PPO) presente nos vacúolos é libertada e catalisa uma reação entre diferentes compostos fenólicos e o oxigénio molecular (Murata *et al.*, 1997) levando à produção de quinonas. As quinonas, de forma não específica, polimerizam proteínas e produzem pigmentos escuros, melanina (Leng *et al.*, 2009; Onay e Jetfree, 2000). Sendo a peroxidase (POD) uma oxirredutase presente nos cloroplastos que oxida substratos orgânicos, quando ocorre um corte na célula vegetal, a POD é libertada, reagindo com os substratos de PPO que, por sua vez, se encontravam nos vacúolos. Resumidamente, a ação da POD e da PPO resulta na oxidação de compostos fenólicos e produção de polímeros castanhos (Dobránszki e da Silva, 2010).

Ainda que o estabelecimento de culturas *in vitro* possa ser iniciado em qualquer altura do ano, estudos demonstram que o nível de contaminação e o escurecimento do material biológico, depende de diversos fatores, tais como, o estado fisiológico da planta mãe, o estado fitossanitário dos explantes e a estação do ano na qual se colhem os explantes (Dobránszki *et al.*, 2000; Kaushal *et al.*, 2005). Tanto o escurecimento como a contaminação dos explantes é geralmente menor quando estes são colhidos na Primavera e no Verão (Modgil *et al.*, 1999; Webster e Jones, 1991). Segundo Dobránszki e colaboradores (2000), a maioria dos explantes morre devido a elevada atividade fenólica quando colhidos no Inverno e inícios da Primavera, quando a dormência termina e/ou o crescimento apical é muito intenso.

Existem, contudo, estratégias para tentar suprimir a fenolização, tais como: inoculações periódicas dos explantes em meio de cultura fresco, o uso de explantes pequenos, uso de antioxidantes como ácido ascórbico ou ácido cítrico ou o uso de absorventes como o carvão ativado e a polivinilpirrolidona (PVP) (Bhatti e Jha, 2010; Kaushal *et al.*, 2005). Relativamente à contaminação, uma das estratégias para a diminuir passa por colher explantes de plantas *stock* (ou plantas mãe) mantidas num ambiente controlado, como é o caso de estufas (Dobrąnszki e da Silva, 2010; Preece e Read, 2003).

É importante realçar ainda que diferentes genótipos não respondem do mesmo modo a um único procedimento *in vitro*, seja ele de estabelecimento, proliferação ou enraizamento. Por exemplo, e para o caso da maçã, após inoculação dos explantes, são observadas diferenças essencialmente ao nível da taxa de escurecimento, quando se comparam diferentes genótipos (Dobrąnszki *et al.*, 2005; Dobrąnszki and da Silva, 2010).

1.4.2.2. Pereira (*Pyrus communis* L.)

Situação atual a nível nacional e internacional

De forma semelhante ao posicionamento da maçã no mercado, também a pêra produzida em Portugal é maioritariamente exportada, embora com menor diferencial relativamente ao mercado interno (Fig. 11). No ano de 2016, exportou-se essencialmente para o Brasil (30 toneladas), seguindo-se o Reino Unido com cerca de 12 toneladas (GPP, 2018).

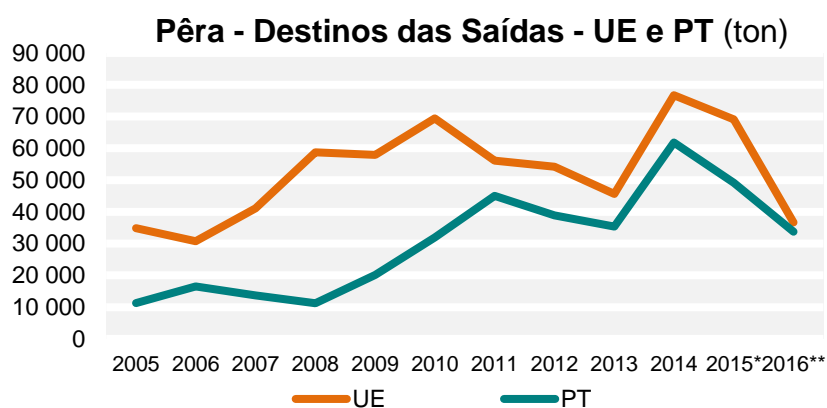


Figura 11 - Dados relativos à comercialização de pêra produzida em território nacional, na União Europeia (UE) e em Portugal (PT), segundo o GPP em GlobalAgriMar 2018.

Pode verificar-se, contudo, que o mercado da produção/comercialização de pêra é mais instável que o de maçã. Em 2016 existiu uma quebra na exportação para quase metade em comparação ao ano de 2014. Apesar de ser um produto com fácil adaptação ao perfil físico-químico e organolético dos consumidores existentes no mercado-alvo, nos últimos anos o consumo aparente de pêra não acompanhou o acréscimo da oferta proveniente da produção nacional. Uma das razões que podem

justificar esta quebra prende-se com a elevada procura por frutos exóticos ou de preço inferior, tendo sido agravado o défice de trocas com o exterior (GlobalAgriMar, 2016).

Tal como referido para a maçã, esta produção total engloba pêra de mau calibre e pêra para produção de perada, não sendo, por isso, contabilizada para exportação ou comércio nacional (GPP, 2018).

Conservação in vitro de germoplasma de pereira

Assim como a maçã, a pêra representa um fruto de enorme importância mundial, contribuindo a sua conservação para a segurança alimentar mundial. Pertence à família Rosaceae e à subfamília Pomoideae. É cultivada em seis continentes, sendo o maior produtor a China, seguido dos Estados Unidos da América e Itália. Esta pomóidea está entre as mais antigas colheitas de frutas do mundo, contando com mais de 3000 anos de história de cultivo. Teve origem nas regiões montanhosas do sudoeste da China, tendo-se espalhado posteriormente pelo Oriente e o Ocidente (Wu *et al.*, 2013).

É considerada ainda um fruto de grande importância como germoplasma hortícola. Por norma, os germoplasmas de árvores de fruto, são preservados em bancos de germoplasma de campo (Thakur *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2015).

Em Portugal, as principais coleções de campo dos géneros *Malus* e de *Pyrus* encontram-se na Estação Agrária de Viseu com 120 acessos e no Centro de Formação do Vidago com 180 acessos (Barata *et al.*, 2008). Existem ainda no polo de Alcobaça, pertencente ao INIAV, coleções de campo de fruteiras, entre elas *Malus* e *Pyrus*, resultado do Projeto *PRODER n.º 18614 – Prospeção, conservação, caracterização e multiplicação de variedades regionais de pomoideas, prunoideas e castanheiro* (Fig. 12) (INIAV, 2016).



Figura 12 - Exemplares de pêra e pereiras cultivadas numa das estruturas do INIAV, o Polo de Alcobaça. Na imagem à esquerda, é possível observar exemplares do fruto, enquanto que na imagem à direita observam-se exemplares das macieiras cultivadas na coleção de campo de fruteiras.

Contudo, a manutenção destas coleções é um procedimento dispendioso onde o material biológico se encontra exposto a diversas ameaças, sendo importante a utilização de diferentes estratégias para a sua conservação (Thakur *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2015).

A cultura *in vitro* de pêra foi conseguida, pela primeira vez, em 1979, com o porta-enxerto OHxF51 e a variedade *Bartlett* (Reed *et al.*, 2013). De um modo geral, o meio mais utilizado para diversos fins inerentes à cultura de tecidos em espécies de *Pyrus*, é o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) (Yi *et al.*, 2015). Para a cultura de tecidos nesta pomóidea são utilizados, geralmente, como explantes, os segmentos apicais dos rebentos (*shoot tips*) ou meristemas (Reed *et al.*, 2013). Este tipo de explantes traz diversas vantagens, entre elas a potencialidade de exclusão de patógenos presentes na planta mãe e a estabilidade genética inerente à técnica devido ao facto de a produção de plantas a partir de órgãos adventícios poder ser evitada (Yi *et al.*, 2015). A criopreservação destes explantes estabelecidos *in vitro*, tem tido grande sucesso junto de várias espécies do género *Pyrus* (Chang e Reed, 2001; Yi *et al.*, 2015).

Apesar de o fenómeno de acastanhamento fenólico (*phenolic browning*) ocorrer em menor extensão em pereiras, em comparação com a macieira, é importante ter em atenção que os explantes de *Pyrus* spp. são muito sensíveis à fenolização durante a cultura *in vitro*, sendo imperativa a troca periódica de meio e intervalos de subcultura curtos durante o processo de estabelecimento de culturas (Yi *et al.*, 2015).

As estratégias avaliadas para solucionar este tipo de problemas passam por aquelas explicadas anteriormente no tópico “*Conservação in vitro de germoplasma de macieira*”. É importante também realçar que, tal como na macieira, diferentes genótipos não respondem igualmente a uma formulação do meio, ou aos fatores físicos envolvidos na cultura de tecidos (Bell e Reed, 2002).

1.5 Enquadramento e objetivos do trabalho

No âmbito da conservação de recursos genéticos no BPGV, em particular para a manutenção de uma coleção de diversas variedades de *Malus domestica* L., é necessário ter um protocolo eficiente de multiplicação de plantas. O mesmo se aplica para algumas variedades de *Pyrus communis* L., que se encontram em número comprometido para conservação no BPGV. Como foi atrás discutido, vários são os aspetos a considerar no sentido de maximizar a taxa de multiplicação de plantas, nomeadamente, o nível de contaminação dos explantes, a dificuldade de enraizamento e o efeito de acastanhamento fenólico. De facto, sendo este um fenómeno natural de defesa, em cultura *in vitro* de espécies/variedades de *Malus* e *Pyrus*, o acastanhamento fenólico dos explantes é indesejável por reduzir a sua viabilidade, ou mesmo inviabilizar o seu estabelecimento.

Neste contexto, foi objetivo desta dissertação otimizar e aplicar protocolos destinados à conservação *in vitro* em algumas variedades de maçã e pêra. Para isso foram desenvolvidos alguns estudos e testados alguns fatores determinantes do sucesso das culturas, que em baixo se elencam.

- Testar o efeito de compostos antioxidantes e adsorventes como ácido ascórbico (AA), polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado (CA) na produção e ação dos compostos fenólicos produzidos pelos explantes para otimizar protocolos de desinfecção e estabelecimento de macieira (*Malus domestica* L.) para as variedades Bravo, Pêro Camões, Pêro Coimbra, Espelho, Pêro Sousa, Porta da Loja, Pardo Lindo, Pêro Burro, Pêro Limão e Pêro de Borbela;
- Estudar o efeito de concentrações do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) na proliferação nas variedades Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria;
- Estudar a influência de diferentes qualidades de luz na proliferação e crescimento de rebentos das variedades Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria;
- Testar a aplicação de tratamento bifásico com presença de auxinas no escuro e ausência de auxinas no meio de cultura à luz, num procedimento de enraizamento nas variedades Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria;
- Elaboração de um protocolo que promova a proliferação de rebentos de *Pyrus communis* L. nas variedades Amorim, Starkimson, Torres Novas e nos clones da variedade pêra-rocha Enf3, C2, M2 e I1, com aplicação do meio MS, suplementado com sorbitol como fonte de carbono e BAP;
- Estudar a influência de diferentes qualidades de luz na proliferação de rebentos das variedades Amorim, Starkimson, Torres Novas e dos clones da variedade pêra-rocha Enf3, C2, M2 e I1.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Otimização de protocolos para o estabelecimento, propagação, enraizamento e conservação *in vitro* de *Malus domestica* L.

2.1.1 Material biológico

A 25 de Junho de 2018 no Polo de Alcobaça pertencente ao INIAV, foram recolhidos 10 segmentos de ramos novos das variedades diferentes de *Malus domestica* L.. De cada um dos segmentos recolhidos, retiraram-se o segmento apical e o primeiro segmento nodal (Fig. 13). As dez variedades estudadas neste ensaio foram: Bravo, Pêro Camões, Pêro Coimbra, Espelho, Pêro Sousa, Porta da Loja, Pardo Lindo, Pêro Burro, Pêro Limão e Pêro de Borbela. Estas dez variedades foram utilizadas nos protocolos de desinfeção e estabelecimento.



Figura 13 - Segmento de um dos ramos de *Malus domestica* L., no qual é possível visualizar rodeado a vermelho o segmento apical, e rodeado a azul o primeiro segmento nodal.

No que diz respeito aos protocolos de proliferação e enraizamento, as variedades utilizadas foram: Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria (Fig. 14).

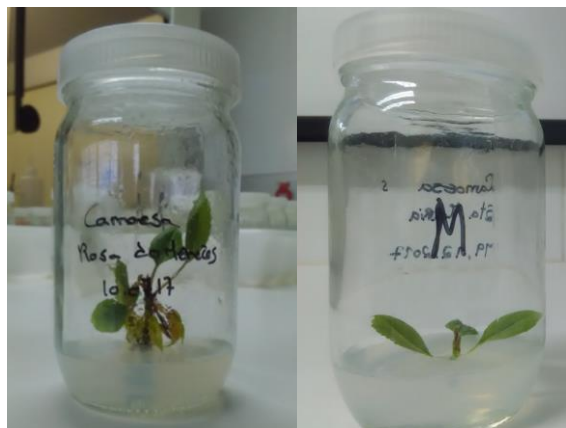


Figura 14 - Explantes de duas variedades de *Malus domestica* L. conservados com recurso à cultura *in vitro* no BPGV. À esquerda encontra-se a variedade Camoesa Rosa do Menezes e à direita Camoesa Sta Maria.

Estas duas variedades foram as únicas conservadas no âmbito do projeto *PRODER- 49448 InovPomo - Melhoramento do processo produtivo de pêras e maçãs através da conservação e caracterização do material vegetal Investimento* (COTHN, 2017), contudo, encontravam-se conservadas no BPGV em baixo número o que poderia comprometer a sua preservação a prazo. Por esse motivo o trabalho foi ajustado e aplicaram-se os protocolos de proliferação e enraizamento a estas duas variedades, enquanto se aguardava o resto do material biológico.

2.1.2 Estabelecimento de rebentos apicais e nodais de *Malus domestica* L. em cultura *in vitro*

2.1.2.1. Desinfecção dos explantes

Os segmentos apicais e nodais foram lavados com água e sabão para retirar resíduos superficiais (Fig. 15) e de seguida foram mergulhados numa série de soluções de desinfecção, sob agitação magnética (Fig. 16).



Figura 15 - Processo inicial de desinfecção aplicado na preparação dos segmentos apicais e nodais de *Malus domestica* L.. Segmentos de ramos novos da variedade Pêro de Borbela (A), remoção das folhas e excisão de ramo não necessário (B), lavagem com água e sabão para remoção de resíduos superficiais (C) e divisão do segmento apical do primeiro segmento nodal (D).

A desinfecção dos explantes consistiu na passagem por 4 soluções diferentes, com tempos específicos e de modo sequencial numa placa de agitação magnética. A figura 16 mostra um esquema representativo processo sequencial de desinfecção (Amiri e Elahinia, 2011; Bhatti e Jha, 2010; Ciccotti *et al.*, 2008; Hassan e Zayed, 2018; Modgil *et al.*, 1999). Este procedimento foi otimizado tendo por base o processo *standard* utilizado pelo BPGV, que consistia no mesmo descrito na figura 16, à exceção da adição de PVP.

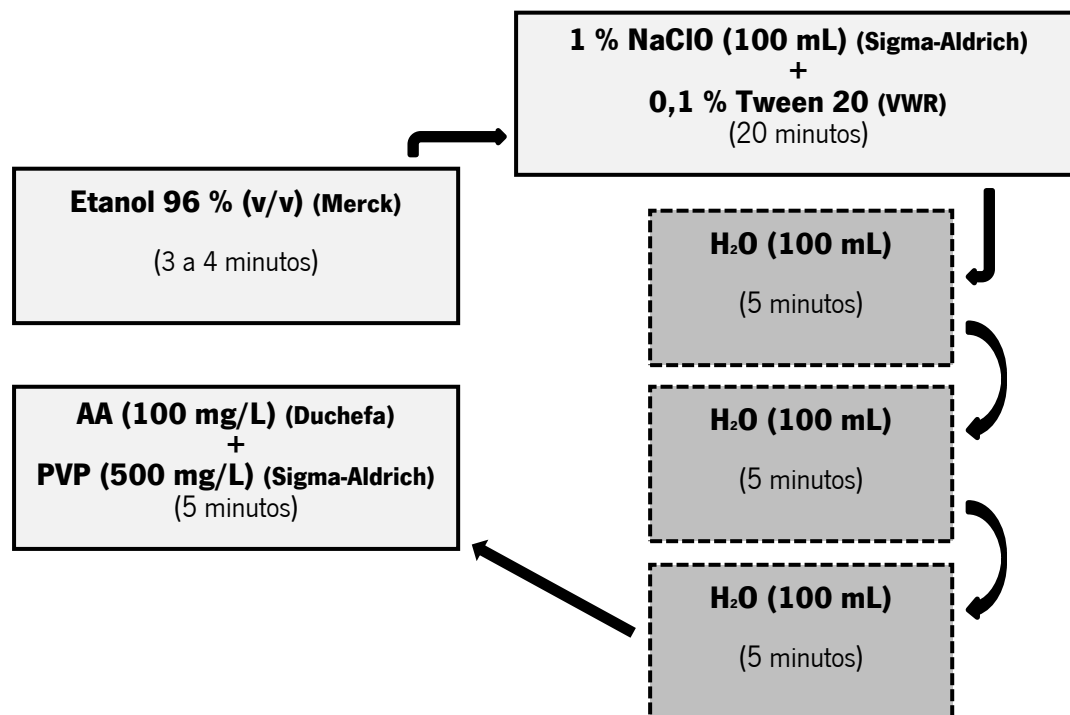


Figura 16 - Esquema representativo da série sequencial aplicada na desinfecção dos explantes das dez variedades de *Malus* destinadas a estabelecimento.

Após desinfecção, já na câmara de fluxo laminar em ambiente estéril, removeu-se o material vegetal que se considerou desnecessário, de modo a reduzir o risco de contaminação, inoculando apenas o necessário: o gomo (Fig. 17).

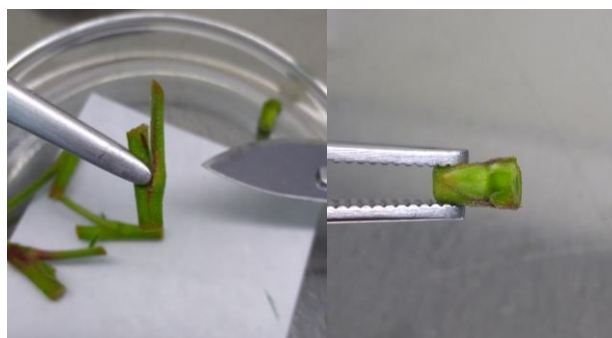


Figura 17 - Remoção de material vegetal desnecessário com o intuito de reduzir a contaminação. À esquerda temos o explante antes da remoção e à direita após remoção, visualizando-se claramente o gomo do segmento nodal.

2.1.2.2. Inoculação dos segmentos apicais e nodais em meio de estabelecimento

O meio de cultura utilizado foi o meio de Murashige e Skoog (1962) tendo sido preparado a partir de meio MS comercial já com a suplementação completa de compostos inorgânicos e vitaminas. Ao meio MS líquido adicionou-se sacarose (30,12 g/L) e as hormonas BAP (1,0 mg/L), IAA (0,04379 mg/L) e GA₃ (0,09698 mg/L) e acertou-se o pH para 5,6-5,7 antes da adição de agar (0,7 % v/v). Seguidamente

adicionou-se ácido ascórbico (AA; 10,04 mg/L), polivinilpirrolidona (PVP; 500 mg/L) (Sigma-Aldrich) e carvão ativado (CA; 1 g/L) (Amiri e Elahinia, 2011; Bhatti e Jha, 2010; Modgil *et al.*, 1999). A dissolução de CA necessita de uma agitação vigorosa. O meio de cultura foi depois distribuído por tubos de ensaio (10 mL) e esterilizados em autoclave (20 minutos, 120 °C e 1 atm). A não ser que se indique outra marca comercial, todos os produtos usados neste trabalho foram da marca Duchefa.

Foram inoculados 24 explantes (12 segmentos apicais e 12 nodais) de cada variedade, tendo sido inoculado 1 explante/tubo. Após inoculação, as culturas foram colocadas em câmaras de crescimento climatizadas com temperatura 23/18 °C ± 1°C (dia/noite) e um fotoperíodo de 16 h sob luzes fluorescentes brancas (34 µmol m⁻² s⁻¹) (Fig. 18).

No Anexo I encontra-se a formulação do meio *standard* utilizado no BPGV para o qual se desenvolveu esta otimização.



Figura 18 - Explantes de *Malus domestica* L. inoculados em meios de cultura para estabelecimento, em câmaras de crescimento climatizadas no BPGV.

Durante o primeiro mês de cultura os explantes foram transferidos, semanalmente, para meio fresco (Bhatti e Jha, 2010; Ciccotti *et al.*, 2008; Hassan e Zayed, 2018). Aquando destas transferências foram avaliados os seguintes parâmetros: estado de oxidação do explante, o nível de exsudado acastanhado libertado pelo explante para o meio (avaliação visual, por comparação entre explantes mais e menos oxidados) e contaminação por fungos ou bactérias.

2.1.3 Proliferação de duas variedades de *Malus domestica* L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: efeito da concentração de BAP

A partir de culturas mantidas em meio *standard* estabelecido no BPGV (Anexo II), foram obtidos explantes e lavados em solução de lixívia 1% antes de serem inoculados em novos meios de multiplicação. O meio de multiplicação tem por base a formulação do meio MS mas com azoto total reduzido a $\frac{3}{4}$. Para isso prepararam-se 2 soluções para complementar o meio disponível (MS com azoto reduzido a $\frac{1}{2}$): uma solução *stock* de KNO_3 (475 mg/L) e outra de NH_4NO_3 (412,5 mg/L, Merck), ambas a $\frac{1}{4}$. Ao meio líquido foi depois adicionado sacarose (40 g/L), mio-inositol (100 mg/L) e **BAP** em duas concentrações: **1,0 e 0,1 mg/L**, pois pretendia-se testar efeito desta citocinina na proliferação de rebentos. O pH foi acertado para 5,8 antes da adição de agar (0,6 % v/v) ((Erig e Schuch, 2006). O meio de cultura foi depois distribuído por frascos de cultura (50 mL) e esterilizados em autoclave (20 minutos, 120 °C e 1 atm).

Foram inoculados 22 explantes da variedade Camoesa Rosa do Menezes, 11 em cada meio - BAP 1 mg/L e 0,1 mg/L. Relativamente à variedade Camoesa Sta Maria foram inoculados 6 explantes, 3 em cada concentração. Após inoculação (1 explante/frasco) (Fig. 19), as culturas foram colocadas em câmaras de crescimento climatizadas nas condições atrás referidas.



Figura 19 - Explantes de *Malus domestica* L. inoculados em meio com 1,0 mg/L de BAP, conservados no BPGV. À esquerda temos a variedade Camoesa Rosa do Menezes e à direita Camoesa Sta Maria.

Após 1 mês de cultura foram quantificados o número de rebentos por explante e respetivos comprimentos (cm). Posteriormente, os explantes foram transferidos para meio fresco tendo-se selecionado o meio com o qual se obteve um maior sucesso relativamente à proliferação dos explantes, o meio MS suplementado com BAP a 1,0 mg/L.

2.1.4 Proliferação de duas variedades de *Malus domestica* L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: influência da qualidade de luz

Após desinfecção dos explantes obtidos no ensaio de multiplicação, como descrito em 2.1.3, inocularam-se em meio MS suplementado com BAP 1,0 mg/L. Com este ensaio pretendeu-se avaliar o efeito de diferentes espectros de luz na multiplicação de duas variedades de *Malus domestica* L.,

nomeadamente na quebra de dormência apical dos rebentos e seu desenvolvimento. Deste modo foram testados cinco tipos de luz: branca, amarela, vermelha, azul e verde, tendo para isso envolvido os frascos de cultura em papel celofane, à exceção dos frascos destinados à luz branca (Fig. 20) (Erig e Schuch, 2006).

No âmbito deste ensaio procedeu-se à caracterização dos espectros de transmissão de cada um dos papéis celofane por espectralfotometria (UV-2501 PC, UV-VIS Recording Spectrophotometer), no Departamento de Física da Universidade do Minho com o apoio da Professora Doutora Teresa Viseu.



Figura 20 - Explantes de *Malus domestica* L. inoculados e conservados no BPGV, sob influência de diferentes qualidades de luz.

No total foram inoculados 21 explantes da variedade Camoesa Rosa do Menezes (1 explante/frasco), 4 para cada qualidade de luz à exceção da luz branca para a qual se inocularam 5 explantes. No que diz respeito à variedade Camoesa Sta Maria, foram inoculados 6 explantes (1 explante/frasco), 1 para cada qualidade de luz à exceção da luz branca para a qual foram inoculados 2 explantes. As culturas foram colocadas nas câmaras de crescimento climatizadas nas condições acima descritas.

Após 1 mês de cultura, os explantes foram transferidos para as condições de luz com a qual se obteve um maior sucesso relativamente à proliferação dos explantes. Aquando desta transferência foram quantificados o número de rebentos por explante e respetivos comprimentos (cm), através da análise de registos fotográficos para evitar contaminações.

2.1.5 Enraizamento de duas variedades de *Malus domestica* L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: efeito de tratamento bifásico com presença de auxinas no escuro e ausência de auxinas no meio de cultura à luz

Com este ensaio pretendeu-se avaliar a capacidade de desenvolvimento de raiz de alguns dos explantes obtidos no ensaio anterior. Assim, após desinfecção dos explantes, como descrito em 2.1.3, inocularam-se em novos meios estéreis (50 mL) e submeteram-se a um tratamento bifásico:

- Inoculação dos explantes no escuro, em meio agarizado (0,6 % v/v) com 5,081 mg/L de IBA (Merck) e 30,12 mg/L de sacarose a um pH 6,6, durante 4 dias;
- Posterior transferência para tratamento em meio MS agarizado (0,5 % v/v), livre de auxinas, contendo 10,029 mg/L de sacarose, a um pH de 5,8, e mantido na presença de luz (nas condições descritas em 2.1.3), durante 25 dias (Ciccotti *et al.*, 2008).

Para a variedade Camoesa Rosa do Menezes foram inoculados 15 explantes, enquanto que para a variedade Camoesa Sta Maria apenas foram inoculados 5 explantes. Após 29 dias de cultura (nos dois tratamentos), foram avaliados dois parâmetros: a presença/ausência de raiz e o comprimento das mesmas (cm), novamente através de análise de registo fotográfico. Posteriormente a esta análise, os explantes foram novamente sujeitos ao mesmo procedimento (tratamento bifásico) por mais 29 dias.

2.2 Otimização de protocolos para a propagação e conservação *in vitro* de *Pyrus communis* L.

2.2.1 Material biológico

Os explantes de *Pyrus communis* L. utilizados nos tratamentos de proliferação que serão descritos adiante, consistiram em explantes de variedades e clones da variedade pêra-rocha que se encontravam em número comprometido no BPGV. No total aplicaram-se os procedimentos a três variedades de *Pyrus communis* L.: Amorim, Starkimson, Torres Novas, e a quatro clones da variedade pêra-rocha Enf3, C2, M2 e I1 (Fig. 21).

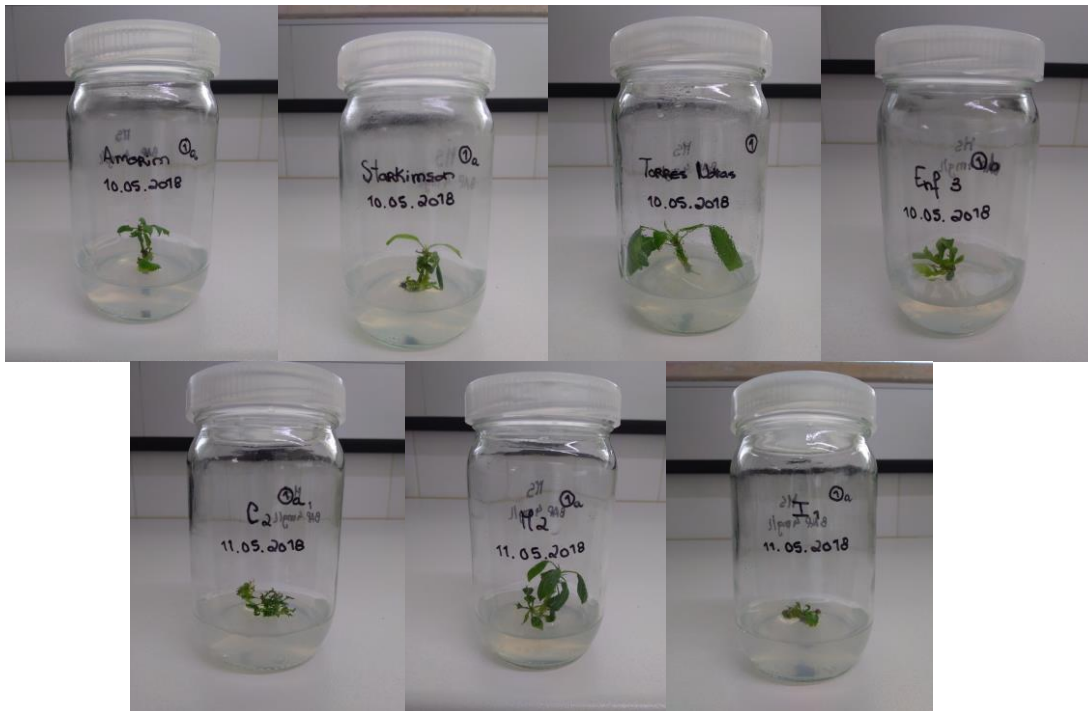


Figura 21 - Explantes de cada variedade ou clone de *Pyrus communis* L. que se encontravam comprometidos em conservação no BPGV, no momento inicial da inoculação.

2.2.2 Proliferação de sete variedades e clones de *Pyrus communis* L.: efeito de BAP e sorbitol na aplicação do meio MS em multiplicação

2.2.2.1 Desinfecção dos explantes

Os explantes apicais e nodais foram lavados em solução de lixívia 1% antes de serem inoculados em novos meios de multiplicação.

2.2.2.2 Inoculação dos explantes apicais e internodais em meios de proliferação

A partir de culturas mantidas em meio *standard* estabelecido no BPGV (Anexo III), foram obtidos explantes e lavados em solução de lixívia 1% antes de serem inoculados em novos meios de multiplicação. Ao meio MS líquido adicionou-se sorbitol (30 g/L; Sigma-Aldrich) como fonte de carbono e BAP (4 mg/L) e acertou-se o pH para 5,6 -5,7 antes da adição de agar (0,6 % (v/v) (Kadota e Niimi, 2003; Sedlak e Paprstein, 2017). O meio de cultura foi posteriormente distribuído por frascos de cultura (50 mL) e esterilizados como atrás referido.

Para as variedades e clones de *Pyrus communis* L., inocularam-se no total 32 explantes (1 ou 2 explantes por frasco). Para as variedades Torres Novas, Starkimson, Amorim e o clone I1 foram inoculados 4 explantes, para o clone C2 foram inoculados 8 explantes, para M2 foram 3 explantes e para o clone Enf3 inocularam-se 5 explantes. As culturas foram colocadas nas câmaras de crescimento climatizadas nas condições atrás descritas (Fig. 22).



Figura 22 - Explantes de *Pyrus* em câmaras de crescimento climatizadas. À esquerda vemos o clone Enf3 com 1 explante inoculado no frasco e à direita o clone C2 com dois explantes inoculados no frasco.

Após 1 mês de cultura foram quantificados o número de rebentos por explante e respetivos comprimentos (cm), com registo fotográfico. Posteriormente, os explantes foram transferidos para meio fresco tendo-se selecionado o meio com o qual se obteve um maior sucesso relativamente à proliferação dos explantes (em comparação com o meio *standard*).

2.2.3 Proliferação de sete variedades e clones de *Pyrus communis* L.: influência da qualidade de luz

Após desinfeção dos explantes obtidos no ensaio de proliferação mencionado anteriormente, como descrito em 2.1.3., inocularam-se em meio MS suplementado com sorbitol e com BAP 4 mg/L. Com este ensaio pretendeu-se avaliar o efeito de diferentes espectros de luz na multiplicação de *Pyrus communis* L., nas mesmas condições mencionadas em 2.1.4 (Erig e Schuch, 2006).

Após proliferação do material vegetativo foram inoculados no total 68 explantes (1 explante/frasco). Para a variedade Torres Novas inoculou-se 1 explante por cada qualidade de luz à exceção da luz branca para a qual se inocularam 5 explantes. Para Starkimson, 1 por cada qualidade de luz à exceção da luz branca onde tivemos 9 explante. Para a variedade Amorim, 1 por cada qualidade de luz, com exceção da luz branca com 3 explantes inoculados. Em C2, inocularam-se 3 explantes para cada qualidade de luz, mais uma vez com exceção da luz branca na qual se inocularam 9 explantes. Relativamente ao clone M2, inoculou-se 1 explante por cada qualidade de luz e 4 para a luz branca. Em I1 temos a inoculação de 1 explante por qualidade de luz e 2 para a luz branca e, por fim, no clone Enf3 os explantes apenas foram inoculados sob luz branca (n=4). As culturas foram colocadas nas câmaras de crescimento climatizadas nas condições descritas em 2.1.3 (Fig. 23).



Figura 23 - Explantes de todas as variedades e clones de *Pyrus communis* L. resultantes deste ensaio, colocados numa câmara de crescimento climatizada no BPGV.

Após 1 mês de cultura, os explantes foram transferidos para as condições de luz com a qual se obteve um maior sucesso relativamente à proliferação dos explantes. Aquando desta transferência foram quantificados o número de rebentos por explante e respetivos comprimentos (cm), através da análise de registos fotográficos para evitar contaminações.

2.3 Análise dos dados

Os resultados obtidos em todos os procedimentos foram analisados no programa GraphPad Prism 7 (GraphPd software Inc., California, E.U.A.), com respetivos cálculos de médias e desvios-padrão, tendo-se elaborado gráficos de colunas para cada procedimento. À exceção dos ensaios relativos ao estabelecimento e quantificação do enraizamento de *Malus domestica* L., onde se trabalhou com percentagens de amostras únicas portanto sem médias ou desvios-padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento de rebentos apicais e nodais de 10 variedades de *Malus domestica* L. em cultura *in vitro*

3.1.1 A eficiência de desinfecção varia com o tipo de explante e com a variedade de macieira

O processo de desinfecção aplicado e descrito em Material e Métodos (ponto 2.1.2.1), foi o mesmo para os 2 tipos explantes e variedades testadas, tendo sido utilizados 12 segmentos apicais e 12 segmentos nodais por variedade. Nas figuras 24 e 25 podemos observar a percentagem de explantes que contaminaram por fungos e por bactérias, respetivamente, para cada variedade, bem como imagens representativas da contaminação em cada caso.

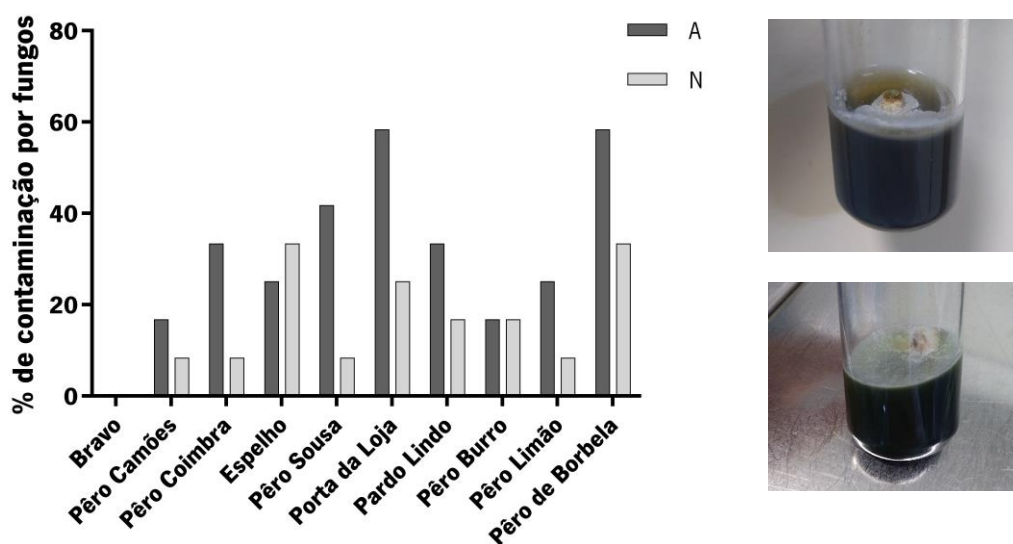


Figura 24 - Percentagem de contaminação por fungos de ápices (A) e nós (N) para as diversas variedades de *Malus domestica* L. As fotografias mostram alguns explantes contaminados.

Quando se comparam os dois tipos de contaminação microbiana (Fig. 24 e 25), os resultados mostram que uma maior percentagem de explantes apresentou contaminação fúngica, tendo-se observado contaminação em todas as variedades, à exceção da Bravo. No caso da contaminação fúngica (Fig. 24) verificou-se, de um modo geral, uma maior % de contaminação nos explantes apicais (A) comparativamente aos segmentos nodais (N). Globalmente, dos 240 explantes inoculados, foram contaminados por fungos 56 (23,3 %), sendo 37 segmentos apicais (15,4 %) e 19 segmentos nodais (7,8 %). Contudo, as diferentes variedades apresentaram % contaminação fúngica muito distintas: de 58,3% nos ápices das variedades Porta da Loja e Pêro de Borbela, até a uma mínima de 8,3% nos segmentos nodais das variedades Pêro Camões e Pêro Coimbra.

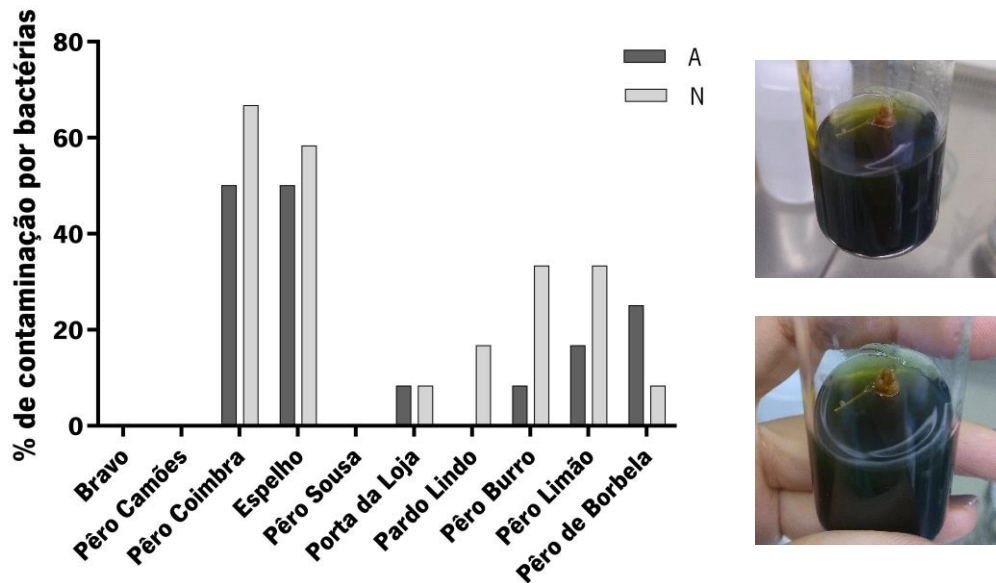


Figura 25 - Percentagem de contaminação por bactérias de ápices (A) e nós (N) para as diversas variedades de *Malus domestica* L.. As fotografias mostram alguns explantes contaminados.

Relativamente à contaminação por bactérias (Fig. 25), 3 variedades não apresentaram contaminação em qualquer dos explantes testados e Pardo Lindo apenas em segmentos nodais, contudo, várias variedades tiveram um grande número de explantes contaminados. As mais afetadas foram Pêro Coimbra e Espelho, com um total de 14 e 13 explantes infetados, respetivamente, dos 24 inoculados. De um modo global, dos 240 explantes inoculados, foram contaminados por bactérias 46 (19,2 %), sendo 19 segmentos apicais (7,9 %) e 27 segmentos nodais (11,2 %). Ao contrário do que se verificou com contaminação fúngica, a contaminação bacteriana foi genericamente maior com segmentos nodais que com segmentos apicais. A exceção foi Pêro de Borbela.

Um outro resultado interessante é que parece não haver correlação entre tipos de infeção microbiana, havendo variedades com elevada contaminação fúngica e baixa bacteriana (ex. Porta da Loja) e vice-versa (ex. Pêro Coimbra).

Globalmente, a percentagem de infeção é ainda bastante elevada, todavia, existe uma razão que pode ajudar a explicar esta baixa eficiência do processo de desinfeção dos explantes e que se prende com a contaminação endógena dos tecidos. O processo de desinfeção consiste na desinfeção superficial dos explantes, contudo, por vezes, estes podem conter microrganismos endógenos (endófitos) devido ao fato de estarmos perante material de campo (Canhoto, 2010; Cardoza, 2008). As estratégias para contornar este problema podem envolver a realização de transferências periódicas para meio fresco, ou a incorporação de antibióticos no meio de cultura (Cardoza, 2008).

O método de desinfeção não foi ainda o mais adequado para a desinfeção deste material biológico e as estratégias utilizadas para combater a infeção endógena não foram suficientes para

resolver o problema, tendo-se perdido muito material para contaminações. Assim, novos procedimentos terão de ser estudados ou otimizados para mitigar estas perdas. Contudo, os resultados mostraram claramente que variedades diferentes têm especificidades distintas, umas requerendo esforços de desinfecção maiores que outras (ex. a Bravo já não apresentou contaminações, enquanto que Espelho tem elevada contaminação microbiana). Por outro lado, temos variedades essencialmente com um problema de contaminações fúngicas por resolver (ex., Porta da Loja e Pêro de Borbela), e outras com problemas de contaminações bacterianas (ex., Pêro Coimbra e Espelho), envolvendo assim, estratégias distintas.

Em comparação com a desinfecção aplicada pelo protocolo *standard* do BPGV, com dados não publicados de infeção fúngica e bacteriana (aproximadamente 54%), demonstrou existir uma melhoria considerável devido à inclusão do adsorvente PVP no processo de desinfecção.

3.1.2 A oxidação dos explantes por libertação de compostos fenólicos varia com a variedade de macieira

Ao longo de 3 semanas os explantes foram sujeitos a transferências periódicas (semanais) para meio fresco de modo a reduzir os efeitos causados pela libertação de exsudados fenólicos, isto é, o comprometimento da viabilidade dos explantes. Os resultados apresentados na Figura 26, referem-se aos explantes que restaram (após descartar culturas contaminadas), ou seja, um total de 122 dos 240 explantes inoculados.

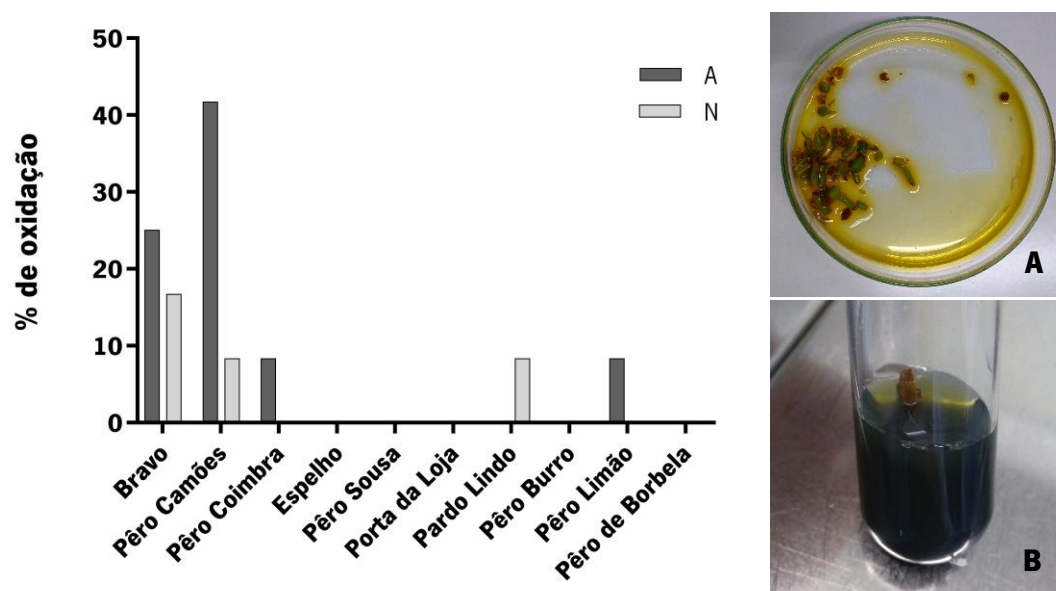


Figura 26 - Percentagem de oxidação dos explantes de ápices (A) e nós (N), para as diversas variedades de *Malus domestica* L.. Imagem A demonstra a oxidação nas placas aquando da troca de meios, e a imagem B a oxidação libertada para o meio de cultura quando inoculados, bem como a oxidação do explante.

Os resultados obtidos após o 1º mês sugerem que a metodologia seguida foi bastante eficaz para a maior parte das variedades. Assim, das 10 variedades analisadas, apenas duas apresentaram oxidação em ambos os tipos de explantes testados, sendo Pêro Camões a mais afetada. Os resultados sugerem ainda que os segmentos apicais são mais suscetíveis à fenolização que os segmentos nodais (Fig. 26). Na primeira semana quase todas as variedades demonstraram uma grande libertação de compostos fenólicos, tanto para o meio, como nas placas aquando da troca (Fig. 26 A e B). A libertação era maior nos segmentos apicais, principalmente nas variedades Pêro Camões e Porta da Loja, sendo que, na variedade Espelho, os segmentos nodais também demonstraram muita libertação de compostos. Foi ainda possível observar um bom desenvolvimento dos explantes nas variedades Espelho, Pêro Burro e Pardo Lindo (Fig. 27). Na variedade Pêro Limão, os rebentos demonstraram bom desenvolvimento, mas apenas nos segmentos nodais, ainda que tenha existido alguma libertação de compostos fenólicos oxidados na placa de Petri aquando da transferência para novo meio. A variedade que mostrou menor libertação de compostos na placa durante a primeira transferência foi Pardo Lindo.

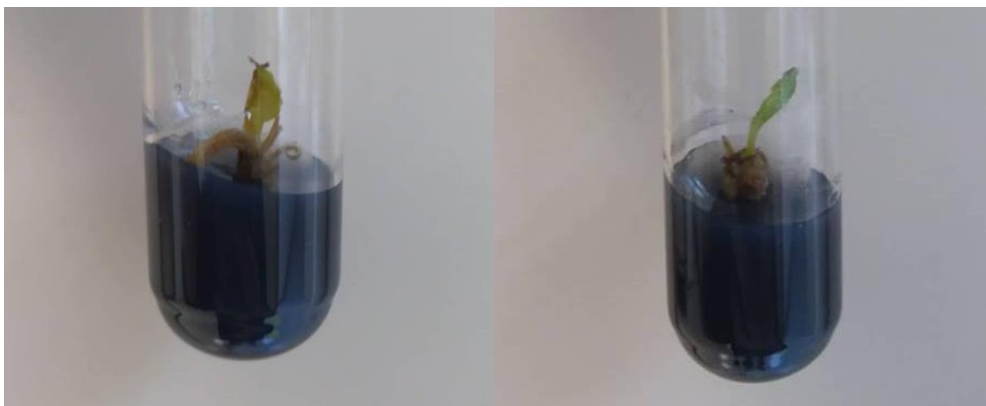


Figura 27 – Explantes apicais da variedade Pardo Lindo com desenvolvimento do rebento 1 mês após estabelecimento.

Apesar de serem variedades de uma mesma espécie é notória a diferença na sua resposta após 3 semanas de inoculação e trocas de meio. Os genótipos não respondem do mesmo modo a um procedimento de estabelecimento *in vitro* único, sendo necessário adaptar o procedimento de acordo com as variedades. Este resultado está de acordo com o previamente descrito por Dobránszki e colaboradores (2005; 2010), para as variedades Bravo e Pêro Camões em comparação com Espelho e Pêro Sousa, onde se denota diferenças no escurecimento dos explantes. A suplementação do meio com AA, PVP e CA para controlar a libertação de fenóis, demonstrou o sucesso esperado, contudo, não é possível determinar se a ação foi de alguns destes componentes específicos ou do conjunto deles, devido ao facto de não existir material biológico suficiente para realizar ensaios separados para diversas condições. Comparativamente ao protocolo *standard* aplicado no BPGV para estabelecimento, com

dados não publicados de oxidação (aproximadamente 78%), este novo protocolo demonstra bons resultados após 1 mês de inoculação dos segmentos apicais e nodais com trocas periódicas.

3.2 Proliferação de duas variedades de *Malus domestica* L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: concentrações mais altas de BAP induzem proliferação dos rebentos

Neste ensaio foi testada a concentração de BAP na proliferação de rebentos a partir de explantes apicais de duas variedades de *Malus domestica* L.: Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria. Na figura 28 encontram-se representados o número médio de rebentos por explante e respetivos comprimentos médios, nas duas concentrações testadas, avaliados ao fim do 1º mês (Fig. 28 A e B, respetivamente). No o 2º mês apenas foi testada a concentração 1,0 mg/L, pelo facto de ser a que revelou melhores resultados, tendo-se igualmente avaliado os mesmo parâmetros (Fig. 28 C e D, respetivamente).

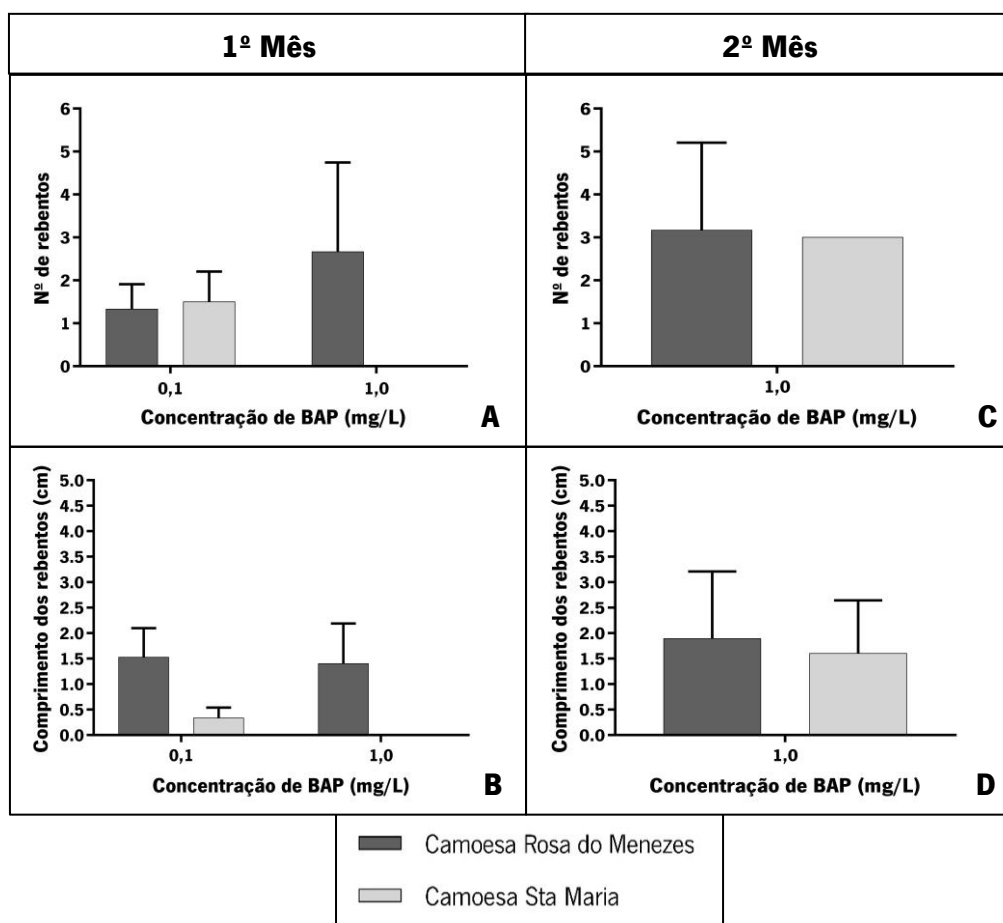


Figura 28 - Número de rebentos por explante e comprimento médio dos rebentos, para duas variedades de *Malus domestica* L., sob influência de duas concentrações diferentes de BAP no 1º mês (A e B) e apenas uma concentração de BAP no 2º mês (C e D). Nestes ensaios foram inoculados 22 explantes de Camoesa Rosa do Menezes e 6 explantes de Camoesa Sta Maria.

No 1º mês após inoculação (Fig. 28 A e B), para a variedade Camoesa Rosa do Menezes foi notório o sucesso do meio com 1,0 mg/L de BAP no número de rebentos produzido por explante (Fig. 28 A). O comprimento dos rebentos, contudo, não demonstrou diferença face às duas concentrações de BAP distintas mas foram maiores que os da variedade Sta Maria quando houve produção de rebentos (meio com 0,1 mg/L de BAP). A variedade Camoesa Sta Maria não apresentou resultados para a inoculação com 1,0 mg/L (Fig. 28 A e B). Isto pode dever-se ao facto de as gemas não se encontrarem em fase de desenvolvimento ou até da ausência das mesmas. Contudo, os explantes que foram inoculados na presença de 0,1 mg/L de BAP demonstraram o desenvolvimento de rebentos novos (Fig. 28 A). Deste modo, face à resposta obtida no 1º mês após inoculação, todos os explantes foram posteriormente inoculados no meio com 1,0 mg/L de BAP por mais um mês.

Relativamente variedade Camoesa Rosa do Menezes, a inoculação no meio com 1,0 mg/L de BAP demonstrou um desenvolvimento interessante. Durante o 1º mês, na figura 29, em 1.1 e 1.2 (ver círculos), podemos ver a evolução dos explantes (apicais e nodais) e o desenvolvimento de novos rebentos. Estes foram os explantes com maior capacidade de proliferação. É possível ainda verificar desenvolvimento foliar na generalidade dos rebentos, contudo, após 1 mês denota-se alguma senescência foliar em alguns dos explantes (Fig. 29 1.2 e 2.2 ver setas). Outro aspeto interessante a salientar reside no alongamento acentuado de rebentos já existentes (Fig. 29 1.3 ver seta).

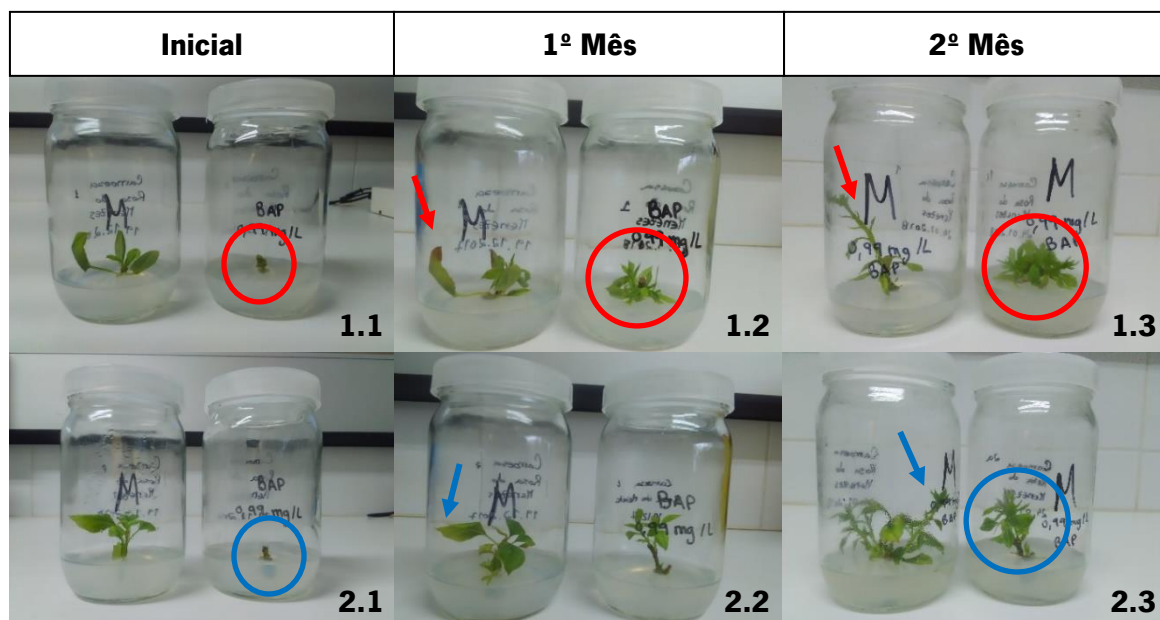


Figura 29 - Diferentes explantes de macieira da variedade Camoesa Rosa do Menezes (1 e 2) em resposta a inoculação em meios diferentes: explantes apicais no meio com 0,1 mg/L de BAP (frascos da esquerda em 1.1, 1.2, 2.1, 2.2) e explantes nodais no meio com 1,0 mg/L de BAP (frascos da direita em 1.1, 1.2, 2.1, 2.2). Em 1.3 e 2.3 ambos os explantes estão inoculados no meio com 1,0 mg/L de BAP.

Como referido acima, face à resposta positiva no 1º mês após inoculação, todos os explantes foram posteriormente inoculados no meio com 1,0 mg/L de BAP e seguidos por mais um mês. Em 1.3 e 2.3 da figura 29 é possível identificar o alongamento de rebentos já existentes (ver setas), bem como de novos rebentos (ver círculos e comparar com círculos em 1.1 e 2.1). Após 2 meses de inoculação, foi então possível ver o progresso dos explantes no que diz respeito à multiplicação de rebentos.

Os resultados obtidos para a variedade Camoesa Sta Maria (Fig. 30) não foram tão positivos. Comparativamente à variedade Camoesa Rosa do Menezes, não se observou uma resposta tão evidente ao meio com maior concentração de BAP ao nível da produção de novos rebentos e alongamento, tanto dos explantes apicais como nodais. Uma possível explicação poderá ser as gemas não se encontrarem em fase de desenvolvimento, ou ter requisitos em citocininas distintos. De facto, em 2.2 podemos observar a inexistência de novos rebentos no explante em meio com maior concentração de BAP (ver círculo) e senescência das folhas no explante inoculado no meio com menor concentração (ver setas). Em 1.1 e 1.2 pode-se observar um desenvolvimento foliar considerável do explante do frasco esquerdo. Devido à ausência de resposta no meio com maior concentração de BAP por défice na qualidade fitossanitária dos explantes inoculados nesse meio durante o 1º mês (Fig. 30 1.2 e 2.2), para o 2º mês de inoculação, todos os explantes foram inoculados no meio com 1,0 mg/L de BAP.

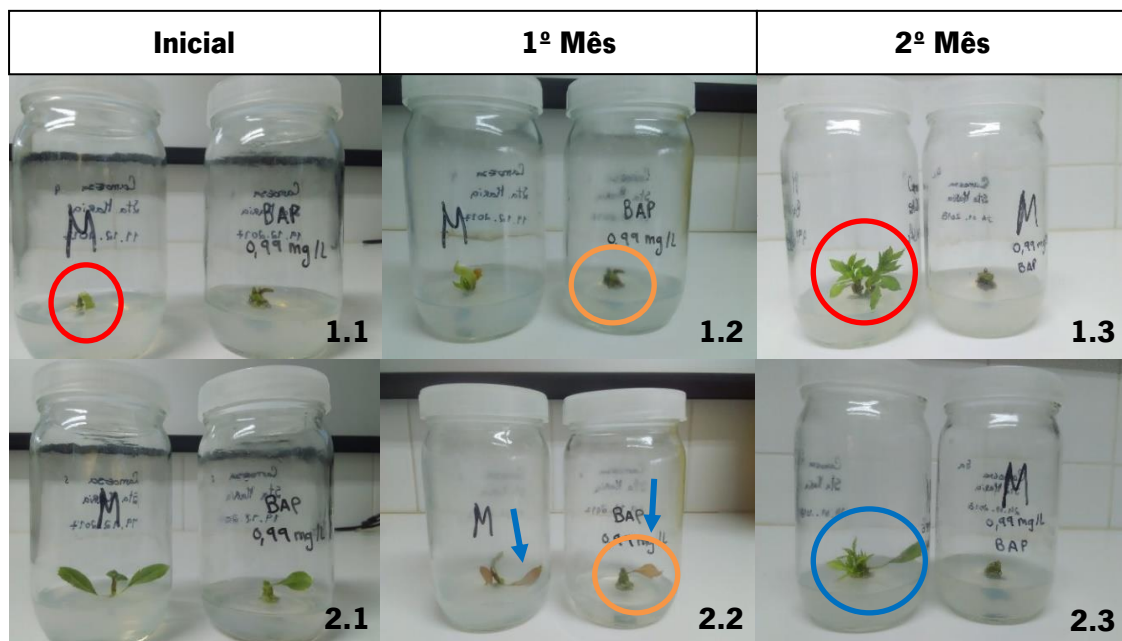


Figura 30 - Diferentes explantes de macieira da variedade Camoesa Sta Maria (1 e 2) em resposta a inoculação em meios diferentes: explantes apicais no meio com 0,1 mg/L de BAP (frascos da esquerda em 1.1, 1.2, 2.1, 2.2) e explantes nodais no meio com 1,0 mg/L de BAP (frascos da direita em 1.1, 1.2, 2.1, 2.2). Em 1.3 e 2.3 ambos os explantes estão inoculados no meio com 1,0 mg/L de BAP.

O intuito desta estratégia consistiu em perceber se os restantes explantes (aqueles inoculados em meio com 0,1 mg/L de BAP) respondiam à concentração de BAP mais elevada, entendendo deste

modo se o problema encontrado no 1º mês (nos meios com 1,0 mg/L de BAP) se deveu à qualidade fitossanitária dos explantes ou à concentração de BAP do meio.

Após 1 mês de inoculação (2º mês), no que diz respeito aos explantes visíveis em 1.3 e 2.3, é possível afirmar que a multiplicação se verificou com sucesso nos frascos da esquerda, devido à presença de novos explantes com crescimento considerável (ver círculos). Contudo, os frascos da direita não apresentaram quaisquer desenvolvimentos, indo de encontro à possibilidade de ausência de gemas laterais nos segmentos caulinares utilizados.

Embora neste ensaio se tenha verificado uma maior eficácia do meio suplementado com 1,0 mg/L de BAP no que diz respeito à capacidade de proliferação/multiplicação de rebentos a partir de explantes apicais e nodais, é importante realçar que a suplementação de 0,1 mg/L de BAP pode constituir uma ferramenta útil para a conservação *in vitro* de recursos genéticos, neste caso de macieira. De facto, uma menor capacidade proliferativa do material a propagar evita transferências frequentes, poupando recursos materiais e humanos e de tempo associados, racionalizando melhor o trabalho de conservação em bancos de germoplasma.

3.3 Proliferação de duas variedades de *Malus domestica* L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: luz vermelha e branca promovem a produção de novos rebentos

O desenvolvimento das plantas é altamente influenciado pela luz, processo esse que se denomina de fotomorfogénese (Taiz *et al.*, 2017). O foco principal neste procedimento foi o estudo do comportamento dos explantes apicais e nodais quando sujeitos a diferentes qualidades de luz. Para este ensaio começou por se obter os espectros de transmissão dos papeis celofane utilizados, como mencionado em 2.1.4 (Fig. 31).

Nos espectros de transmissão mostrados na figura 31, podemos verificar que o papel vermelho transmite praticamente apenas na região do vermelho, entre os 600 e 700 nm, praticamente não transmitindo mais comprimentos de onda no visível (400-700 nm). O papel amarelo transmite na região do verde, amarelo e vermelho (500-700 nm). Relativamente ao papel azul, este transmite essencialmente na zona do azul e um pouco na região do verde, entre os 400 e os 550 nm. Por fim, o papel verde demonstrou pelo espectro, ter um pico na região do verde mas transmitir com eficiência não desprezável até ao vermelho, entre os 500 e os 700 nm.

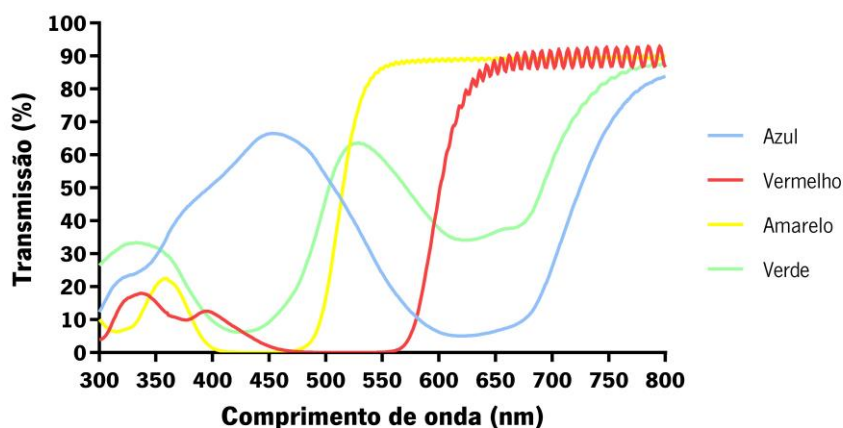


Figura 31 - Espectro de transmissão dos diferentes papéis celofane usados para fornecer tipos de luz distintas às culturas: azul, vermelho, amarelo e verde. Os espectros foram obtidos com espectrofotômetro UV-Vis (UV-2501 PC, UV-VIS Recording Spectrophotometer).

Os resultados obtidos para este ensaio da proliferação sob diferentes qualidades de luz encontram-se nas figuras 32 e 33, para as duas variedades de macieira.

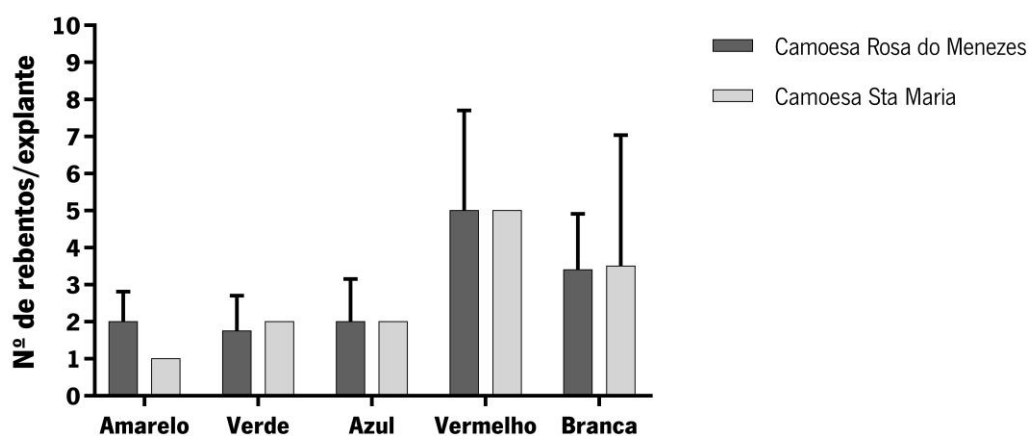


Figura 32 - Número médio (n= 1 -5) de rebentos produzidos por explante, pelas duas variedades de *Malus domestica* L., para cada tipo de luz testada.

Relativamente ao número de rebentos produzidos (Fig. 32) é possível afirmar que ambas as variedades demonstraram uma maior capacidade de produção/multiplicação quando mantidas em luz vermelha e luz branca. Este resultado está de acordo com o descrito pelos autores Erig e Schuch (2006), em trabalhos realizados com explantes de *Malus domestica* Borkh.

Entre todos os pigmentos/fotorreceptores que promovem respostas fotomorfogénicas por parte das plantas, os mais importantes são aqueles que absorvem luz vermelha e azul. O fitocromo, pigmento proteico, consegue absorver luz na zona do vermelho (Pr) (620-700 nm) e vermelho-longínquo (Pfr) (710-850 nm) e do azul (350-500 nm) (Taiz *et al.*, 2017).

O pico de transmissão do papel vermelho verifica-se a partir dos 600 nm, qualidade de luz para a qual ambas as variedades produziram em média maior número de rebentos/explante. Apesar de o

fitocromo absorver na zona do azul, os resultados obtidos na figura 30 parecem sugerir que o fitocromo esteja envolvido na resposta onde mais vermelho favorece a forma Pfr que é a forma ativa do fitocromo.

Estudos complementares demonstram também que o fitocromo B está envolvido na resposta do crescimento dos rebentos à luz em *Arabidopsis thaliana* L. e em *Sorghum bicolor* L., e indica que o fitocromo B atua através da percepção de luz vermelha : vermelha longínqua (R:FR), e altos níveis de R:FR promovem, como consequência do fitocromo B, o rebentamentos dos gomos (Leduc *et al.*, 2014).

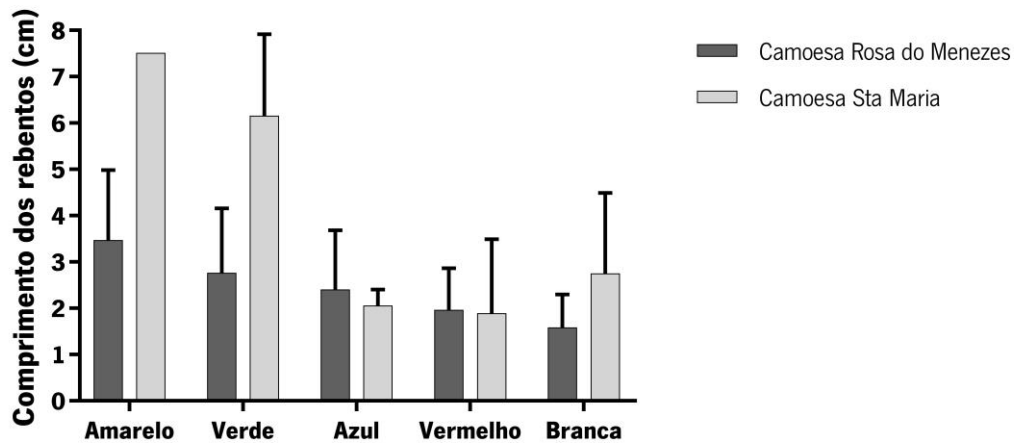


Figura 33 - Comprimento dos rebentos produzidos pelas duas variedades de *Malus domestica* L., para cada qualidade de luz diferente aplicada aos explantes.

Como é facilmente observável na figura 33, os rebentos atingiram um maior comprimento quando os explantes eram crescidos em luz amarela ou verde, em ambas as variedades. As clorofilas não absorvem energia luminosa na zona do verde nem do amarelo (Fig. 34), entre os 500 e os 600 nm (Molnar e Gair, 2013), tal como o fitocromo (Taiz *et al.*, 2017), deste modo, os explantes inoculados para estas qualidades de luz encontram-se “ensombrados”.

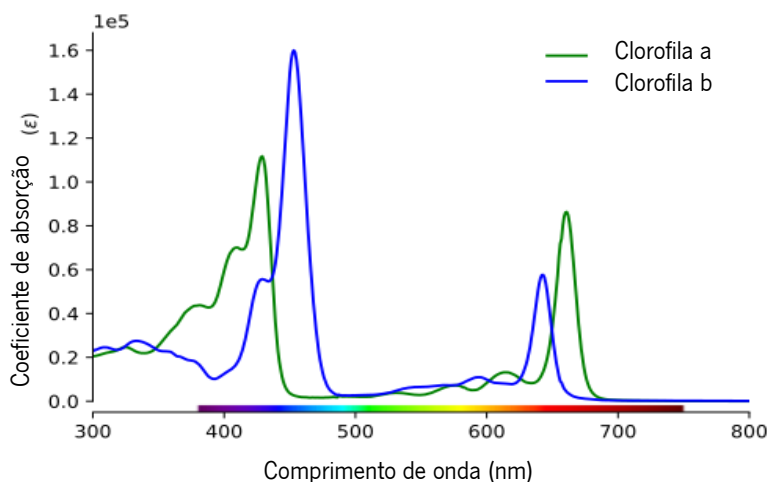


Figura 34 - Espectro de absorção da clorofila a e b (imagem adaptada de Helfrich, 2018).

Comprimentos de onda na zona do vermelho e do azul, ativam o fitocromo e o criptocromo, respetivamente. Quando estes se encontram inativos, no escuro ou “ensombrados”, os fatores de interação do fitocromo (PIFs) induzem o alongamento do caule, reprimindo a expansão das folhas (Gommers, 2018). De acordo com Taiz e colaboradores (2017), em resposta ao sombreamento pela qualidade de luz na qual foram inoculados, os rebentos aumentam o comprimento do caule de modo a “procurar” a luz PAR (Photosynthetically Active Radiation) que se encontra limitante.

É possível observar na figura 35, registos fotográficos de exemplos de explantes inoculados sob os tipos de luz com maior influência na proliferação e crescimento dos mesmos, onde é possível visualizar o alongamento do caule nas luzes amarela e verde (ver setas) e a proliferação dos rebentos na luz branca e vermelha (comparar círculos), um mês após inoculação.

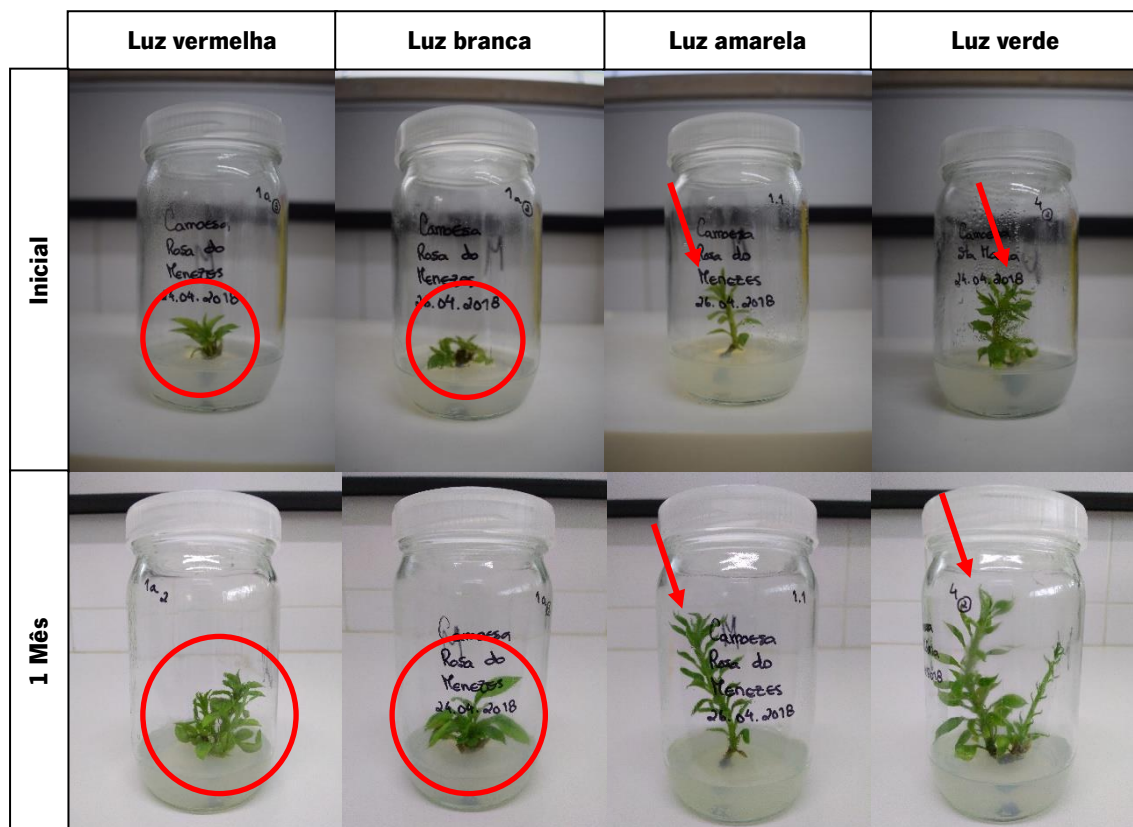


Figura 35 - Registo fotográfico dos explantes de *Malus domestica* L. mantidos sob a influência dos tipos de luz com maior impacto na proliferação e crescimento dos mesmos, no momento da inoculação (fila superior) e 1 mês após inoculação (fila inferior).

As respostas obtidas neste ensaio permitem-nos perceber a utilidade de ensaios com a qualidade de luz para trabalhos futuros na conservação deste tipo de germoplasma. A partir das respostas obtidas neste ensaio é possível desenvolver novas estratégias de otimização de multiplicação, elaborando um protocolo onde se inicie a indução da proliferação com luzes branca e/ou vermelha para aumentar a

multiplicação de rebentos e, depois, se troque posteriormente para a indução do alongamento dos caules com luzes verde e/ou amarela.

3.4 Enraizamento de duas variedades de *Malus domestica* L. - Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria: insucesso no efeito de tratamento bifásico com presença de auxinas no escuro e ausência de auxinas no meio de cultura à luz

A percentagem de enraizamento alcançada após inoculação de rebentos apicais e nodais obtidos do ensaio anterior, no tratamento bifásico (presença de auxinas no escuro e ausência de auxinas na luz), foi de cerca de 20% para ambas as variedades de *Malus domestica* L.. Na variedade Camoesa Rosa do Menezes desenvolveram raiz 3 de 15 explantes e, na variedade Camoesa Sta Maria, 1 de 5 explantes.

O comprimento médio das raízes desenvolvidas foi muito semelhante entre as duas variedades (Fig. 36).

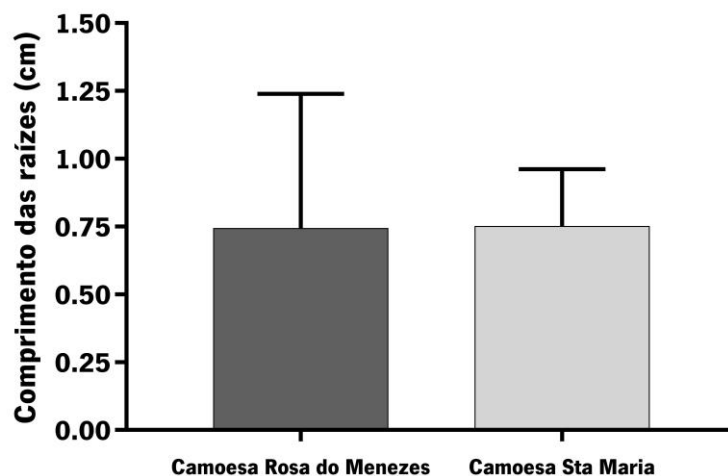


Figura 36 - Comprimento médio das raízes (n= 5-15) de rebentos apicais e nodais sujeitos a tratamento bifásico (presença de auxinas no escuro e ausência de auxinas na luz), para cada variedade de *Malus domestica* L.

Os desvios-padrão são ainda elevados, principalmente o associado à variedade Camoesa Rosa do Menezes que mostrou comprimentos de raízes com valores mais distintos (Fig. 37), contudo, isto também se prende com o número reduzido de raízes que foi possível medir (ver setas). Por esta razão, seria útil repetir este ensaio com maior número de rebentos por variedade e até testando outros tratamentos, como, por exemplo, introdução de auxinas em várias concentrações no meio destinado ao tratamento na luz, e prolongar o ensaio por mais uns meses em trabalho futuro.

O protocolo aplicado não teve grande sucesso em qualquer das variedades de *Malus domestica* L. usadas comparado a estudos realizados por Ciccotti e colaboradores (2008). A razão do sucedido

pode explicar-se pelo facto de, por norma, os ensaios de enraizamento precisarem de mais tempo do que tinha disponível para terminar o trabalho para se poder fazer uma avaliação robusta dos resultados. Além disso, o tempo necessário para a formação de raízes num meio sem hormonas, meio utilizado no tratamento na presença de luz, varia bastante entre os diferentes genótipos, sendo sugerido acima, a introdução de auxinas neste meio. Seria necessário, por isso, repetir o ensaio e aumentar o número de explantes por variedade, dando mais consistência estatística ao estudo.



Figura 37 - Explantes de ambas as variedades de *Malus domestica* L. sujeitas ao procedimento de enraizamento. À direita podem observar-se melhor as suas raízes.

3.5 Proliferação de sete variedades e clones de *Pyrus communis* L.: meio MS suplementado com sorbitol e BAP promove a proliferação de rebentos

Os explantes de sete variedades e clones de *Pyrus communis* L. foram inoculados em meio MS, com sorbitol (30 g/L) como fonte de carbono e BAP (4,0 mg/L). Um mês após inoculação, os explantes foram repicados em novos meios e avaliou-se a proliferação de rebentos, de modo a poder comparar a capacidade proliferativa dos explantes, ao longo de 2 meses, com a existente com o protocolo *standard* utilizado no BPGV. Os resultados encontram-se explícitos nas figuras 38 e 39.

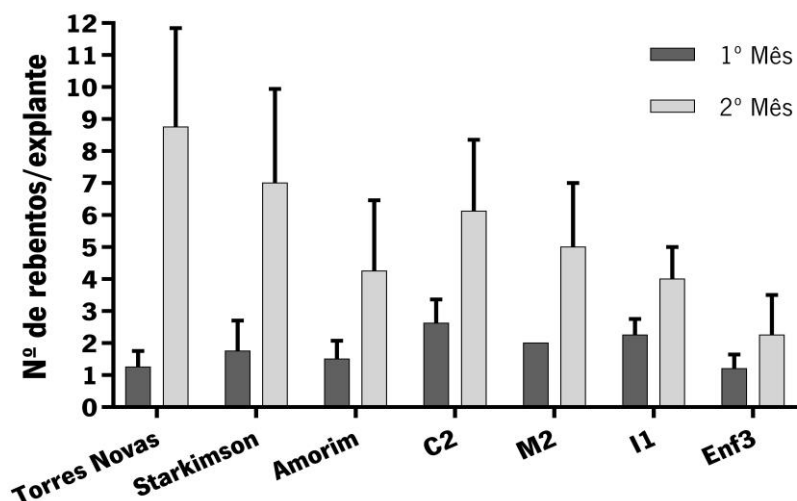


Figura 38 - Número médio de rebentos produzidos por explante (n= 3-8), nas sete variedades e clones de *Pyrus communis* L., 1 e 2 meses após inoculação.

Como é possível verificar na figura 38, todas as variedades e clones de *Pyrus communis* L., demonstraram boas respostas ao meio estabelecido, tendo aumentado a produção de rebentos consideravelmente 2 meses após inoculação. A variedade com maior produção de rebentos/explante foi Torres Novas, onde é possível visualizar uma diferença notória do 1º para o 2º mês.

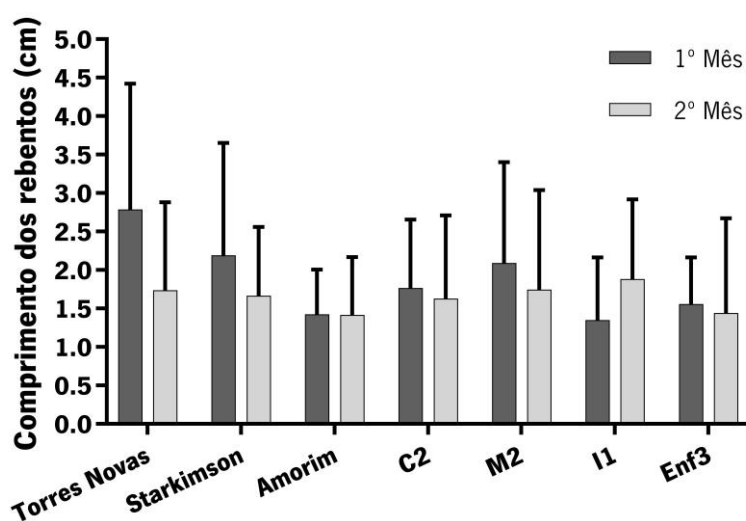


Figura 39 – Comprimento médio dos rebentos produzidos por cada variedade e clone de *Pyrus communis* L., ao longo de 2 meses de inoculação em meio MS suplementado com sorbitol e BAP.

No que diz respeito ao comprimento dos rebentos (Fig. 39), os valores relativos ao 2º mês demonstram não ter sofrido alteração apreciável comparativamente ao 1º mês. Contudo, podemos ver que as barras dos desvios-padrão são muito grandes. Isto acontece, devido à enorme proliferação de novos rebentos (Fig. 38), existindo deste modo rebentos com dimensões muito díspares.

Imagens de um explante da variedade Torres Novas ao longo dos dois meses, encontram-se explicitas na figura 40, de modo a elucidar a sua capacidade proliferativa em resposta ao meio aplicado.

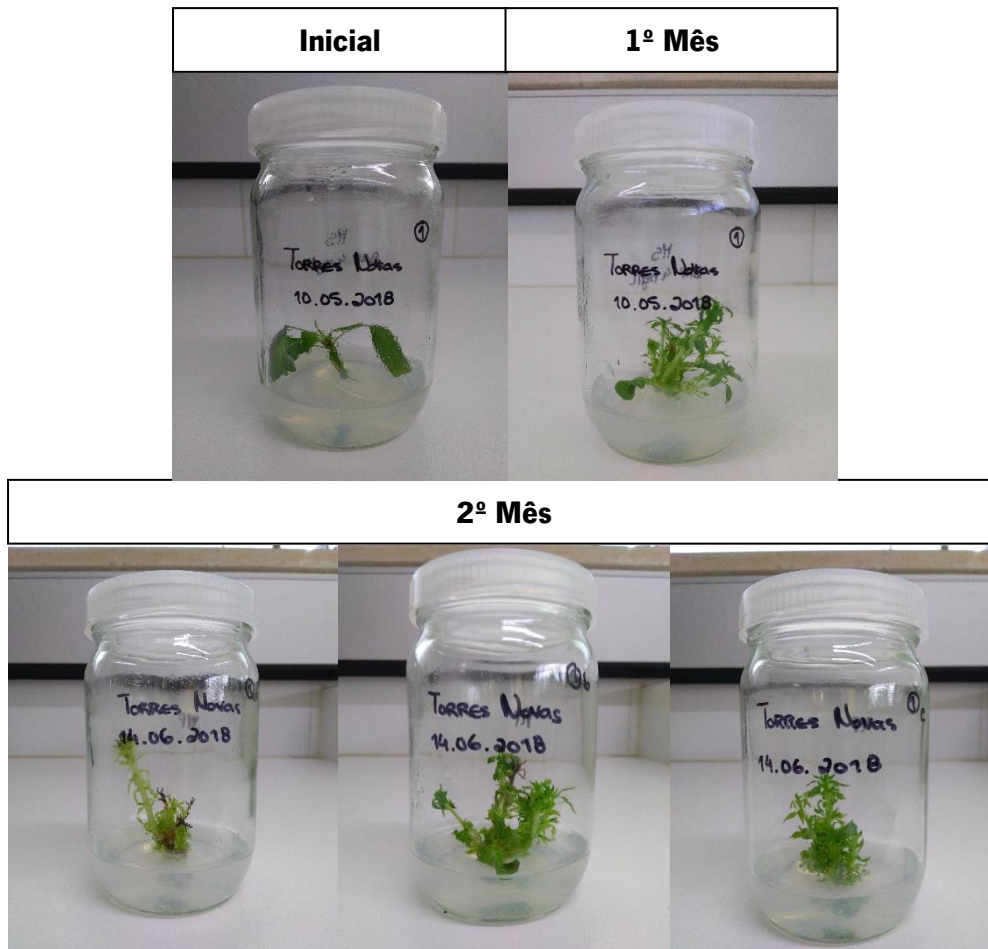


Figura 40 - Explante da variedade Torres Novas, numa fase inicial de inoculação e após 1º e 2º mês de inoculação em meio MS suplementado com sorbitol e BAP.

3.6 Proliferação de sete variedades e clones de *Pyrus communis* L.: luz vermelha e branca promovem a produção de novos rebentos

Todas as variedades e clones, à exceção de Enf3, foram inoculadas no meio anteriormente descrito (MS suplementado com sorbitol e BAP) e mantidos sob a influência de cinco qualidade de luz diferentes: branca, amarela, verde, vermelha e azul. Tal como em *Malus domestica* no tópico 3.3, o objetivo foi avaliar o efeito das diferentes qualidades de luz na proliferação dos rebentos. Os resultados obtidos para este ensaio encontram-se nas figuras 41 e 43, para as sete variedades e clones.

Relativamente ao número de rebentos produzidos por explante em cada qualidade de luz (Fig. 41), numa primeira visão geral, é possível verificar que foi semelhante àquela obtida para *Malus domestica* L. (Fig. 32). De facto, houve uma maior produção de rebentos para a maioria das variedades e clones, sob a influência da luz vermelha e da luz branca, resultados esses que vão de encontro ao descrito por Erig e Schuch (2006) em trabalhos realizados com explantes de *Malus domestica* Borkh.

Estes resultados vão também de encontro ao explicado para *Malus* no tópico 3.3. As respostas obtidas neste ensaio vão de encontro à literatura, visto que o fitocromo tem uma importância inequívoca na fotomorfogénese das plantas.

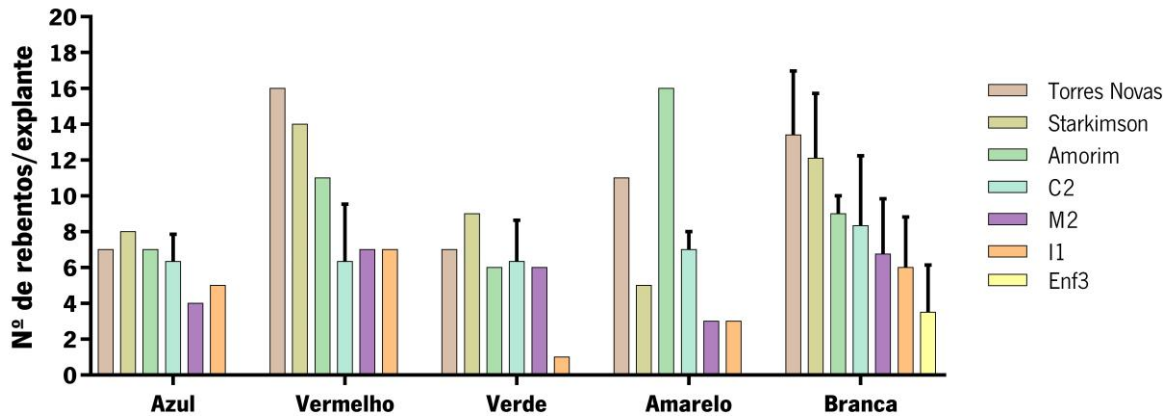


Figura 41 - Número médio (n= 1-9) de rebentos produzidos por explante, pelas sete variedades e clones de *Pyrus communis* L., para cada tipo de luz testada.

Contudo, podemos ainda sublinhar uma proliferação curiosa para a qualidade de luz amarela relativamente à variedade Amorim. Tal pode dever-se a questões genótípicas, ao facto de nos explantes inoculados sujeitos a luz amarela existirem imensos rebentos laterais nos segmentos caulinares utilizados. É importante salientar que existiram poucas réplicas neste procedimento, pelo que o resultado demonstra ser pouco robusto.

Na figura 42 podemos ver o exemplo de dois explantes da variedade Starkimson, no que diz respeito à produção de rebentos sob a influência da luz vermelha e branca, respetivamente.

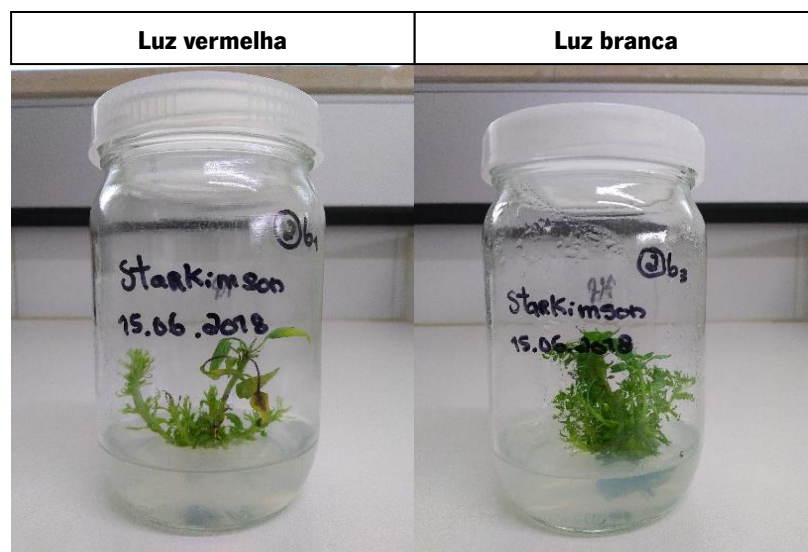


Figura 42 - Explantes da variedade Starkimson, em resposta às luzes vermelha e branca, para a qual existiu um maior número de rebentos produzidos, um mês após inoculação em meio MS suplementado com sorbitol e BAP.

Relativamente ao comprimento médio dos rebentos os resultados obtidos com *Pyrus communis* L., já não são concordantes com aqueles obtidos para *Malus domestica* L. (Fig. 33). Nas variedades e clones testados de pereira, parece que a qualidade luz não exerceu influência na proliferação dos explantes, por outro lado parece haver respostas dependentes da variedade e clone, como sugerem Dobránszki e colaboradores (2005; 2010).

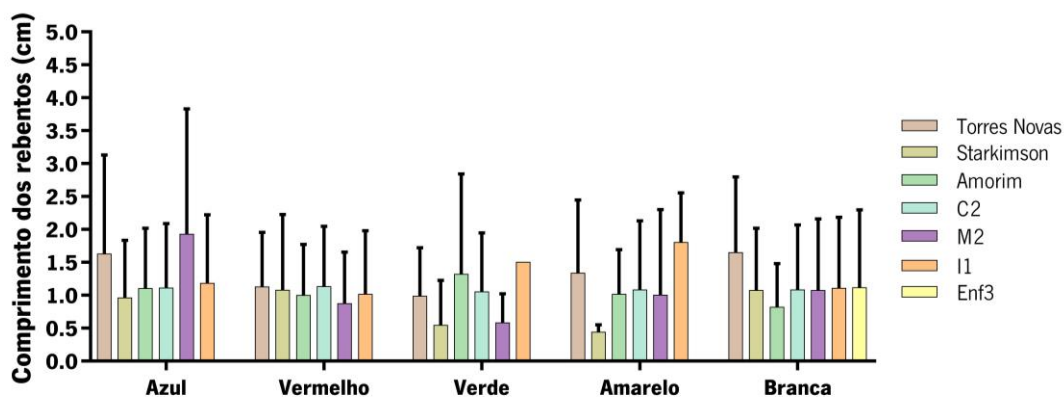


Figura 43 – Comprimento médio dos rebentos produzidos pelas sete variedades e clones de *Pyrus communis* L., para cada qualidade de luz diferente aplicada aos explantes.

O ensaio não permitiu tirar respostas conclusivas sobre o efeito da qualidade da luz no tamanho dos rebentos produzidos por cada variedade e clone de *Pyrus communis* L.. Para além da variabilidade genotípica aparente, há duas ordens de razão para o sucedido. A primeira reside no facto de termos poucas réplicas e uns desvios-padrão muito grandes o que não permite ter robustez estatística; a segunda no facto de estarmos ao mesmo tempo a testar diferentes espetros e diferentes intensidades luminosas que também interferem com o crescimento. Já depois do estágio terminar foi possível medir as intensidades luminosas das luzes transmitidas pelos diferentes celofanes (Anexo IV) e são de facto muito distintas.

Assim, seria necessário repetir o ensaio, com maior número de explantes, sendo esse número igual entre variedades e clones, e com rebentos semelhantes provenientes de ensaios de estabelecimento de *Pyrus*, de modo a certificar que todos se encontravam no mesmo estado de desenvolvimento. Caso os resultados se assemelhassem aos encontrados para *Malus domestica* L. no que diz respeito ao tamanho dos rebentos, seria possível, posteriormente otimizar um protocolo de proliferação para ambas as espécies jogando com a composição hormonal do meio de cultura, os tipos de luzes, onde inicialmente os explantes produzissem mais rebentos e depois alongassem.

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O trabalho de tese realizado e aqui reportado inscreveu-se no âmbito da conservação dos recursos genéticos de variedades de *Malus domestica* L. e de variedades e clones de *Pyrus communis* L. presentes no Banco Português de Germoplasma Vegetal. O trabalho desenvolvido tentou dar resposta a algumas necessidades identificadas por esta entidade, em particular na otimização de alguns protocolos de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de variedades e clones específicos para garantir a segurança de recursos conservados, bem como na aplicação de novos protocolos com novas valências de estudo, entre elas a influência da qualidade de luz na proliferação de rebentos e o enraizamento de explantes com aplicação de tratamento bifásico (presença de auxinas no escuro e ausência de auxinas na luz).

No que diz respeito ao **estabelecimento** de culturas *in vitro* a partir de explantes apicais e nodais de ***Malus domestica* L.** para efeitos de conservação *in vitro* das variedades Bravo, Pêro Camões, Pêro Coimbra, Espelho, Pêro Sousa, Porta da Loja, Pardo Lindo, Pêro Burro, Pêro Limão e Pêro de Borbela, os principais desafios prendiam-se com um elevado nível de contaminação microbiana e excesso de fenolização dos explantes após inoculação. O processo de desinfeção aplicado antes do estabelecimento dos explantes não demonstrou a eficácia esperada, tendo existido uma grande percentagem de explantes contaminados, por fungos e bactérias, uma semana após inoculação. Contudo, nos explantes que não sofreram contaminações, o meio MS suplementado com ácido ascórbico (AA; 10,04 mg/L), polivinilpirrolidona (PVP; 500 mg/L) e carvão ativado (CA; 1 g/L) demonstrou sucesso na neutralização da libertação de compostos fenólicos, juntamente com as trocas periódicas durante 1 mês.

Devido à disponibilidade muito tardia de material biológico (ramos apicais resultantes do crescimento do ano a partir de plantas mãe no campo), tendo sido a colheita apenas possível a 25 de junho, procedeu-se à otimização de ensaios de proliferação com material de *Malus* e *Pyrus* disponível no BPGV, onde o desafio principal consistiu em aumentar o número de explantes para segurança na conservação de recursos.

Relativamente à **proliferação** de explantes apicais e nodais de duas variedades de ***Malus*** (Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria), verificou-se que os explantes inoculados em meio MS suplementado com BAP em duas concentrações: 1,0 e 0,1 mg/L, demonstraram uma maior capacidade proliferativa no meio com BAP 1,0 mg/L ao fim de 2 meses, tendo aumentado significativamente o número de rebentos e comprimento dos mesmos.

Para se avaliar o **efeito de qualidade de luz** na capacidade proliferativa dos explantes de ***Malus*** testaram-se cinco diferentes luzes: branca, vermelha, amarela, verde e azul. Os resultados

mostram que os explantes, apicais e nodais, respondem melhor à luz vermelha e branca, demonstrando uma maior capacidade proliferativa para estas luzes. Verificou-se ainda que em resposta à luz amarela e verde, os explantes mostram um alongamento considerável dos segmentos caulinares.

Em relação ao tratamento bifásico aplicado no procedimento de **enraizamento** a explantes de duas variedades de **Malus** (Camoesa Rosa do Menezes e Camoesa Sta Maria), com inoculação em meio agarizado na presença de IBA 5,08 mg/L sujeito ao escuro, e posterior inoculação em meio MS ausente de auxinas sujeito à luz, os resultados indicam que o procedimento não demonstrou sucesso em comparação com estudos publicados por Ciccotti e colaboradores (2008).

No procedimento de **proliferação** aplicado às variedades de **Pyrus communis L.** (Torres Novas, Starkinson e Amorim) e aos clones de pêra-rocha (C2, M2, I1 e Enf3), a aplicação de meio MS suplementado com 30 g/L de sorbitol e 4,0 mg/L de BAP aumentou significativamente o número de rebentos o comprimento dos mesmos ao fim de 2 meses em comparação com o protocolo *standard* utilizado no BPGV onde se utilizava glucose como fonte de carbono.

Avaliou-se, tal como em *Malus*, o **efeito da qualidade da luz** na capacidade proliferativa dos explantes de **Pyrus**, testando-se os mesmos tipos de luz. Verificou-se que em resposta à luz vermelha e branca os explantes, apicais e nodais, demonstram uma maior capacidade proliferativa, exibindo maior número de rebentos.

Futuramente, e para as variedades de **Malus domestica L.**, existe a necessidade de melhorar o processo de desinfecção dos explantes apicais e nodais destinados a meios de estabelecimento, usando soluções desinfetantes com maior concentração e/ou mais tempo. No que diz respeito ao ensaio de proliferação, é importante salientar que o meio suplementado com 0,1 mg/L de BAP também reflete aplicabilidade para os trabalhos efetuados no BPGV, quando o intuito for conservar sem necessidade de multiplicar por segurança. Visto que a concentração de BAP 1,0 mg/L apresentou bons resultados, seria interessante testar concentrações mais elevadas em trabalhos futuros.

Em relação ao procedimento de enraizamento com tratamento bifásico, seria útil repetir o ensaio com maior número de rebentos por variedade e alterar a constituição da segunda parte do tratamento, introduzindo auxinas (IBA a diversas concentrações) no meio ausente de auxinas, prolongando o ensaio por mais uns meses em trabalhos futuros.

Ficou por realizar a transferência dos explantes com raiz para um ambiente *ex vitro* para se avaliar o sucesso na aclimação das diferentes variedades e clones, mas será certamente um trabalho que terá continuidade no BPGV.

No caso de ***Pyrus communis* L.**, seria conveniente repetir o procedimento relativo à influência das cinco qualidades de luz, com maior número de explantes por variedades e clones, idênticos entre si no que concerne ao estado evolutivo dos segmentos caulinares utilizados.

A realização deste trabalho permitiu a complementação dos acessos de *Malus domestica* L. e *Pyrus communis* L. no BPGV, permitindo assegurar a obtenção de explantes suficientes para conservação das diversas variedades destas duas espécies. O trabalho contribuiu com informação relevante que poderá ser aplicada no BPGV nas várias fases do processo de conservação, seja estabelecimento, proliferação, enraizamento ou manutenção de conservação de *Malus domestica* L., como proliferação e manutenção de conservação de *Pyrus communis* L..

BIBLIOGRAFIA

- Amiri**, E. M., e Elahinia, A. (2011) 'Optimization of medium composition for apple rootstocks', *African Journal of Biotechnology*, 10(18), pp. 3594–3601. doi: 10.5897/AJB10.1945.
- Anirudh**, T., e Dalal, R. P. S. (2008) 'Micropropagation of pear (*Pyrus* spp.): A review', *Agricultural Reviews*, 29(4), pp. 260–270.
- Barata**, A. M., Bettencourt, E., Santos, A., Eiras-Dias, J. E., Oliveira, M., Sousa, R. M., e Matos C. (2008) 'The State of ex situ Management', em Country Report on The State of Plant Genetic Resources For Food and Agriculture: *State of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture in Portugal*, pp. 23–26.
- Barata**, A. M., Rocha, F., Reis, A., e Lopes V. R. (2011) 'O Banco Português de Germoplasma Vegetal e a conservação dos recursos genéticos em Portugal', em *Agrorural: Contributos científicos*. INRB, pp. 964–974. doi: 10.13140/2.1.2738.0809.
- Barata**, A. M., Gaspar, C., Rocha, F., e Lopes, V. R. (2017) 'Banco Português de Germoplasma Vegetal – 40 anos de conservação dos recursos genéticos em Portugal', em *cadernos de análise e prospetiva CULTIVAR*, 8 (Novembro), pp. 85–90. doi: 10.13140/2.1.2738.0809.
- Bell**, R. L., e Reed, B. M. (2002) '*In Vitro* Tissue Culture of Pear: Advances in Techniques for Micropropagation and Germplasm Preservation', *Acta Horticulturae*, 596, pp. 412–418.
- Bhatti**, S., e Jha, G. (2010) 'Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple', *Plant Cell Reports*, 29(11), pp. 1215–1225. doi: 10.1007/s00299-010-0907-8.
- Birnbaum**, K., DeSalle, R., Pethers, C. M., e Benfey, P. N. (2003) 'Integrating Gene Flow, Crop Biology, and Farm Management in On-Farm Conservation of Avocado (*Persea americana*, Lauraceae)', *American Journal of Botany*, 90(11), pp. 1619–1627. doi: 10.3732/ajb.90.11.1619.
- Bouza**, L., Jacques, M., e Miginiac, E. (1994) '*In-Vitro* Propagation of *Peonia-Suffruticosa* Andr Cv Mme-De-Vatry - Developmental Effects of Exogenous Hormones during the Multiplication Phase', *Scientia Horticulturae*, 57(3), pp. 241–251.
- Boyer**, J., e Liu, R. H. (2004) 'Apple phytochemicals and their health benefits', *Nutrition Journal*, 3, pp. 1–45. doi: 10.1186/1475-2891-3-1.
- Butler**, M. S. (2004) 'The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery †', *Journal of Natural Products*, 67(12), pp. 2141–2153. doi: 10.1021/np040106y.
- Canhoto**, J. M. (2010) *Biotechnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética*. Coimbra

University Press.

Cardoza, V. (2008) 'Tissue Culture: The Manipulation of Plant Development', em *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications*, pp. 132–402.

Chang, Y., e Reed, B. M. (2001) 'Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation', *HortScience*, 36(7), pp. 1329–1333.

Ciccotti, M., Bisognin, C., Battocletti, I., Salvadori, A., Herdemertens, M., e Jarausch, W. (2008) 'Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes', *Agronomy Research*, 6(2), pp. 445–458.

Claudio, L. (2011) 'Waste Couture: Environmental Impact of the Clothing Industry', *Environmental Health Perspectives*, 115(9), pp. A448–A454.

Coart, E., Van Glabeke, S., De Loose, M., Larsen, A. S., e Roldán-Ruiz, I. (2006) 'Chloroplast diversity in the genus *Malus*: New insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.)', *Molecular Ecology*, 15(8), pp. 2171–2182. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02924.x.

COTHN (2017) *Apresentação do projeto: Inovpomo*. Disponível em: http://www.cothn.pt/files/18_convite_inovpom_56f10ef505099.pdf (Acedido a: 12 Agosto 2018).

Cragg, G. M., e Newman, D. J. (2013) 'Natural products: A continuing source of novel drug leads', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V., 1830(6), pp. 3670–3695. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.

Dar, R. A., Ahmad, M., Kumar, S., e Reshi, M. (2015) 'Agriculture germplasm resources : A tool of conserving diversity', 10(160), pp. 326–338. doi: 10.5897/SRE2015.6206.

Darwin, C. (1868) *The variation of animals and plants under domestication*. Volume 2. O. Judd.

Das, A., Varma, A., Pandey, R., e Chaudhury R. (2017) 'Ex Situ Conservation Strategies in Litchi Germplasm', in *The Lychee Biotechnology*, pp. 381–393. doi: 10.1007/978-981-10-3644-6.

Dias, D. A., Urban, S., e Roessner, U. (2012) 'A Historical overview of natural products in drug discovery', *Metabolites*, 2(2), pp. 303–336. doi: 10.3390/metabo2020303.

Dobrąnszki, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tábori, K., Jámbor-Benczúr, E., Bubán, T., Szalai, J., e Lazányi, J. (2000) 'In vitro shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinines and auxin.', *International Journal of Horticultural Science*, 6(1), pp. 36–39.

Dobrąnszki, J., Jámbor-Benczúr, E., Hudák, I., e Magyar-Tábori, K. (2005) 'Model experiments for establishment of in vitro culture by micrografting in apple', *International Journal of Horticultural Science*, (1), pp. 47–59.

- Dobránszki**, J., e da Silva, J. A. T. (2010) 'Micropropagation of apple - A review', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 28(4), pp. 462–488. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.008.
- Elliott**, R. F. (1972) 'Axenic culture of shoot apices of apple', *New Zealand Journal of Botany*, 10(2), pp. 254–258. doi: 10.1080/0028825X.1972.10429153.
- Ellis**, R. H., Hong, T. D., e Roberts, E. H. (1990) 'An intermediate category of seed storage behaviour?: I. Coffee', *Journal of Experimental Botany*, 41(9), pp. 1167–1174. doi: 10.1093/jxb/41.9.1167.
- Engelmann**, F., e Engels, J. M. M. (2002) 'Technologies and Strategies for *ex situ* Conservation', em *Managing Plant Genetic Diversity*, pp. 89–104.
- Engels**, J., Rao, V. R., Brown, A.H.D., e Jackson, M. (2001) 'Managing Plant Genetic Diversity', p. 512.
- Erig**, A. C., e Schuch, M. W. (2006) 'Ação da 6-Benzilaminopurina e da qualidade da luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh .) Cvs . Galaxy e Mastergala', *R. Bras. Agrociencia*, 12(2), pp. 151–155.
- FAO** (1996) *Report on the State of the World ' s Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*. Disponível em: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/meeting/015/aj633e.pdf>.
- Franchi**, G. G., Piotto, B., Nepi, M., Baskin, C. C., Baskin, J. M., e Pacini, E. (2011) 'Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival', *Journal of Experimental Botany*, 62(15), pp. 5267–5281. doi: 10.1093/jxb/err154.
- George**, E. F., e Davies, W. (2008) 'Effects of the Physical Environment', in George, E. F.; Michael, A.; Klerk, G.J. De (ed.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. 3rd edn. Springer, pp. 423–464.
- George**, E. F., e Klerk, G.J. (2008) 'The Components of Plant Tissue Culture Media I : Macro- and Micro-Nutrients', in George, E. F.; Hall, M. A.; Klerk, G. J. (ed.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. 3rd edn. Springer, pp. 65–114.
- Gepts**, P., Nelson, J., Qualset, C., e Shands, H. (2006) 'Plant Genetic Resources Conservation and Utilization', *Crop Science Society of America*, 46.5, pp. 2278–2292.
- GlobalAgriMar** (2013) *Ficha de internacionalização - Maçã*.
- GlobalAgriMar** (2016) *Ficha de internacionalização - Pêra*.
- GlobalAgriMar** (2018) *Informação sobre Produtos e Mercados*. Disponível em: <http://213.30.17.29/GlobalAgriMar/informacao/> (Acedido a: 10 Setembro 2018).
- Gommers**, C. M. (2018). The Healing Power of Light. *Plant physiology*, 178(1), 9-10.

- González-García**, S., Luo, L., Moreira, M. T., Feijoo, G., e Huppés, G. (2012) 'Life cycle assessment of hemp hurds use in second generation ethanol production', *Biomass and Bioenergy*, 36, pp. 268–279. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.10.041.
- GPP** (2018) *Missão, Valores e Visão*. Disponível em: <http://www.gpp.pt/index.php/quem-somos/missao-valores-e-visao> (Acedido a: 28 Julho 2018).
- Harris**, S. A., Robinson, J. P., e Juniper, B. E. (2002) 'Genetic clues to the origin of the apple', *Trends in Genetics*, 18(8), pp. 426–430. doi: 10.1016/S0168-9525(02)02689-6.
- Harrison**, P., e Pearce, F. (2000) *AAAS atlas of population & environment*. Univ of California Press.
- Hassan**, S. A. M., e Zayed, N. S. (2018) 'Factor Controlling Micropropagation of Fruit Trees : A Review', *Science International*, 6(1), pp. 1–10. doi: 10.17311/sciintl.2018.1.10.
- Helfrich**, S. (2018) *Espetro de absorção da clorofila a e clorofila b*. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chlorophyll_Absorption_Spectrum.svg (Acedido a: 21 Outubro 2018).
- Hurka**, H. (1994) 'Conservation genetics and the role of botanical gardens', *Conservation Genetics*, 68 (pp. 371-380). Birkhäuser, Basel.
- Husband**, B. C., e Campbell, L. G. (2004) 'Population responses to novel environments: implications for *ex situ* plant conservation', em *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Island Press, Washington, pp. 231–266.
- INIAV** (2016) *Sessão de Divulgação Projeto PRODER 18614*. Disponível em: <http://www.inia.pt/noticias/sessao-de-divulgacao-projeto-proder-18614>.
- International**, B. (2015) *A new era of plant genetic resource management for Portugal*. Disponível em: <https://www.biodiversityinternational.org/news/detail/a-new-era-of-plant-genetic-resource-management-for-portugal/> (Acedido a: 17 Julho 2018).
- Jones**, O. P. (1967) 'Effect of benzyl adenine on isolated apple shoots', *Nature*, 214, pp. 572–573. doi: 10.1038/216575a0.
- Jordan**, M., Meyer, W. B., Kates, R. W., Clark, W. C., Richards, J. F., Turner, B. L., e Mathews, J. T. (1990) *The earth as transformed by human action: global and regional changes in the biosphere over the past 300 years*. CUP Archive.
- Kadota**, M., e Niimi, Y. (2003) 'Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(3), pp. 261–265. doi: 10.1023/A:1022378511659.

- Kaushal**, N., Modgil, M., Thakur, M., e Sharma, D. R. (2005) 'In vitro clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds', *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(6), pp. 561–565.
- Kinghorn**, A. D., Pan, L., Fletcher, J. N., e Chai, H. (2011) 'The relevance of higher plants in lead compound discovery programs', *Journal of Natural Products*, 74(6), pp. 1539–1555. doi: 10.1021/np200391c.
- Langton**, F. A., e Cockshull, K. E. (1997) 'Is stem extension determined by DIF or by absolute day and night temperatures?', *Scientia Horticulturae*, 69(3–4), pp. 229–237. doi: 10.1016/S0304-4238(97)00020-4.
- Leduc**, N., Roman, H., Barbier, F., Péron, T., Huché-Thélier, L., Lothier, J., Demotes-Mainard, S., e Sakr, S. (2014). Light signaling in bud outgrowth and branching in plants. *Plants*, 3(2), 223-250.
- Leng**, P., Su, S., Wei, F., Yu, F., e Duan, Y. (2009) 'Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissue culture', *Acta Horticulturae*, 829, pp. 127–131.
- Machakova**, I., Zazimalova, E., e George, E.F. (2008) 'Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors', in George, E. F.; Michael A.; Klerk, G. J. De (ed.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. 3rd edn. Springer, pp. 175–204.
- McChesney**, J. D., Venkataraman, S. K., e Henri, J. T. (2007) 'Plant natural products: Back to the future or into extinction?', *Phytochemistry*, 68(14), pp. 2015–2022. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.032.
- Merck** (2018) *Fórmula estrutural de 6-benzilaminopurina*. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b3408?lang=pt®ion=PT> (Acedido a: 5 Setembro 2018).
- Ministério da Agricultura e do Mar** (2015) *Plano Nacional para os Recursos Genéticos Vegetais*.
- Modgil**, M., Sharma, D. R., e Bhardwaj, S. V. (1999) 'Micropropagation of apple cv. Tydemman Early Worcester', *Scientia Horticulturae*, 81(2), pp. 179–188.
- Moshkov**, I. E., Novikova, G.V., Hall, M.A., e George, E.F. (2008) 'Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds', em George, E. F.; Michael A.; Klerk, G. J. De (ed.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. 3rd edn. Springer, pp. 227–282.
- Murashige**, T., e Skoog, F. (1962) 'A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures', *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

- Murata**, M., Tsurutani, M., Hagiwara, S., e Homma, S. (1997) 'Subcellular location of polyphenol oxidase in apples', *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(9), pp. 1495–1499. doi: 10.1271/bbb.61.1495.
- Neumann**, K. H., Kumar, A., e Imani, J. (2009) *Plant cell and tissue culture-A tool in Biotechnology: Basics and Application*, Springer Science & Business Media.
- Norton**, C. R., Norton, M. E., e Herrington, T. (1987) 'Light quality and the control of shoot length in woody ornamental plants grown *in vitro*', *International Symposium on Vegetative Propagation of Woody Species 227* (pp. 453-456).
- Onay**, A., e Jetfree, C. E. (2000) 'Somatic embryogenesis in pistachio (*Pistacia Vera* L.)', em Jain, S. M., Gupta, P. K., e Newton, R. J. (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer, Dordrecht, pp. 361–390.
- Owen**, H. R., Wengerd, D., e Miller, A. R. (1991) 'Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method', *Plant Cell Reports*, 10(11), pp. 583–586. doi: 10.1007/BF00232516.
- Pan**, M. J., e van Staden, J. (2000) 'The use of charcoal in in vitro culture.pdf', *Plant Growth Regulation*, 26(3), pp. 155–163.
- Patidar**, R. K., Sen, D., Singh, K. M., e Shakywar, R. C. (2013) 'Biotechnological Tools for Conservation of Bioresources', *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology*, 7(6(2)), p. 223.
- Perales**, H., Brush, S. B., e Qualset, C. O. (2003) 'Dynamic Management Of Maize Landraces in Central Mexico', *Economic Botany*, 57(1) 21.
- Pérez-Tornero**, O., e Burgos, L. (2007) 'Apricot micropropagation', em Jain, S. M. e Häggman, H. (eds) *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Springer, Dordrecht, pp. 267–278.
- Piperno**, D., e Pearsall, D. (1998) 'The origin of agriculture in the neotropics'.
- Prade**, T., Svensson, S. E., Andersson, A., e Mattsson, J. E. (2011) 'Biomass and energy yield of industrial hemp grown for biogas and solid fuel', *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 35(7), pp. 3040–3049. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.04.006.
- Prade**, T., Svensson, S. E., e Mattsson, J. E. 2012) 'Energy balances for biogas and solid biofuel production from industrial hemp', *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 40, pp. 36–52. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.01.045.
- Preece**, J. E., e Read, P. E. (2003) 'Novel Methods in Micropropagation', *Acta Horticulturae*, 616, pp. 71–76.

- Ragit**, S. S., Mohapatra, S. K., Gill, P., e Kundu, K. (2012) 'Brown hemp methyl ester: Transesterification process and evaluation of fuel properties', *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 41(158), pp. 14–20. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.12.026.
- Ramya**, A. R., Rajesh, V., Jyothi, P., e Swathi, G. (2014) 'A Review on *in situ* and *ex situ* Conservation Strategies for Crop Germplasm', 5(1), pp. 267–273.
- Rao**, N. K. (2004) 'Plant genetic resources : Advancing conservation and use through biotechnology', *African Journal of Biotechnology*, 3(February), pp. 136–145.
- Reed**, B. M., DeNoma, J., Wada, S., e Postman, J. (2013) 'Micropropagation of Pear (*Pyrus sp.*)', em Lambardi, M., Ozudogru, E. A., e Jain, S. M. (eds) *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*. Humana Press, pp. 3–18. doi: 10.1007/978-1-62703-074-8.
- Río Leal**, D., Sánchez-Olate, M., Avilés, F., Materan, M. E., Uribe, M., Hasbún, R., e Rodríguez, R. (2007) 'Micropropagation of *Juglans regia* L.', em Jain, S. e Häggman, H. (eds) *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Springer, Dordrecht, pp. 381–90.
- Robbins**, W. J. (1922) 'Cultivation of Excised Root Tips and Stem Tips Under Sterile Conditions', *Botanical Gazette*, 73(5), pp. 376–390.
- Salentijn**, E. M., Zhang, Q., Amaducci, S., Yang, M., e Trindade, L. M. (2015) 'New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding', *Industrial Crops and Products*. Elsevier B.V., 68, pp. 32–41. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.08.011.
- Santos**, M. D. C., Lédo, A. D. S., Lédo, C. A. D. S., Souza, F. V. D., e Junior, J. F. D. S. (2011). Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. *Revista Ciência Agronômica*, 42(3).
- Schoen**, D. J., e Brown, A. H. (2001) 'The Conservation of Wild Plant Species in Seed Banks: Attention to both taxonomic coverage and population biology will improve the role of seed banks as conservation tools', *BioScience*, 51(11), pp. 960-066. doi: 10.1641/0006-3568(2001)051[0960:TCOWPS]2.0.CO;2.
- Sedlak**, J., e Paprstein, F. (2017) 'Development of tissue culture system for pear cultivars', *Acta Horticulturae*, (1155), pp. 157–160. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1155.21.
- Seed Biotechnology Center** (2015) *Germplasm*. Disponível em: http://sbc.ucdavis.edu/About_US/Seed_Biotechnologies/Germplasm/. (Acedido a: 24 Agosto 2018).
- Shulaev**, V., Korban, S. S., Sosinski, B., Abbott, A. G., Aldwinckle, H. S., Folta, K. M., Lewers, K., Brown, S. K., Davis, T. M., Gardiner, S. E., Potter, D., e Veilleux, R. E. (2008) 'Multiple Models for Rosaceae Genomics', *Plant Physiology*, 147(3), pp. 985–1003. doi: 10.1104/pp.107.115618.

- Skoog**, F., Strong, F. M., e Miller, C. O. (1965) 'Cytokinins', *Science*, 148(November), pp. 532–533.
- Sundqvist**, C., Björn, L. O., e Virgin, H. I. (1980) 'Factors in chloroplast differentiation', em *Chloroplasts*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 201–224.
- Taiz**, L., Zeiger, E., Møller, I. M., e Murphy, A. (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6ª, Artmed. 6ª. artmed.
- Thorpe**, T., Stasolla, C., Yeung, E. C., de Klerk, G. J., Roberts, A., e George, E. F. (2008) 'The Components of Plant Tissue Culture Media II : Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems', em George, E. F.; Michael A.; Klerk, G. J. De (ed.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. 3rd edn. Springer, pp. 115–174.
- Thorpe**, T. A. (2007) 'History of plant tissue culture', *Molecular Biotechnology*, 37(2), pp. 169–180. doi: 10.1007/s12033-007-0031-3.
- van Staden**, J., Zazimalova, E., e George, E.F. (2008) 'Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists', em George, E. F.; Michael A.; Klerk, G. J. De (ed.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. 3rd edn. Springer, pp. 205–226.
- Varela**, M. C. (2009) *Management of forest genetic resources in Portugal, European Forest Genetic Resources Programme*. Disponível em: <http://www.euforgen.org/member-countries/portugal/> (Acedido a: 14 Julho 2018).
- Veeriah**, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., e Pool-Zobel, B. L. (2006) 'Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics', *Molecular Carcinogenesis*, 45(3), pp. 164–174. doi: 10.1002/mc.20158.
- Vega-Celedón**, P., Canchignia Martínez, H., González, M., e Seeger, M. (2016) 'Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias' *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.
- Volis**, S., e Blecher, M. (2010) 'Quasi *in situ*. A bridge between *ex situ* and *in situ* conservation of plants', *Biodiversity and Conservation*, 19(9), pp. 2441–2454. doi: 10.1007/s10531-010-9849-2.
- Walkey**, D. G. (1972) 'Production of apple plantlets from axillary-bud meristems', *Canadian Journal of Plant Science*, 52(6), pp. 1085–1087.
- Webster**, C. A., e Jones, O. P. (1991) 'Micropropagation of some cold-hardy dwarfing rootstocks for apple', *Journal of horticultural science*, 66(1), pp. 1–6.
- Withers**, L. A., e Engelmann, F. (1997) '*In vitro* conservation of plant genetic resources', in *Agricultural biotechnology*. CRC Press., pp. 75–106.

World Intellectual Property Organization (2017) *Genetic resources*. Disponível em: <http://www.wipo.int/tk/en/genetic/> (Acedido a: 15 Maio 2018).

Wu, J., Wang, Z., Shi, Z., Zhang, S., Ming, R., Zhu, S., Khan, M. A., Tao, S., Korban, S. S., Wang, H., Chen, N. J., Nishio, T., Xu, X., Cong, L., Qi, K., Huang, X., Wang, Y., Zhao, X., Wu, J., Deng, C., Gou, C., Zhou, W., Yin, H., Qin, G., Sha, Y., Tao, Y., Chen, H., Yang, Y., Song, Y., Zhan, D., Wang, J., Li, L., Dai, M., Gu, C., Wang, Y., Shi, D., Wang, X., Zhang, H., Zeng, L., Zheng, D., Wang, C., Chen, M., Wang, G., Xie, L., Sovero, V., Sha, S., Huang, W., Zhang, S., Zhang, M., Sun, J., Xu, L., Li, Y., Liu, X., Li, O., Shen, J., Wang, J., Paull, R. E., Bennetzen, J. L., Wang, J., e Zhang, S. (2013) 'The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.)', *Genome Research*, 23(2), pp. 396–408. doi: 10.1101/gr.144311.112.

Yi, J., Lee, G., Chung, J., Lee, Y., Gwag, J., e Lee, S. (2015) 'Efficient Micropropagation of Pear Germplasm Using Soot Tips and Nodal Explants', *Korean Journal Plant Resources*, 28(6), pp. 690–696.

York, R., Rosa, E. A., e Dietz, T. (2003) 'Footprints on the Earth : the environmental consequences', *American Sociological Review*, 68(2), pp. 279–300.

Zizumbo-Villarreal, D., Colunga-GarcíaMarín, P., de la Cruz, E. P., Delgado-Valerio, P., e Gepts, P. (2005) 'Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy-domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region', *Crop Science*, 45(3), pp. 1073–1083. doi: 10.2135/cropsci2004.0304.

ANEXO I – PROTOCOLO BPGV: ESTABELECIMENTO DE *MALUS DOMESTICA* L.

Os ápices caulinares com cerca de 1 mm foram isolados e colocados individualmente nos tubos com 10 ml de meio. O meio de estabelecimento é constituído por meio MS, fonte de carbono sacarose, diversas hormonas, entre outros como indica a tabela 3.

Tabela 3 - Constituintes do meio de estabelecimento de *Malus domestica* L. formulado no BPGV.

Fonte de carbono	Sacarose
Meio	MS
Vitaminas	Mio-inositol
Hormonas	BAP
	IBA
	GA
Agentes antioxidantes	Ácido ascórbico
	Carvão ativo
Agente solidificante	Agar

ANEXO II – PROTOCOLO BPGV: MULTIPLICAÇÃO DE *MALUS DOMESTICA* L.

As plântulas obtidas no ensaio de estabelecimento, foram transferidas para o meio de em frascos com 50 ml de meio. O meio de multiplicação é constituído por meio MS, fonte de carbono sacarose e as hormonas BAP e IBA como indica a tabela 4.

Tabela 4 – Constituintes do meio de multiplicação de *Malus domestica* L. formulado no BPGV.

Fonte de carbono	Sacarose
Meio	MS
Hormonas	BAP (0,1 mg/L)
	IBA

ANEXO III – PROTOCOLO BPGV: MULTIPLICAÇÃO DE *PYRUS COMMUNIS* L.

As plântulas obtidas após o ensaio de estabelecimento foram transferidas para o meio de multiplicação em frascos com 50 ml de meio. O meio de multiplicação é constituído pela fonte de carbono glucose, diversas hormonas, vitaminas e soluções *stock* como indica a tabela 5.

Tabela 5 – Constituintes do meio de multiplicação de *Pyrus communis* L. formulado no BPGV.

Fonte de carbono	Glucose
Hormonas	BAP
	IBA
Vitaminas	Vitamina B1
	Inositol
	Ácido nicotínico
	Glicina
Solução <i>stock</i> I	Nitrato de amónio
	Fosfato monopotássico
	Cloreto de cálcio dihidratado
	Nitrato de cálcio tetrahidratado
	Sulfato de potássio (isolado)
Solução <i>stock</i> II	Sulfato de magnésio heptahidratado
Solução <i>stock</i> III	Quelato de ferro EDTA
Solução <i>stock</i> IV	Sulfato de manganês tetrahidratado
	Sulfato de zinco heptahidratado
	Ácido bórico
	Sulfato de cobre pentahidratado
	Molibdato de sódio dihidratado
Agente solidificante	Agar

ANEXO IV – INTENSIDADES DAS CINCO QUALIDADES DE LUZ

Para os procedimentos de proliferação em *Malus domestica* L. e *Pyrus communis* L., foram medidas com um radiômetro as intensidades das cinco diferentes qualidades de luz aplicadas. Dentro da câmara de crescimento foram medidas, para cada qualidade de luz, os valores das intensidades em vários pontos e calculada posteriormente uma média desses valores (Tabela 6).

Tabela 6 - Intensidades das cinco diferentes qualidades de luz aplicadas em procedimentos de proliferação em *Malus domestica* L. e *Pyrus communis* L., medidas com um radiômetro.

Qualidade de luz	Intensidade ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Branca	34,11
Amarela	19,14
Verde	14,13
Vermelha	7,73
Azul	9,78