



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Patrícia Neves Puga

**DESENVOLVIMENTO DE BIORREACTORES PARA
A PROPAGAÇÃO DE *SOLANUM BETACEUM* CAV.**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal,
orientada pela Doutora Sandra Isabel Marques Correia e Professor Doutor Jorge Manuel
Pataca Leal Canhoto e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade
de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro 2019

“So plant your own gardens and decorate your soul,
Instead of waiting for someone to bring you flowers”

Jorge Luís Borges

Project “RENATURE- Valorization of the Natural Endogenous Resources of the Centro Region” (CENTRO-01-0145-FEDER-000007). Funded by the Comissão de Coordenação da Região Centro (CCDR-C) and subsidized by the European Regional Development Found (FEDER).

Projeto PTDC/BAA-AGR/32265/2017: “Tamarillo breeding: better plants for better products”. (projeto nº 032265 no âmbito do Aviso de concurso nº 02/SAICT/2017).



AGRADECIMENTOS

No final desta etapa não podia deixar de agradecer a todas as pessoas que me acompanharam e que de certa forma contribuíram para que tudo isto fosse possível. Por todos os votos de confiança, por todo o incentivo, por toda a garra e força que me deram ao longo desta caminhada que chegou ao fim... Estar-vos-ei eternamente grata!

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores por todo o conhecimento transmitido, pela oportunidade, pelo apoio, incentivo e disponibilidade durante este percurso.

À Doutora Sandra Correia, pela ajuda e acompanhamento incansável, por toda a paciência, motivação, simpatia e amizade com que me acompanhou ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge Canhoto, por todo o apoio, calma e boa disposição demonstrada.

Ao Doutor Clayton Debiasi e ao Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior pela colaboração e disponibilidade.

Ao *Team Tamarilho*: à Tércia, à Mariana, à Joana e ao Miguel, pela ajuda e disponibilidade incondicional, pelo companheirismo e trabalho de equipa, pela amizade, por todos os momentos bons e pelos momentos mais complicados, por todas as gargalhadas e boa disposição, pelos desabafos e pelo convívio.

À Elsita por todos os conselhos, pelas longas conversas à hora de almoço e por todo incentivo.

A todos os colegas de laboratório, ao João, à Daniela, à Jéssica, ao Mário, à Cátia, à Mariana, à Inês, ao Renato e ao André, pelo apoio.

E por último, mas não menos importante, aos meus pais, à minha irmã e à avó Tina. Sem vocês isto não seria possível. Por todo o amor, suporte e incentivo. Pela perseverança, por todos os valores que me transmitiram e por estarem sempre presentes.

ÍNDICE

Resumo.....	xv
Abstract	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais.....	3
1.2. Tamarilho (<i>Solanum betaceum</i> Cav.)	4
1.2.1. Caracterização, distribuição e relevância económica	4
1.3. Propagação e cultura <i>in vitro</i>	7
1.3.1. Proliferação de meristemas.....	8
1.3.2. Embriogénese somática.....	9
1.3.3. Organogénese	11
1.4. Biorreatores de propagação de plantas.....	12
1.4.1. Biorreatores de imersão temporária	14
1.5. Objetivos do trabalho	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. Material Vegetal.....	21
2.2. Métodos.....	22
2.2.1. Germinação de sementes <i>in vitro</i>	22
2.2.2. Micropropagação de ápices meristemáticos e segmentos nodais	22
2.2.3. Indução de organogénese	23
2.2.4. Proliferação de calo embriogénico em sistemas de imersão permanente	26
2.2.5. Proliferação de rebentos em biorreator de imersão temporária	28
2.2.6. Avaliação de parâmetros morfológicos e biomassa das plantas aclimatizadas	31
2.2.7. Avaliação da resposta fisiológica das plantas aclimatizadas	31
2.2.7.1. Avaliação das trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	31
2.2.8. Análise estatística	32

3. RESULTADOS	33
3.1. Organogénese	35
3.1.1. Otimização das condições de indução.....	35
3.1.2. Alongamento e enraizamento dos rebentos e aclimatização das plantas provenientes de organogénese	39
3.2. Proliferação de calo embriogénico em sistemas de imersão permanente	42
3.3. Proliferação de rebentos em biorreator de imersão temporária.....	45
3.3.1. Enraizamento dos rebentos e aclimatização das plantas provenientes dos biorreatores de imersão temporária.....	47
3.4. Parâmetros de crescimento e estado fisiológico das plantas aclimatizadas provenientes de organogénese e biorreatores de imersão temporária.....	49
4. DISCUSSÃO	57
4.1. Organogénese	59
4.1.1. Otimização das condições de indução.....	59
4.2. Proliferação de calo embriogénico	63
4.3. Multiplicação de rebentos axilares em biorreator de imersão temporária	64
4.4. Parâmetros de crescimento e estado hídrico das plantas aclimatizadas.....	67
5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição geográfica de <i>Solanum betaceum</i>	5
Figura 2- <i>S. betaceum</i> Cav. – (A) Árvore adulta de tamarilho; (B) Flores em diferentes estados de desenvolvimento. (C) Frutos maduros; (D) Interior de um fruto maduro, com a polpa e as sementes visíveis.	7
Figura 3- Esquema ilustrativo de um biorreator do tipo SETIS™ .Fase 1: Estacionária; Fase 2: Fase de imersão; Fase 3: Fim da imersão; Fase 4: Fase de ventilação	15
Figura 4- Processo de proliferação de CE em meio sólido e líquido, formação de embriões e plântulas.....	27
Figura 5- Biorreator de imersão temporária (A) - Componentes do SETIS™; (B) – Biorreatores com o material vegetal acondicionado em sala de cultura	29
Figura 6- Métodos de micropropagação de tamarilho: (A) Proliferação de meristemas axilares; (B) Organogénese; (C) Embriogénese somática.....	30
Figura 7- Resposta dos segmentos do limbo e pecíolos de tamarilho nos diferentes meios após diferentes períodos de cultura - 4 e 8 semanas	37
Figura 8- Ensaios de organogénese em multiwell, com meios de indução: 1, 2 e 3 mg/L de BA. A) Discos foliares; B) Resposta organogénica após 8 semanas de cultura	38
Figura 9- Raízes adventícias formadas no meio CB6. (A) Início da formação da raiz; (B) Raízes densenvolvidas, apos 4 semanas de cultura.	39
Figura 10- Enraizamento <i>in vitro</i> de rebentos de tamarilho vermelho provenientes de diferentes meios de indução de organogénese.....	41
Figura 11- Explantes do limbo com 4 semanas de indução em meio de alongamento celular e em condições de imersão permanente.	41
Figura 12- Diferentes estádios de aclimatização das plantas provenientes do processo de organogénese. (A) Após 2 semanas; (B) Após 4 semanas; (C) Após 6 semanas de aclimatização.....	42
Figura 13- Proliferação de calo embriogénico em meio sólido e líquido com o respetivo incremento em mg ao fim de 3 e 6 semanas de cultura.	43
Figura 14- Embriogénese somática. A) Proliferação de CE em meio líquido; B) Embrião resultante da proliferação de CE em meio líquido; C) Formação de plântulas.	44
Figura 15- Embriogénese somática. A) Número de embriões; B) Número de plântulas formadas a partir de calo em meio líquido e em meio sólido de proliferação.	44
Figura 16- Segmentos resultantes de biorreator de imersão temporária (A e B), após 4 semanas de cultura. Nos rebentos do biorreator B observaram-se raízes.	46

Figura 17- Tamanho médio dos segmentos provenientes dos dois biorreatores (A e B), com composições diferentes do meio de cultura.....	46
Figura 18- Comportamento dos segmentos de tamarilho em biorreator de imersão temporária ao longo do tempo. (A) 1 semana de cultura; (B) 3 semanas; (C) 4 semanas.	47
Figura 19- Aclimatização de plantas de tamarilho provenientes de biorreator de imersão temporária (Bioreator A e B) e desenvolvimento radicular correspondente.....	48
Figura 20- Plantas representativas dos diferentes tratamentos em estudo e raízes correspondentes, após a fase de aclimatização. Destaque da parte aérea e radicular.	51
Figura 21- Parâmetros de crescimento e desenvolvimento e estado hídrico das plantas aclimatizadas.	52
Figura 22- Parâmetros fotossintéticos registados nas plantas provenientes de organogênese e dos biorreatores. A) Conteúdo intracelular de CO ₂ (ci); B) Taxa de transpiração (E); C) Condutância estomática (gs); D) Assimilação de CO ₂ (A); E) Intrinsic water use efficiency.....	54
Figura 23- Parâmetros de fluorescência da clorofila. A) Rendimento quântico do fotossistema II (PSII); B) Eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético	m: Metro
μM: Micromolar	mg/L: Miligrama por litro
A: Assimilação de CO ₂	min: Minuto
BA: 6-Benzilaminopurina	ml: Mililitro
BIT: Biorreator de imersão temporária	mm: Milímetro
Cal: Calorias	MS: Murashige and Skoog (1962)-
CE: Calo embriogénico	Meio base
Ci: Conteúdo intracelular de CO ₂	mT: metatopolina
cm: Centímetro	NAA: ácido 1-naftilacético
E: Taxa de transpiração	PGRs: Plant Growth Regulators
ES: Embriogénese somática	s: Segundo
g/l: Grama por litro	TDZ: Thidiazurão
g: Grama	TG: Meio de germinação
Gs: Condutância estomática	TM: Meio de maturação
h: Hora	WUEi: Eficiência intrínseca do uso de
H ₂ O: Água	água
IBA: Ácido 3-indol butírico	Zea: Zeatina
kg: Quilograma	

RESUMO

O tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.) é uma espécie arbórea subtropical de pequeno porte, pertencente à família Solanaceae, com interesse agronómico crescente devido aos seus frutos comestíveis e nutritivos. Diversos protocolos de propagação *in vitro* de tamarilho foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra, e a micropropagação através da proliferação de meristemas axilares, organogénese e embriogénese somática têm sido eficientemente utilizada no estabelecimento e multiplicação de vários genótipos. No entanto, uma procura crescente de plantas de tamarilho requer uma otimização dos métodos de propagação existentes e de sistemas mais eficazes que permitam a clonagem em larga escala. Os biorreatores são utilizados para a produção clonal de plantas a partir de culturas de células ou tecidos, assegurando ótimas condições de crescimento e grandes rendimentos de produção.

Um dos objetivos do presente trabalho foi otimizar a proliferação de meristemas axilares de tamarilho, utilizando biorreatores de imersão temporária (SETIS™). Essa proliferação foi testada em meio MS suplementado com duas concentrações de BA (0,5 e 1,0 mg/L). A fase de imersão ocorreu por períodos de 3 minutos a cada 3 horas, e o alongamento (≈ 5 cm) foi observado nas duas condições testadas. As plantas foram transferidas do biorreator diretamente para o substrato, uma mistura de terra:perlite (2:1,v/v). O enraizamento *ex vitro* foi mais rápido e mais efetivo nas plantas obtidas com 1,0 mg/L de BA, com 92% de sobrevivência na fase de aclimatização. Embora seja necessário testar mais condições (por exemplo, períodos de aeração, diferentes PGRs), os resultados obtidos até agora confirmam a eficácia desta tecnologia para uma produção em escala de tamarilho. Avaliou-se ainda a morfologia e fisiologia das plantas aclimatizadas e na análise dos parâmetros fotossintéticos, as plantas obtidas em biorreator (com 0,5 mg/L de BA) destacaram-se com valores superiores de taxas de transpiração, conteúdo intracelular de CO₂, condutância estomática e eficiência intrínseca do uso de água.

Foram testados também meios de indução organogénese. O limbo foliar mostrou ser o melhor explante para a formação de rebentos axilares comparativamente com os pecíolos, num meio de cultura suplementado com 2,0 mg/L de BA.

Na proliferação de calo embriogénico em meio sólido e líquido, verificaram-se diferenças significativas nos dois meios, sendo que no meio líquido observou-se maior proliferação de calo, bem como o número de embriões e plântulas formados.

PALAVRAS-CHAVE: organogénese, micropropagação, proliferação de rebentos axilares, SETIS™, tamarilho.

ABSTRACT

Tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) is a small subtropical arboreal species belonging to the Solanaceae family, with increasing agronomic interest due to its nutritious edible fruits. Several protocols of *in vitro* propagation of tamarillo were developed in the laboratory of Plant Biotechnology of the University of Coimbra, and the micropropagation through the proliferation of axillary meristems, organogenesis and somatic embryogenesis have been efficiently used in the establishment and multiplication of several genotypes. However, growing demand for tamarillo plants requires an optimization of existing propagation methods and scale systems that allow large-scale cloning. Bioreactors are used for the clonal production of plants from cell cultures or tissue, ensuring optimum growth conditions and allowing large production yields.

One of the objectives of this work was to optimize the proliferation of axillary tamarillo meristems using temporary immersion bioreactors (SETIS™). This proliferation was tested in MS medium supplemented with 2 different BA concentrations (0.5 and 1.0 mg/L). The immersion phase occurred for periods of 3 minutes every 3 hours, and shoot elongation (≈ 5 cm) was observed in the 2 conditions tested. The plants were transferred from the bioreactor directly to the substrate (a mixture of soil: perlite 2:1). The *ex vitro* rooting was faster and more effective in the plants obtained with 1.0 mg/L of BA, with 92% of survival in the acclimatization phase. Although more conditions need to be tested (e.g. aeration periods, different PGRs), the results obtained so far confirm the effectiveness of this technology for a tamarillo scale production. The morphology and physiology of acclimatized plants was also evaluated and in the analysis of photosynthetic parameters, the plants from the bioreactor (with 0.5 mg/L of BA) stood out with higher values of transpiration rate, intracellular content of CO₂, stomatal conductance and Intrinsic water use efficiency.

Organogenesis induction means were also tested. The leaves showed to be the best explant for the formation of axillary shoots compared to the petioles, in a culture medium supplemented with 2 mg/L of BA.

In the proliferation of embryogenic callus in solid and liquid medium, significant differences were observed in the two systems, with the liquid medium showing a greater proliferation of callus, as well as a higher number of embryos and seedlings.

KEYWORDS: axillary shoot proliferation, organogenesis, micropropagation, SETIS™, tamarillo

1. INTRODUÇÃO



1.1. Considerações gerais

Desde o seu aparecimento, a agricultura foi uma atividade absolutamente necessária para a sobrevivência humana, sustentando o desenvolvimento das populações através do fornecimento de comida, roupas, aquecimento e emprego para uma grande parte da população ativa (Federico, 2005).

Contudo ao longo da História da Humanidade apenas uma pequena percentagem de plantas tem sido usada para alimentação, sendo que metade da nossa alimentação deriva de espécies da família Poaceae (cereais) (Borlaug e Dowsell, 2003). No contexto atual, num cenário de alterações climáticas globais, em que ocorre um aumento contínuo da população, diversos fatores têm contribuído para o aumento do número de pessoas sem acesso a alimentos, salientando a diminuição da área de solos agrícolas, causada pela pressão antropogénica ou pela exaustão dos solos (Lopes *et al.*, 2000). Outro aspeto que limita o acesso a uma alimentação equilibrada é a grande densidade populacional em alguns países, que ainda utilizam métodos convencionais na agricultura, o que posteriormente se revela insuficiente para produzir o necessário para acompanhar o aumento populacional (Canhoto, 2010). Devido a estes fatores, intensificam-se as preocupações relacionadas com as necessidades alimentares da espécie humana e o facto de os métodos de melhoramento convencionais poderem não suportar e não responder a este aumento requerido de bens alimentares (Irninger, 2003).

Perante esta realidade, torna-se prioritário apostar e investir em tecnologias que promovam uma maior eficácia das produções agrícolas, permitindo a criação não só de variedades mais produtivas e mais resistentes a fatores bióticos e abióticos (Canhoto, 2010; Chrispeels e Gepts, 2018), mas também de processos inovadores que contribuam para o aumento dessa mesma eficiência. É neste contexto que surge a Biotecnologia de Plantas, que no sentido mais lato pode ser definida como sendo um conjunto de tecnologias e ferramentas que permitem modificar ou utilizar organismos para a obtenção de novos produtos e pode ser utilizada para potenciar a atividade agrícola.

O trabalho apresentado nesta dissertação, surge assim num contexto em que o reforço do setor biotecnológico é apontado como um dos pilares do desenvolvimento sustentável, e tendo como principal objetivo desenvolver e implementar sistemas de propagação de plantas de tamarilho numa escala que permita a sua produção em biorreatores vegetais. O desenvolvimento deste tipo de processos consiste numa estratégia importante para o aumento da capacidade de produção de uma planta, cuja procura pelos produtores nacionais tem vindo a aumentar. Como tal, e partindo da experiência do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Coimbra em métodos de propagação de tamarilho, procurou-se otimizar esses mesmos métodos no sentido de uma produção em maior escala, tendo para isso a importante colaboração do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (Castelo Branco, Portugal).

1.2. Tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.)

1.2.1. Caracterização, distribuição e relevância económica

Solanum betaceum Cav. (sin. *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) é uma solanácea vulgarmente designada por tamarilho, “tamarillo”, “tree tomato” ou “tomate de la paz” (Bois, 1927). Esta espécie foi descrita pela primeira vez em 1801 por Cavanilles (Guimarães *et al.*, 1996), no entanto a designação tamarilho surgiu em 1967 na Nova Zelândia, devido ao aumento da produção e consumo deste fruto (Morton, 1987) e à necessidade de dar um nome comercialmente apelativo, que permitisse a distinção do tomate vulgar, *Solanum lycopersicum*, pertencente à mesma família.

O tamarilho, cultivado maioritariamente em climas subtropicais, é originário da região dos Andes, mais especificamente da Bolívia, Chile, Equador e Peru (Dawes e Pringle, 1983), onde cresce entre 1100 a 2300 m de altitude. Rapidamente espalhou-se para a Índia Central e Ocidental, depois para as ilhas atlânticas portuguesas da Madeira e dos Açores e para o sul da Europa, alcançando a Oceânia no final do século XIX (Hooker, 1899; Atkinson e Gardner, 1993).

Atualmente é cultivado em várias partes do mundo (Fig.1) e em escala comercial na Califórnia, Equador, Colômbia, Austrália e Nova Zelândia (Dawes e Pringle 1983; Prohens e Nuez 2001; Correia e Canhoto 2012). A sua cultura é bastante promissora noutras regiões do mundo, nomeadamente em países mediterrânicos tais como Espanha, Itália (Acosta-Quezada *et al.*, 2011) e Portugal (ilha da Madeira).



Figura 1- Distribuição geográfica de *S. betaceum*. Encontra-se assinalados os países de origem e principais produtores.

O tamarilho é uma espécie adaptável que não requer condições muito exigentes de cultura. Em condições de produção, o seu ciclo produtivo é de cerca de 8 anos, iniciando-se a produção no segundo ano de cultura (Meadows, 2002). No entanto existem algumas limitações ao seu cultivo, como a baixa tolerância à geada e a sensibilidade a temperaturas elevadas, a secas prolongadas e a solos inundados, devido ao seu sistema radicular superficial (Lopes *et al.*, 2000).

Relativamente à morfologia, trata-se de um arbusto subtropical, semi-lenhoso e de crescimento rápido, que pode atingir os 5 metros de altura (Canhoto *et al.*, 2005). As folhas são grandes e verdes, alternas, ovadas, pontiagudas no ápice e ligeiramente pubescentes (Guimarães *et al.*, 1996; Fig. 2A).

É uma planta hermafrodita cujas flores surgem de meristemas inflorescenciais axilares e apresentam uma cor rosa-esbranquiçada. A floração em Portugal ocorre desde meados da Primavera até meados do Verão (Correia *et al.*, 2011; Fig. 2B). A polinização é geralmente autogâmica, o que pode explicar a reduzida variabilidade genética encontrada em populações naturais desta espécie (Barghchi, 1986). Os frutos são lisos, pendentes na planta por um longo pedúnculo e caracterizados pela sua forma oval, com 5-10 cm de comprimento e 3-5 cm de largura (Hooker, 1899; Correia e Canhoto, 2012), podendo aparecer isolados ou em grupos de 3 a 12 unidades, atingindo a maturidade entre Outubro e Abril (Fig. 2C). Podem apresentar-se de cor vermelha, laranja ou amarela, dependendo dos pigmentos que se acumulam na polpa e no epicarpo. Este é espesso, rígido e tem um sabor desagradável, por sua vez o mesocarpo é mais suave e succulento. A polpa (endocarpo) é sumarenta, macia, com um sabor agridoce e as sementes são arredondadas (Correia, 2011; Fig. 2D).

Uma árvore tem capacidade de produzir anualmente 15-20 kg de fruto, durante 6-10 anos (Duarte e Alvarado, 1977). O principal interesse comercial do tamarilho reside precisamente nos frutos, que podem ser consumidos em fresco, em sumos, compotas ou outros produtos processados, graças à sua riqueza em pectina (Bohs, 1991; Duke e du Cellier, 1993).

Em algumas zonas do globo esta planta é usada na medicina popular. Por exemplo, na Jamaica e na Bolívia, utiliza-se no combate das infeções do fígado, na Colômbia e no Equador é aplicada no tratamento de inflamações das amígdalas ou anginas, bem como para combater a gripe (Quiroga, 2008). O tamarilho é também considerado um fruto com potencialidades estimulantes da atividade cerebral, na cura de enxaquecas e dores de cabeça, obesidade, hipertensão e rinites (Gatita e Almeida, 2003).

O fruto do tamarilho possui um conteúdo relativamente elevado de proteína (1,5-2 g/100 g de peso fresco), vitaminas (B6, C, E e provitamina A) e minerais, o que o torna um recurso alimentar valioso em termos nutricionais (Holland *et al.*, 1992). Para além disto, o teor em hidratos de carbono é bastante reduzido (7,7 g/100 g), assim como o seu valor calórico (cerca de 28 cal/100 g) (McCane e Widdowson, 1992). Também têm sido estudados os componentes bioativos presentes, que apresentam propriedades antioxidantes terapêuticas e preventivas importantes, (Hurtado *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2013), o que enriquece e torna este fruto uma fonte de alimento que merece uma melhor exploração.



Figura 2- *Solanum betaceum* Cav. (A) Árvore adulta de tamarilho; (B) Flores em diferentes estados de desenvolvimento; (C) Frutos maduros; (D) Interior de um fruto maduro, com a polpa e as sementes visíveis.

1.3. Propagação e cultura *in vitro*

A propagação dos cultivares de tamarilho é tradicionalmente feita por sementes, estacas ou enxertia (Prohens e Nuez, 2001). Todavia, estes métodos tradicionais de melhoramento, nomeadamente a propagação através de sementes, não é adequada quando se pretende manter as características genéticas ao longo das gerações (Pringle e Murray, 1991; Canhoto *et al.*, 2005). Para que tal se verifique, são usados os métodos de propagação assexual, como a estacaria. No entanto, os problemas fitossanitários, a suscetibilidade ao míldio, nematoides e alguns vírus (Mossop, 1977), assim como o efeito das baixas temperaturas (inferiores a 10 °C) são preocupações da produção em larga escala, através destas técnicas de propagação vegetativa convencionais.

Assim, a clonagem *in vitro* e a transformação genética surgem como ferramentas biotecnológicas extremamente úteis para o melhoramento de plantas como o tamarilho (Correia e Canhoto, 2012).

A propagação *in vitro* apresenta-se como um dos métodos com maior potencial e o que providencia uma produção rápida de plantas, geneticamente uniformes com excelente qualidade fitossanitária (Aslam *et al.*, 2011). As culturas estabelecidas apresentam maior vigor, rendimentos mais elevados (Gahakwa *et al.*, 2013) e uma qualidade fitossanitária superior, face à propagação convencional (Canhoto, 2010).

As metodologias de micropropagação possíveis de utilizar na multiplicação do tamarilho são divididas em três tipos diferentes, de acordo com o material inicial e com a resposta obtida: proliferação de meristemas axilares (Cohen e Elliot, 1979; Barghchi, 1998; Obando *et al.*, 1992), organogénese em explantes do limbo (Obando *et al.*, 1992) e a indução da embriogénese somática (ES) (Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2009, 2011; Correia e Canhoto, 2018) que foi descrita pela primeira vez nos finais dos anos 80 (Guimarães *et al.*, 1988).

1.3.1. Proliferação de meristemas

A cultura de meristemas caulinares isolados ou inseridos em ápices ou segmentos nodais é o tipo mais simples de micropropagação, uma vez que não se baseia na indução de novos meristemas, mas sim no desenvolvimento dos já existentes no explante (Jha e Ghosh, 2005; George, 2008; Canhoto, 2010).

Muitos dos meristemas caulinares (axilares) encontram-se em estado dormente nas plantas, mas em contacto com um meio adequado e livres da ação inibitória do meristema apical do caule, esse estado de dormência é quebrado e o seu desenvolvimento é promovido, formando-se um rebento caulinar com novos fitómeros, que podem ser novamente cultivados e utilizados em novos ciclos de multiplicação (Canhoto, 2010).

Para além da multiplicação em larga escala, a propagação de meristemas pode ser usada com outras finalidades, como estudos fundamentais do funcionamento do meristema, a conservação de germoplasma, a obtenção de plantas livres de vírus a partir de material vegetal contaminado e microenxertia, ou seja, enxertia executada *in vitro*, é outra das aplicações desta metodologia (Canhoto, 2010).

A micropropagação através da proliferação de meristemas compreende geralmente as fases de multiplicação, alongamento e enraizamento e aclimatização *ex-vitro*. A técnica inicia-se com a cultura *in vitro* do explante, num meio de cultura adequado, normalmente na presença de uma citocinina, que promove o desenvolvimento de um novo rebento. Como referido anteriormente, o rebento originado desenvolve gemas ao longo do seu eixo, o que permite novos ciclos de multiplicação (Murali *et al.*, 2007). As plantas obtidas são geneticamente iguais à planta dadora dos explantes, a menos que ocorra algum tipo de variação somaclonal (Grattapaglia e Machado, 1990; George, 2008; Canhoto, 2010).

O sucesso da técnica pode ser afetado por diversas variáveis, como o genótipo e estado de maturação (Murashige, 1974), condições fitossanitárias e nutricionais da planta mãe, a seleção e colheita dos explantes e sua posterior desinfeção e isolamento em condições assépticas, a composição do meio de cultura e a manipulação das culturas (Grattapaglia e Machado, 1990; George, 2008; Canhoto, 2010).

1.3.2. Embriogénese somática

Têm sido publicados vários trabalhos sobre ES, nomeadamente por investigadores do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Coimbra (Correia *et al.*, 2009, 2011, 2012, 2019; Canhoto *et al.*, 1999, 2005, 2006). Nestes trabalhos são abordados, não apenas as metodologias envolvidas na indução e desenvolvimento de embriões somáticos, mas também diversos aspetos dos mecanismos citológicos e moleculares envolvidos na formação e desenvolvimento dos mesmos, confirmando-se o potencial da ES em tamarilho, enquanto processo morfogénico com importantes aplicações, tanto para clonagem e transformação genética de plantas como para a compreensão da formação e desenvolvimento dos embriões (Guimarães *et al.* 1988, 1996; Lopes *et al.* 2000; Canhoto *et al.* 2005; Correia *et al.* 2009, 2011, 2012a; Correia e Canhoto, 2012; Correia e Canhoto, 2018; Correia *et al.*, 2019).

A embriogénese somática é uma forma de reprodução assexuada que consiste numa mudança no programa de desenvolvimento das células somáticas, que faz com que estas embarquem numa nova via de desenvolvimento, resultando na formação de estruturas semelhantes aos embriões zigóticos, sem ocorrer fusão de gâmetas (Jiménez, 2001; Fehér *et al.*, 2003; Karami *et al.*, 2009). É um processo a partir do qual células somáticas, sob determinadas condições, sofrem uma reestruturação (desdiferenciação) e reprogramação (ou rediferenciação), formando células embriogénicas com capacidade de gerar embriões e conseqüentemente originar novas plantas (Jiménez, 2001; Rose *et al.*, 2010; Loyola-Vargas, 2016).

São vários os explantes de tamarilho que têm a capacidade para iniciar culturas embriogénicas, como embriões zigóticos, folhas jovens, hipocótilos e cotilédones. Uma das limitações da ES, que é referida frequentemente na literatura, é a recalcitrância do material adulto, em particular de espécies lenhosas, condicionando assim a clonagem de plantas selecionadas (Thorpe e Stasolla, 2001). Uma alternativa à clonagem de tamarilho adulto por ES é o estabelecimento prévio de plantas *in vitro*, através da indução de embriogénese em segmentos do limbo provenientes de plantas estabelecidas (Correia *et al.*, 2011; Correia e Canhoto, 2018).

A indução da ES é alcançada com um meio de cultura rico em auxinas e suplementado com níveis de sacarose elevados (9%), o que contribui significativamente para o aumento da formação de embriões somáticos, aumentando a eficiência da ES até aos 85% (Canhoto *et al.*, 2005).

No tamarilho, a formação de embriões somáticos pode seguir duas vias distintas, dependendo do tipo de auxina utilizada – ácido 1-naftilacético (NAA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinecarboxílico (picloram). Desta forma, na presença de NAA os embriões zigóticos diferenciam-se em embriões somáticos após a formação de um calo reduzido – processo “one step”. Por outro lado, quando são usadas outras auxinas, como o 2,4-D ou o picloram, os embriões zigóticos ou os segmentos do limbo jovens produzem um tecido embriogénico possível de ser mantido por subculturas sucessivas no mesmo meio contendo auxinas – processo “two step”. Depois de serem transferidas para um meio desprovido de auxinas, as massas pró-embriogénicas desenvolvem-se em embriões e posteriormente em plântulas (Guimarães *et al.*, 1996).

Em tamarilho o protocolo mais frequentemente utilizado é o processo em “two-step”, com formação de um tecido embriogénico com capacidade de manutenção e proliferação em cultura, que oferece um enorme potencial e uma alternativa eficiente para a propagação *in vitro* do material vegetal em larga escala, assim como a possibilidade de ser usado como fonte de linhas celulares para ensaios ou para a transformação genética de plantas (Correia *et al.*, 2019).

1.3.3. Organogénese

A organogénese é o processo de diferenciação através do qual órgãos da planta, como raízes, rebentos caulinares ou flores são formados a partir de explantes, onde ocorreu a formação de meristemas adventícios. Quer isto dizer que os órgãos formados resultam de novos meristemas e não de meristemas já existentes no explante (Schwarz *et al.*, 2004; Tallón *et al.*, 2013).

Em tamarilho é possível regenerar plantas recorrendo ao processo de indução de organogénese em diferentes tipos de explantes, como hipocótilos, cotilédones, raízes e embriões zigóticos maduros (Guimarães *et al.*, 1996; Santos, 2012).

Existem dois tipos de organogénese que podem levar à formação de plantas: a organogénese direta e a organogénese indireta. Na organogénese direta não ocorre formação de calo (Flick *et al.*, 1983; D’Amato *et al.*, 1991; Jha e Ghosh *et al.*, 2005). Nesta situação, é possível regenerar plântulas inteiras a partir de tecidos vegetais, sem passar por um estágio de dediferenciação, ou seja, calos e/ou formação de embriões somáticos (Hussain *et al.* 2012), mantendo assim a estabilidade genómica das plantas regeneradas. A organogénese indireta caracteriza-se essencialmente pela formação de calo numa fase inicial e posterior regeneração das gemas caulinares, que se diferenciam em rebentos (Flick *et al.*, 1983; Jha e Ghosh *et al.*, 2005; Chawla, 2009).

A repicagem do calo para um novo meio de cultura promove a indução de rebentos caulinares, que posteriormente são isolados e cultivados num meio de enraizamento (D’Amato, 1991), sendo necessária a aplicação de fitohormonas para a ocorrência do processo (Chawla, 2009). A composição do meio de cultura influencia a indução de organogénese e as interações existentes entre os diferentes reguladores de crescimento são determinantes para a formação dos órgãos (George, 2008; Dixon e Gonzales, 2003).

Os meios de cultura para a indução da organogênese têm sido alvo de estudo. Faye *et al.* (2015) verificaram que as respostas das variáveis avaliadas mudaram com base no tipo e concentração de reguladores de crescimento, usando diferentes fitorreguladores na organogênese conduzida *in vitro*. Estudos conduzidos por Apraez *et al.*, (2012) realizaram-se com o intuito de obter plantas de tamarilho por organogênese induzida em calos. Nos tratamentos foi utilizado meio MS (controle) e verificou-se a formação de raízes, caules, folhas e uma maior percentagem (1,66%) de plantas regeneradas com MS suplementado com 2,4-D a 5 μM . Também Mascarenhas (2018) relacionou vários tipos de explantes com meios de cultura e verificou que o nó cotiledonar, submetido à concentração de 12,50 μM de BA, era o melhor explante, com regeneração de rebentos via organogênese direta, e o limbo mostrou ser o explante mais eficiente para a organogênese indireta, em concentrações de 4,44 μM de BA.

Esta técnica exibe um elevado potencial para propagação em larga escala, visto que podem ser formados centenas de rebentos a partir de um único explante. Teoricamente o limite de rebentos formados é o número de células no explante, no entanto a verdade é que nem todas as células são induzidas (Canhoto, 2010).

1.4. Biorreatores de propagação de plantas

Novos sistemas de micropropagação têm sido desenvolvidos na perspectiva de obter melhorias no processo de produção vegetal *in vitro*, potencializando os benefícios da micropropagação e mitigando algumas das suas dificuldades, tornando esta técnica mais simples e menos dispendiosa (Lorenzo *et al.*, 1998; O'Neill *et al.*, 2015). De acordo com Silva (2006), a micropropagação de plantas apresenta um elevado custo de produção, o que torna as plantas produzidas nestes sistemas caras e de difícil aquisição pelos produtores rurais. Estes custos de produção estão relacionados com a mão-de-obra, que chega a ser 40% ou 60% dos custos de produção (Cid *et al.*, 2002).

Uma das maneiras de reduzir os custos de produção é recorrer a métodos que permitam aumentar a escala de propagação, recorrendo, por exemplo a biorreatores. (Penchel *et al.*, 2007; Teixeira, 2011).

Os biorreatores são utilizados na micropropagação clonal em massa de cultura de células, tecidos, sementes ou órgãos vegetais (Teixeira, 2002) e promovem condições ótimas de crescimento em meio líquido nutritivo, tendo como propósito fundamental, facilitar o trabalho rotineiro e melhorar as condições ambientais e assépticas para as culturas, produzindo-as em grandes quantidades. Segundo Ziv *et al.* (2003), a tecnologia proporcionada por este sistema de cultivo oferece uma maior rapidez no processo de produção de plantas e eficiência em relação aos demais métodos. Paralelamente, há uma redução nos custos do processo, cuja função básica é promover condições ótimas de crescimento através da regulação de fatores químicos e, ou, físicos.

A primeira aplicação de biorreatores para propagação de plantas foi realizada por Takayama e Misawa (1981) na propagação de begónia a partir de segmentos nodais estabelecidos *in vitro*, de forma similar aos cultivos convencionais. Após este primeiro trabalho, foram adaptados procedimentos para diversas espécies vegetais (Noriega e Söndhal, 1993).

A utilização de biorreatores na propagação em larga escala tem sido relatada com sucesso em várias espécies, como *Musa acuminata* (bananeira, Alvard *et al.*, 1993), *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar, Lorenzo *et al.*, 1998), *Phalaenopsis* (orquídea, Paek *et al.*, 2001), *Persea americana* (abacateiro, Escalona *et al.*, 1999), *Bactris gasipaes* (pupunha, Steinmacher *et al.*, 2011), eucalipto (Oliveira *et al.*, 2011), *Fragaria* (morangueiro, Hanhineva *et al.*, 2005), *Cedrela odorata* (cedro-cheiroso, Pena-Ramírez *et al.*, 2010) e *Cymbopogon citratos* (capim-limão, Qiala *et al.*, 2006), apresentando taxas de multiplicação superiores quando comparada com a micropropagação convencional, a partir destes sistemas de imersão temporária (Feuser *et al.*, 2003; Rech Filho *et al.*, 2009; Steinmacher *et al.*, 2011).

São dois os tipos de biorreatores que têm sido utilizados na micropropagação de plantas: 1) os biorreatores de imersão permanente ou contínua, que proporcionam o contacto permanente do material vegetal com o meio de cultura, são mais complexos em relação à sua montagem e funcionamento, menos versáteis quanto ao seu uso e de difícil manipulação durante as fases de produção; 2) e os de imersão temporária cujo contacto do meio com os explantes é temporário e pode ser controlado de acordo com as necessidades da cultura (Teixeira, 2002).

1.4.1. Biorreatores de imersão temporária

O sistema de cultura em biorreatores de imersão temporária tem apresentado diversas otimizações, que se traduzem em melhores condições de cultivo e eficiência para diversas espécies vegetais, o que lhes permite serem utilizados com sucesso para a multiplicação rápida de rebentos. Este método, proposto inicialmente por Alvard *et al.* (1993) utiliza um recipiente que contém a cultura em proliferação, que recebe o meio nutritivo líquido num sistema de bombeamento temporário, e outro recipiente onde se encontra o meio de cultura. Consiste num novo conceito da utilização de meio líquido para a micropropagação, ocorrendo um aumento substancial na taxa proliferativa.

A sua eficiência está associada a uma melhor nutrição das culturas através do meio de cultura líquido, melhor oxigenação, e melhoramento da qualidade dos propágulos, além da possibilidade da automatização dos sistemas de propagação com um custo relativamente baixo (Murch *et al.*, 2004). Este sistema é caracterizado também pela menor ocorrência de hiper-hidricidade (vitrificação), muito comum nas culturas em meio líquido (Ziv, 2003).

Outro aspeto a salientar é que a troca de meio nas diferentes fases de cultivo não exige manuseamento dos explantes, como acontece no sistema convencional. Apenas o recipiente que contém o meio de cultura é substituído, em câmara de fluxo, sem que aconteça qualquer manuseamento das plantas que se encontram no outro recipiente (Paek *et al.*, 2001). Este sistema é caracterizado por apresentar maior facilidade de uso em comparação com outros sistemas, além de possibilitar um maior período de cultivo (Alvard *et al.*, 1993; Etienne e Berthouly, 2002).

O biorreator SETIS™ é um conceito melhorado do BIT. Este sistema vem solucionar e resolver as desvantagens e problemas dos outros sistemas existentes. É fácil de manusear, compacto, seguro e oferece uma utilização máxima da superfície. A Fig. 3 ilustra o procedimento e operação do SETIS™. Neste sistema existe um recipiente do meio de cultura e um da cultura que estão interligados. A fase 1 é a fase estacionária, em que todo o meio está localizado no recipiente inferior. A fase 2 consiste na transferência do meio para o recipiente superior, correspondente à cultura, fornecendo ar comprimido para o recipiente inferior. Após a cultura ter estado em contacto com o meio nutritivo por um período de tempo estipulado, o meio retorna para o recipiente inferior pela força da gravidade, esta é a fase 3. A última fase é a fase de ventilação,

que tem como objetivo a renovação da composição do ar, o ar comprimido é fornecido para o recipiente de cultura (Vervit, 2019).

A renovação da atmosfera do recipiente de cultivo possibilita a remoção dos gases libertados pelas plantas, os quais podem ter efeito inibidor no crescimento; além disto, a renovação do CO_2 do recipiente pode proporcionar um incremento no nível de fotossíntese *in vitro*, desde que a luminosidade seja adequada. A constante renovação do ar durante o período de transferência do meio, pode eliminar os possíveis gases prejudiciais produzidos pelo metabolismo das plantas que normalmente se acumulam na fase gasosa dos sistemas (Perez Ponce, 1998).

Os biorreatores utilizam meio de cultura líquido que permite a renovação do ar e de nutrientes durante o cultivo, que resulta num maior crescimento e multiplicação quando comparado com o meio sólido. Essas condições podem permitir um crescimento ótimo das células vegetais, mediante uma regulação precisa dos fatores ambientais e um fornecimento contínuo de água, nutrientes e oxigênio (Perez Ponce, 1998).



Figura 3- Esquema ilustrativo de um biorreator do tipo SETIS™ (Vervit 2019). Fase 1: Estacionária; Fase 2: Fase de imersão; Fase 3: Fim da imersão; Fase 4: Fase de ventilação

1.5. Objetivos do trabalho

O tamarilho é uma espécie cujo interesse económico e biotecnológico tem vindo a crescer significativamente nos últimos anos. As particularidades nutritivas dos seus frutos são uma característica apelativa para a produção desta planta como espécie frutícola.

O presente trabalho foi elaborado no âmbito de uma das linhas de investigação que tem vindo a ser desenvolvida no laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra, relacionada com estratégias para a produção em larga escala do tamarilho. Os resultados até agora obtidos demonstraram o interesse desta espécie e que a clonagem a partir de explantes juvenis é fácil de obter mediante diferentes técnicas de cultura *in vitro* como a proliferação de rebentos axilares, organogénese e embriogénese somática. Um dos objetivos principais é desenvolver e fornecer sistemas de propagação de plantas de tamarilho, numa escala que permita a sua produção em biorreatores vegetais, sendo esta uma estratégia para aumentar a capacidade de produção desta planta.

Deste modo, o trabalho de investigação desenvolvido teve como objetivo testar diversos meios de cultura para a multiplicação e consequente produção de tamarilho em biorreatores de imersão temporária, associados a diferentes tempos de imersão.

Têm sido testados protocolos alternativos de propagação e a organogénese é um método de micropropagação com elevado potencial e que tem sido aplicado com sucesso em inúmeras espécies. Ensaios preliminares realizados em tamarilho mostraram que alguns explantes de tamarilho têm a capacidade de formar meristemas adventícios e consequentemente dar origem a novas plantas. Assim, outro objetivo foi testar diferentes condições de cultura com vista à indução de organogénese em segmentos do limbo e pecíolos. Este protocolo poderá ulteriormente vir a ser testado em biorreatores. Com o mesmo objetivo, o comportamento de calo embriogénico em proliferação no meio sólido e líquido, assim como a consequente formação de embriões e plântulas também foi avaliado.

Com o objetivo de verificar a qualidade das plantas produzidas *in vitro*, a performance das plantas aclimatizadas provenientes de organogênese, embriogênese somática e dos biorreatores de imersão temporária foi avaliada, após o enraizamento, através da observação de parâmetros morfológicos e fisiológicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS



2.1. Material Vegetal

Na realização deste trabalho foi utilizado material vegetal previamente estabelecido *in vitro*, nomeadamente plantas de tamarilho vermelho, estabelecidas originalmente a partir da germinação de sementes e multiplicadas através da proliferação de meristemas axilares, como diferentes linhas clonais.

Para a indução de organogénese em tamarilho, utilizaram-se secções de folhas jovens e pecíolos como explante, que tiveram origem em plântulas de tamarilho de diferentes cultivares mantidos *in vitro* em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com 30 g/L de sacarose e 7 g/L de agar até se obter o tamanho de folhas ideal (1 – 1,5 cm de comprimento).

Com o intuito de testar a proliferação de calo embriogénico (CE) em meio líquido e o seu comportamento comparativamente com a proliferação em meio sólido, utilizou-se uma linha pré-estabelecida de calo embriogénico (TSM 10). Esta linha foi induzida a partir de folhas jovens de plantas estabelecidas *in vitro* em 2015, por via seminal, e multiplicadas em meio MS com 30 g/L de sacarose e 0,2 mg/L de BA. Para a indução de CE, os explantes do limbo foram fragmentados em porções de pequenas dimensões (3 a 10 mm) e o conjunto das pequenas secções correspondentes a um quarto da folha colocados num tubo de ensaio em meio de indução e proliferação, composto por meio MS com 90 g/L de sacarose, 5,0 mg/L de picloram e gelificado com 2,5 g/L de Phytigel (Sigma). As culturas foram incubadas em estufa a 24±1 °C, no escuro, durante pelo menos 12 semanas, até se conseguir isolar e subcultivar o CE. Este calo foi subcultivado mensalmente em meio de indução e proliferação com a mesma composição do meio de indução.

2.2. Métodos

2.2.1. Germinação de sementes *in vitro*

Para o estabelecimento de clones de plantas de tamarilho vermelho de origem seminal, foram isoladas as sementes de frutos maduros. Na desinfecção superficial das sementes estas foram submetidas a uma lavagem com água e 2/3 gotas de tween 20 durante 5 min, seguindo-se uma passagem em etanol a 70% (v/v) de 30 a 60 seg. As sementes foram depois desinfetadas numa solução de hipoclorito de cálcio a 5% (p/v), com agitação, durante 10 min., seguindo-se 3 lavagens com água esterilizada. Depois da desinfecção as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) com 13 ml de meio base MS, com 30 g/l de sacarose e 0,7% (p/v) de agar, sem reguladores de crescimento.

A germinação ocorreu no escuro durante 2 semanas e após esse período foram transferidas para meio MS suplementado com 0,2 mg/L de BA e colocadas à luz, onde permaneceram cerca de 3 semanas.

2.2.2. Micropropagação de ápices meristemáticos e segmentos nodais

Após a germinação, seguiu-se a micropropagação através da cultura sucessiva de ápices meristemáticos e segmentos nodais (1,5 cm) em tubos de ensaio, com meio de proliferação de rebentos: meio MS suplementado com 0,2 mg/l de BA e 30 g/l de sacarose. Foi adicionado ao meio 0,7 % (p/v) de agar e o pH foi ajustado para 5,6 - 5,8, antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.

Todas as culturas estabelecidas foram subcultivadas mensalmente em meio de cultura fresco, com a mesma composição do meio de proliferação de rebentos e mantidos numa câmara de crescimento a 24±1 °C, sob um fotoperíodo de 16h de luz (15-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 8h escuro.

Os rebentos obtidos após proliferação foram transferidas para caixas Microbox Combiness (97 x 120 mm, com filtro XXL), com cerca de 80 ml de meio MS contendo 30 g/l de sacarose e sem reguladores de crescimento. Mantiveram-se nas condições anteriormente referidas durante 4-6 semanas, até apresentarem um sistema radicular bem desenvolvido e um porte que permitia a sua passagem para substrato (cerca de 6 cm de comprimento e folhas desenvolvidas) e aclimatização (Fig. 6A).

Após enraizamento dos rebentos, as plantas foram transferidas para vasos de 200 ml e posteriormente para vasos maiores de 1 L, contendo substrato constituído por uma mistura de terra:perlite (2:1,v/v) e aclimatizadas em câmara climática, com uma intensidade luminosa de 15-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz branca fluorescente) e um fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, 70% de humidade relativa (HR) e 24 °C, durante 4 semanas, até serem transferidas para uma estufa de exterior.

2.2.3. Indução de organogénese

Para a indução de organogénese, utilizaram-se como explantes o limbo e pecíolos de plantas jovens de tamarilho vermelho, micropropagadas em meio de multiplicação (meio MS com 30 g/l de sacarose e 0,2 mg/l de BA), sendo que os diversos meios de indução foram testados em placas *multiwell* (12 poços) com utilização de 4 explantes por condição.

As plântulas com cerca de 4-5 semanas em meio de multiplicação e 6-7 cm de altura foram retiradas do tubo de ensaio e colocadas numa caixa de Petri para dissecação. A zona apical (1 – 2 cm) foi removida e cultivada em novo meio de multiplicação, com o objetivo de manter o stock de plântulas. As plântulas de tamarilho foram mantidas em meio MS e repicadas a cada 8 semanas, de forma a garantir sempre a disponibilidade de plantas com cerca de 4 semanas.

O procedimento a seguir consistiu na excisão das folhas da parte apical da plântula e após remoção da nervura central, com o auxílio de um cortador de discos, efetuou-se o corte dos discos com diâmetro de 0,5 cm. De seguida, foram colocados nos poços da placa *multiwell*, com a parte abaxial para baixo e os pecíolos foram cortados ao meio e ambos foram colocados em contacto com o meio de indução de organogénese (CB1 a CB12 – Tab. 1) com 30 g/l de sacarose, de acordo com o esquema de desenho experimental apresentado na figura 6B.

Neste trabalho, para todos os ensaios utilizou-se como meio base o meio MS (Duchefa Biochimie). A este meio foram adicionadas diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento (Tab. 1). Os reguladores de crescimento utilizados para os ensaios de organogénese foram: 6-Benzilaminopurina (BA), ácido 1-naftilacético (NAA) e metatopolina (mT).

Os diferentes meios foram preparados a partir de soluções stock do meio MS mantidas a -20 °C. As restantes soluções, como as soluções stock dos diferentes reguladores de crescimento foram conservadas à mesma temperatura.

As placas e os meios correspondentes a cada poço da placa *multiwell* foram devidamente identificados, com o respetivo meio de indução e a data da cultura e colocados ao escuro durante 3 semanas e posteriormente transferidos para uma estufa sob temperatura de 24 °C, intensidade luminosa de 15 – 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR e um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Ao fim de 8 semanas de cultura avaliou-se o efeito das combinações hormonais e registaram-se os parâmetros: formação ou não de calo, indução de gemas e número de rebentos formados.

Tabela 1- Composição dos meios de cultura utilizados na fase de indução do processo de regeneração de plantas por organogênese.

MEIO	COMPOSIÇÃO
CB1	MS + 1,0 mg/L BA
CB2	MS + 2,0 mg/L BA
CB3	MS + 3,0 mg/L BA
CB4	MS + 1,0 mg/L BA + 2,0 mg/L mT
CB5	MS + 2,0 mg/L BA + 1,0 mg/L mT
CB6	MS + 1,0 mg/L BA + 0,25 mg/L NAA
CB7	MS + 2,0 mg/L BA + 0,25 mg/L NAA
CB8	MS + 1,0 mg/L mT + 0,25 mg/L NAA
CB9	MS + 2,0 mg/L mT + 0,25 mg/L NAA
CB10	MS + 1,0 mg/L mT
CB11	MS + 2,0 mg/L mT
CB12	MS + 3,0 mg/L mT

2.2.3.1. Alongamento de rebentos e enraizamento

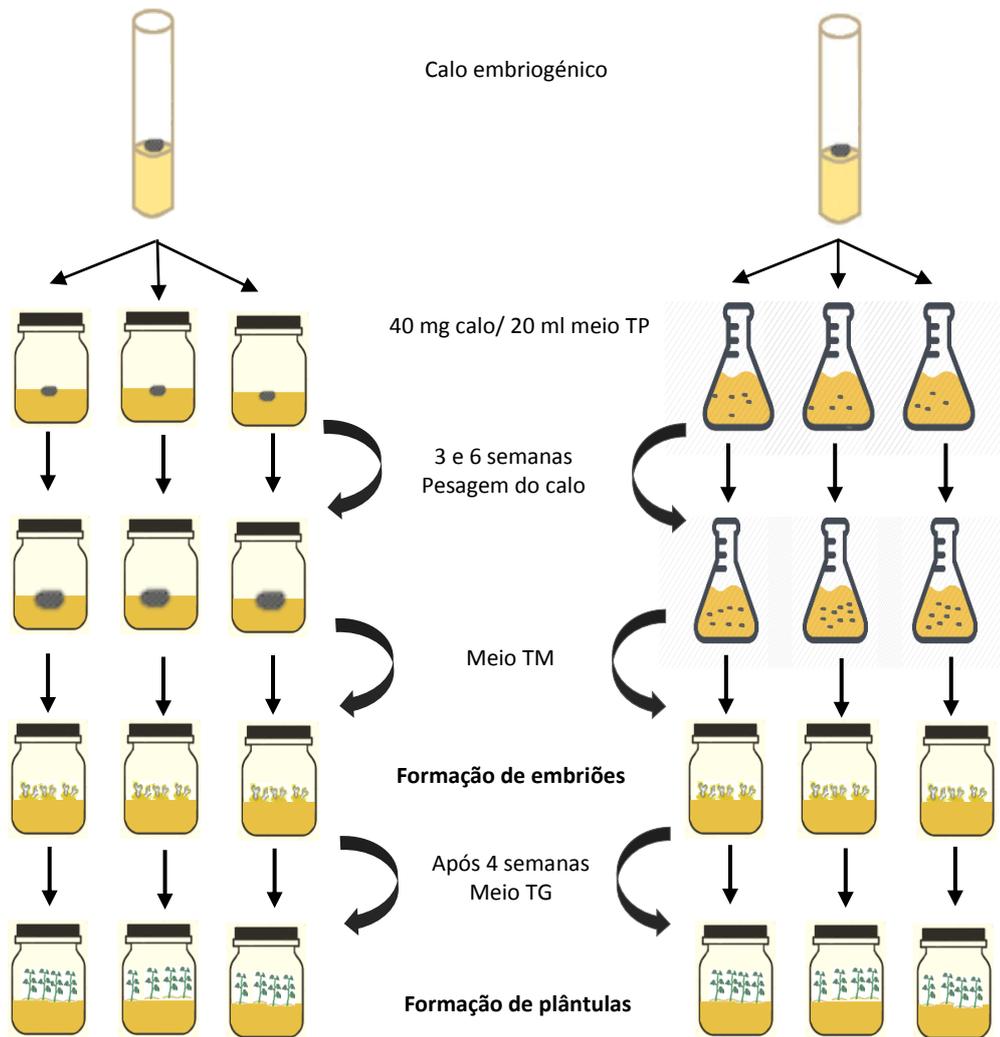
Após 8 semanas de indução, os explantes que responderam com a formação de rebentos adventícios foram transferidos para um novo meio, constituído por uma concentração mais baixa da citocinina BA (0,2 mg/L), de forma a promover o alongamento dos rebentos. Esse alongamento foi testado em meio sólido e em meio líquido com a composição referida. Ao fim de 4 semanas em meio de alongamento, os rebentos, com 6 cm, foram isolados e transferidos para meio de enraizamento, onde permaneceram 4 semanas. As plantas obtidas foram aclimatizadas conforme descrito na secção 2.2.2.

2.2.4. Proliferação de calo embriogénico em sistemas de imersão permanente

Foi mantido calo embriogénico previamente induzido em tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) com cerca de 13 ml de meio de indução de ES (meio MS suplementado com 9% de sacarose e 5 mg/L de Picloram e gelificado com 2,5 g/L de Phytigel) numa câmara a 25 ± 1 °C e no escuro em subculturas mensais em meio fresco e nas mesmas condições.

Com o intuito de avaliar o potencial de proliferação do calo embriogénico em sistemas de imersão permanente (*i.e.* em meio líquido), foram transferidas massas de calo (40 mg) para frascos (meio de indução gelificado) e para Erlenmeyers com 20 ml de meio de indução líquido, em agitação (Fig. 6C). Ao fim de 3 (t_3) e 6 (t_6) semanas foi registada a massa (m) de calo para as duas condições e avaliado o incremento de proliferação através da fórmula: Incremento $t_3 = m_{t_3} - m_{t_0}$ e Incremento $t_6 = m_{t_6} - m_{t_3}$.

Amostras de calo provenientes de proliferação em meio gelificado e em meio líquido foram transferidas para meio de desenvolvimento – meio TM (meio base MS com 4% p/v de sacarose, sem reguladores de crescimento) e incubadas nas mesmas condições de 25 ± 1 °C, no escuro, durante 4 semanas. Os explantes que apresentaram formação de embriões foram selecionados, de seguida procedeu-se ao registo no número de embriões formados e estes foram transferidos para novos tubos (15 x 2,2 cm) com meio de germinação – meio TG (meio base MS com 2,5% p/v de sacarose, sem reguladores do crescimento) de acordo com o esquema da figura 4, e colocados em estufa sob um fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro a 24 ± 1 °C. Após o surgimento de plântulas, houve contabilização das mesmas e a partir do momento em que a raiz estava bem desenvolvida, as plântulas foram aclimatizadas.



Meio sólido (Controlo)

Meio líquido

Figura 4- Processo de proliferação de CE em meio sólido e líquido, formação de embriões e plântulas

2.2.5. Proliferação de rebentos em biorreator de imersão temporária

Para os ensaios de proliferação em sistema de imersão temporária foi utilizado material vegetal previamente estabelecido em cultura, nomeadamente linhas de clones de plantas de tamarilho vermelho de origem seminal, que se encontravam em tubos de ensaio com meio de proliferação de rebentos, meio MS suplementado com 0,2 mg/L de BA e 30 g/L de sacarose e mantidos em câmara de crescimento a 24 ± 1 °C, sob um fotoperíodo de 16h de luz ($15-20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 8h escuro.

Com o intuito de identificar o melhor meio para a multiplicação de rebentos de tamarilho em sistema de imersão temporária, testaram-se 9 meios, com combinações hormonais, e de tempos de imersão e arejamento diferentes (Tab. 2). Os biorreatores A e B correspondem a meios de cultura com concentrações de 0,5 e 1,0 mg/L de BA, respetivamente.

O desempenho e o comportamento dos explantes foi avaliado em biorreator de imersão temporária (BIT) da marca SETIS™, utilizando 30 explantes por tratamento e um volume de 1 L de meio de cultura por recipiente, autoclavado a 120 °C durante 20 minutos, diretamente dentro dos recipientes. Os tubos, os filtros e o recipiente de cultura foram também previamente autoclavados. Após a secagem do material e arrefecimento do meio de cultura procedeu-se à montagem do sistema (Fig. 5A).

As plântulas utilizadas foram retiradas do meio gelificado e em condições assépticas realizou-se o corte das folhas, do tecido oxidado e da parte apical da planta com a ajuda de pinça e bisturi, cujo tamanho dos explantes variou entre 2-4 cm. Posteriormente, os segmentos foram transferidos para a parte superior do BIT. Após introdução nos biorreatores, o material vegetal foi acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 h e irradiância PAR média de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 5B).

Ao fim de 4 semanas, após o alongamento e multiplicação dos rebentos, estes foram transferidos diretamente para substrato, constituído por uma mistura de terra:perlite (2:1,v/v), para enraizarem. Após o desenvolvimento radicular, os rebentos foram aclimatizados. As taxas de aclimatização (TA) das plantas resultantes foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula: $TA = \frac{\text{N}^\circ \text{ plantas aclimatizadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de plantas}} \times 100$.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultura e condições de imersão utilizados na multiplicação de rebentos de tamarilho no sistema de imersão temporária.

TIPO DE MEIO	CONDIÇÕES DE IMERSÃO
MEIO MS + CITOCININA	
0,5 mg/L BA- Biorreator A	3' / 3h sem aeração
1,0 mg/L BA – Biorreator B	3' / 3h sem aeração
0,5 mg/L mT	3' / 6h + 60'' / 6h de aeração
0,5 mg/L Zea	3' / 6h + 60'' / 6h de aeração
0,5 mg/L TDZ	3' / 6h + 60'' / 6h de aeração
MEIO MS + CITOCININA + AUXINA	
1,0 mg/L BA + 0,1 NAA	3' / 3h sem aeração
0,5 mg/L mT + 0,05 mg/L NAA	3' / 6h + 60'' / 6h de aeração
0,5 mg/L Zea + 0,05 mg/L NAA	3' / 6h + 60'' / 6h de aeração
5 mg/L TDZ + 0,05 mg/L NAA	3' / 6h + 60'' / 6h de aeração

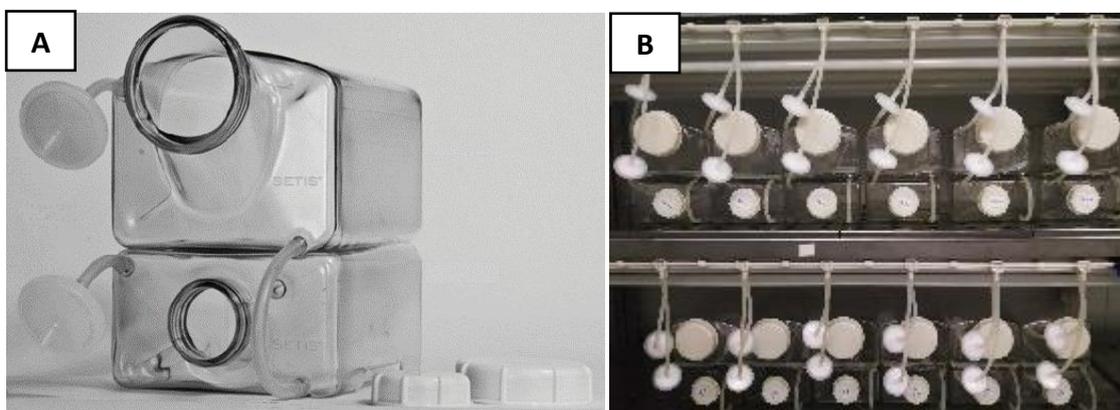


Figura 5- Biorreator de imersão temporária. **(A)** Componentes do SETIS™; **(B)** Biorreatores com o material vegetal acondicionado em sala de cultura.

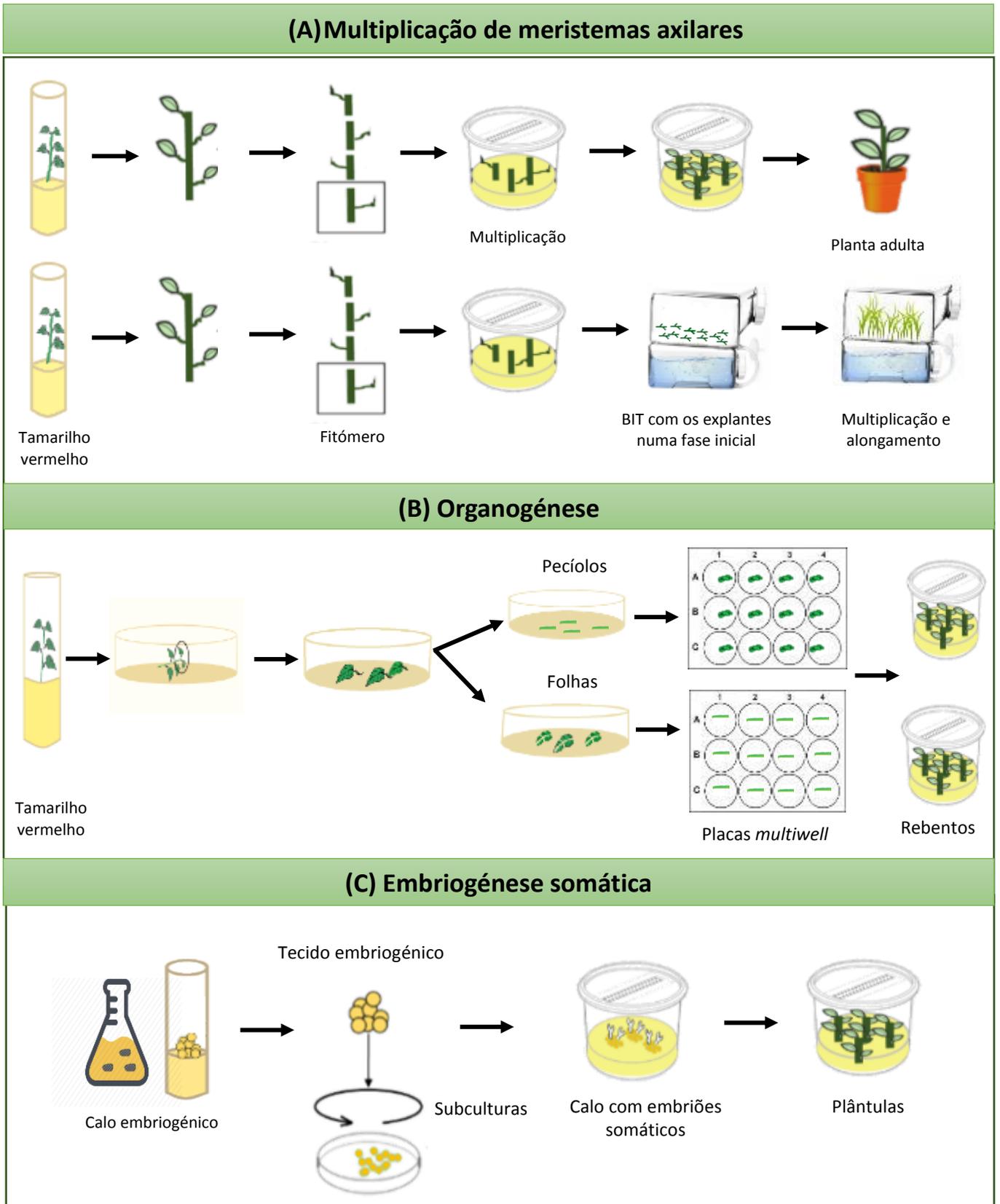


Figura 6- Métodos de micropropagação de tamarillo: (A) Proliferação de meristemas axilares; (B) Organogênese; (C) Embriogênese somática.

2.2.6. Avaliação de parâmetros morfológicos e biomassa das plantas aclimatizadas

Após 6 semanas de aclimatização, as plantas de cada tratamento foram transferidas para a estufa e medida a altura e quantificada a biomassa de 3 exemplares por tratamento. Para o registo da biomassa a parte aérea e radicular foram separadas e secas a uma temperatura de 40 °C durante 15 dias, altura em que o peso seco foi determinado.

2.2.7. Avaliação da resposta fisiológica das plantas aclimatizadas

2.2.7.1. Avaliação das trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

A taxa de assimilação de CO₂ (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a condutância estomática (gs, $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a taxa de transpiração (E, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e o conteúdo intercelular de CO₂ (Ci, ppm) foram medidos em 3 réplicas por tratamento, usando um analisador de gases por infravermelho portátil (LCpro-SD, ADC BioScientific Ltd., UK), equipado com câmara de folha. Foi também calculado o parâmetro de *intrinsic Water Use Efficiency* (WUEi), assim como o rácio entre A e E.

Para averiguar a intensidade da luz de saturação, curvas A/PPFD (*photosynthetic photon flux density*; curvas de luz de resposta da assimilação de CO₂) foram efetuadas com os seguintes PPFDs: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 100, 50 e 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Depois de analisar a relação A/PPFD, medições pontuais à intensidade da luz de saturação foram efetuadas a 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As seguintes condições foram mantidas constantes dentro da câmara: fluxo de ar (200 mol s^{-1}), temperatura (25 °C), CO₂ atmosférico e a concentração em H₂O.

Para a determinação da fluorescência da clorofila a em “estado estacionário” utilizou-se um fluorómetro portátil (Mini-PAM; Walz, Effeltrich, Germany) conforme descrito por Alves *et al.* (2012) utilizando as mesmas folhas do ensaio de trocas gasosas descrito acima. Os componentes adaptados à luz da fluorescência da clorofila foram medidos: fluorescência no estado estacionário (F), fluorescência máxima (F'm), a fluorescência variável (F'v; equivalente a F'm-F) e o rendimento quântico da fotoquímica do fotossistema II [ϕ PSII; equivalente a $(F'm - F)/F'm$]. As folhas foram depois mantidas no escuro durante cerca de 20 minutos para obter a fluorescência mínima (F0), a fluorescência máxima (Fm), fluorescência variável (Fv; equivalente a Fm-F0), o rendimento quântico da fotoquímica do PSII (Fv/Fm) e a extinção não-fotoquímica [*Non-photochemical quenching*, NPQ; equivalente a $(Fm/F'm)^{-1}$].

2.2.8. Análise estatística

A análise estatística das amostras foi feita através do programa GraphPad Prism 6 tendo-se realizado uma ANOVA de duas vias em 10 réplicas por tratamento, comparando a proliferação de CE em meio sólido e líquido ao longo do tempo.

Na avaliação dos parâmetros morfológicos e fisiológicos das plantas aclimatizadas utilizou-se o teste de Tukey com 3 réplicas, comparando os diferentes tratamentos.

Para análise do número de embriões e plântulas formadas de calo proveniente de meio sólido e líquido utilizou-se um teste t, assim como nos ensaios do tamanho médio dos rebentos, provenientes dos biorreatores de imersão temporária.

3. RESULTADOS



3.1. Organogénesse

3.1.1. Otimização das condições de indução

O efeito de diferentes meios de cultura na indução de organogénesse em tamarilho foi analisado, por observações periódicas do comportamento dos explantes (de duas em duas semanas), os resultados intermédios e finais foram registados após 4 e 8 semanas de cultura, respetivamente e estão apresentados na figura 7 e na tabela 3. Na figura 8, observam-se os resultados obtidos nos ensaios realizados em *multiwell*, nos quais os discos foliares foram colocados em diferentes meios de indução (Fig. 8A) e após 8 semanas de cultura observou-se a formação de rebentos (Fig. 8B).

A partir da análise dos resultados patentes na tabela 3 verificou-se que, de um modo geral, houve um maior número e tamanho médio de rebentos provenientes de induções no limbo, comparativamente às do pecíolo. Verificou-se ainda que o número e o tamanho médio dos rebentos formados foi distinto e variou consoante o meio de indução de organogénesse aplicado. No meio CB2 (2 mg/l BA) formou-se um maior número de rebentos (11 rebentos a partir de 8 explantes do limbo) e um maior número de plantas aclimatizadas com sucesso, originadas a partir desses rebentos. Para além disso, verificou-se a formação de mais do que um rebento por explante.

A partir da observação do desenvolvimento dos explantes, ao longo do período de indução (Fig. 7) verificou-se que, ao fim de 4 semanas de cultura, a formação de calo nos meios CB4 (1,0 mg/l BA + 2,0 mg/L mT) e CB6 (1,0 mg/L BA + 0,25 mg/L NAA) era visível e nos meios CB1 (1,0 mg/L BA), CB2 (2,0 mg/L BA), CB3 (3,0 mg/L BA) e CB5 (2,0 mg/L BA + 1,0 mg/L mT) já se observava o início da formação de gemas. Após 8 semanas de cultura, os rebentos encontravam-se bem desenvolvidos e em condições de serem transferidos para meio de alongamento.

No que respeita à formação de rebentos a partir do processo de organogénese, os resultados mostraram que nos meios CB2 e CB3 o número de rebentos formado foi superior em relação aos restantes meios (CB1, CB4, CB5 e CB6). Observou-se ainda que nos meios CB7, CB8, CB9, CB10, CB11 e CB12 não ocorreu indução de meristemas adventícios.

Para além da formação de rebentos, ao fim de 4 semanas verificou-se a formação de raízes adventícias (Fig. 9) no meio CB6 (1,0 mg/L BA e 0,25 mg/L NAA). Nos meios em que se usou apenas a citocinina BA observou-se a formação de gemas, visíveis em todo o explante (Fig.7, meio CB1, CB2 e CB3). No caso da utilização simultânea do BA com uma auxina, a formação de gemas também se verificou (Fig. 7, meio CB6).

Na tabela 3 estão indicados os meios de indução (CB1-CB6) onde se observou a formação de rebentos axilares. Nos meios CB4 e CB6 houve a formação de um número reduzido de rebentos (3 e 4 rebentos, respetivamente), comparativamente com os restantes meios. Pela observação da figura 7, nesses meios (CB4 e CB6) verificou-se uma grande formação de calo no explante, ao fim de 4 semanas de indução, comportamento este que não se observou para os outros meios.

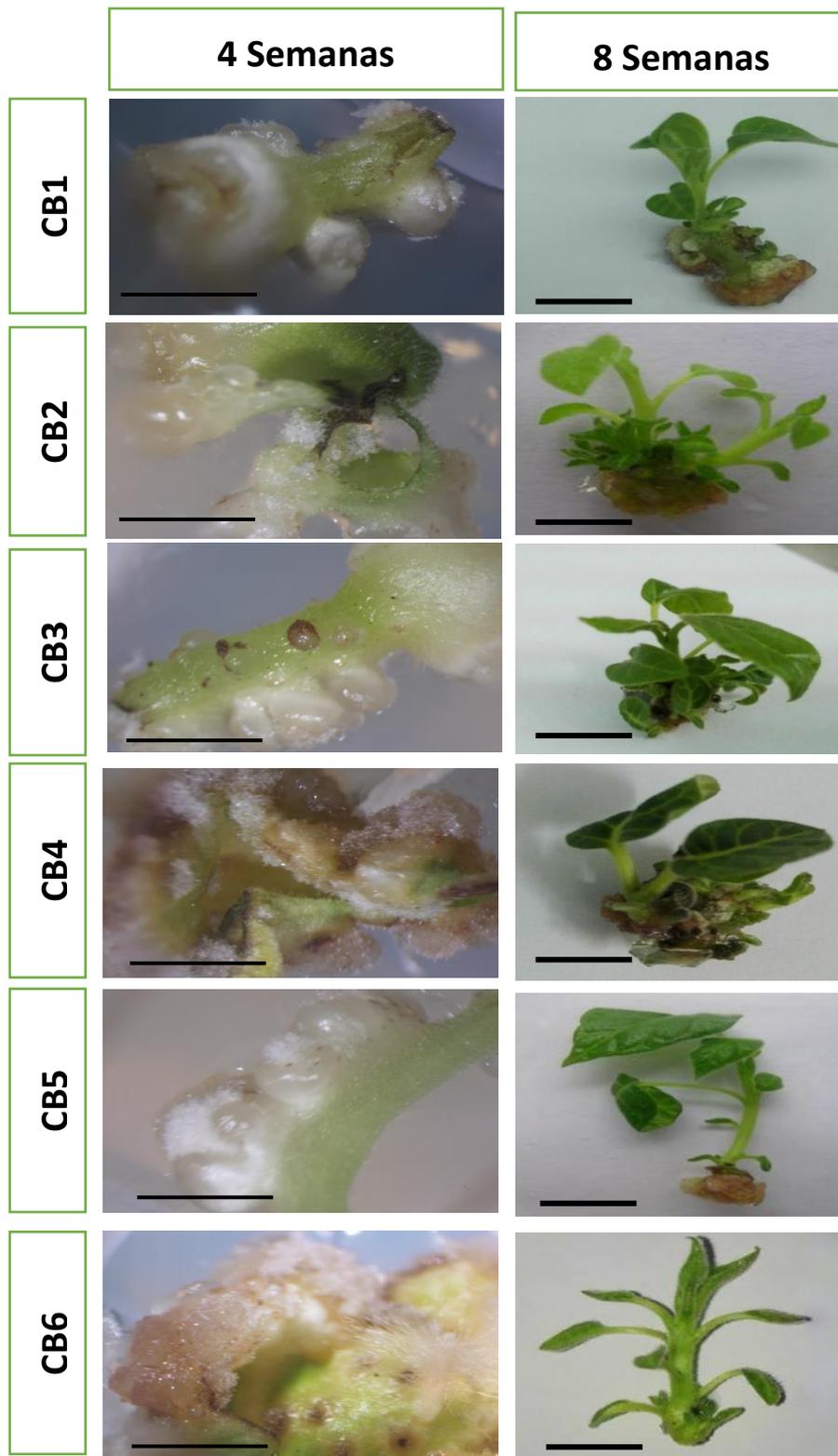


Figura 7- Resposta dos segmentos do limbo e pecíolos de tamarilho nos diferentes meios, após diferentes períodos de cultura - 4 e 8 semanas. As barras correspondem a 1 cm.

Tabela 3- Efeito de diferentes meios de cultura na indução de organogênese, em do limbo e pecíolos de tamarilho vermelho, após 8 semanas de cultura. Registo do número de plantas aclimatizadas com sucesso, após a fase de alongamento e enraizamento.

Tratamento	Nº explantes inicial		Nº rebentos formados		Comprimento médio do rebento (cm)		Plantas aclimatizadas com sucesso
	Limbo	Pecíolos	Limbo	Pecíolos	Limbo	Pecíolos	
CB1	8	8	4	2	1,25 ± 0,1	0,87 ± 0,3	6
CB2	8	8	11	4	1,58 ± 0,8	0,62 ± 0,4	15
CB3	8	8	7	4	0,87 ± 0,5	0,67 ± 0,6	11
CB4	8	8	1	2	0,98 ± 0,2	0,89 ± 0,6	0
CB5	8	8	5	3	1,00 ± 0,1	0,86 ± 0,6	8
CB6	8	8	2	2	1,35 ± 0,6	1,10 ± 0,3	0

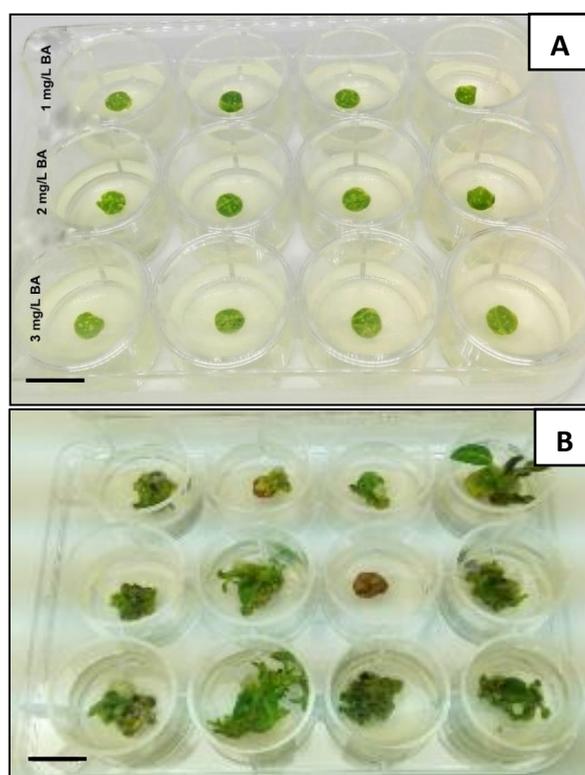


Figura 8- Ensaio de organogênese em *multiwell*, com meios de indução: 1,0, 2,0 e 3,0 mg/L de BA. A) Discos foliares; B) Resposta organogénica após 8 semanas de cultura. As barras correspondem a 1 cm.

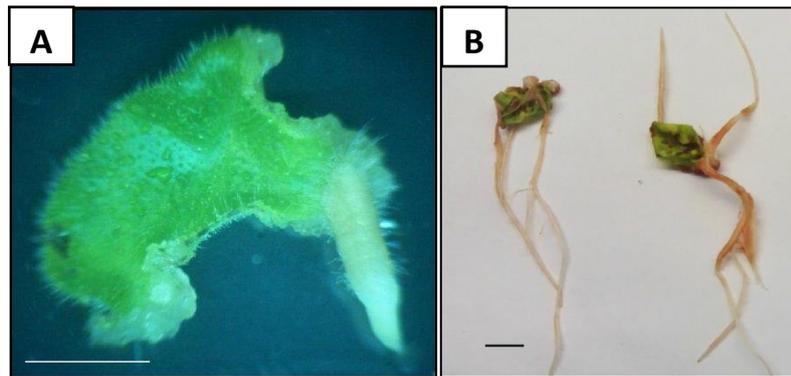


Figura 9- Raízes adventícias formadas no meio CB6. (A) Início da formação da raiz (B) Raízes desenvolvidas, após 4 semanas de cultura. As barras correspondem a 1 cm.

3.1.2. Alongamento e enraizamento dos rebentos e aclimatização das plantas provenientes de organogênese

Os rebentos obtidos por organogênese, com menos 1 cm de comprimento, foram transferidos para um meio MS suplementado com 0,2 mg/L de BA, durante 2 – 4 semanas, de forma a estimular o seu alongamento, para um mais eficaz enraizamento. Todos os rebentos formados com pelo menos 1 cm de comprimento foram isolados do explante que lhes deu origem e transferidos diretamente para meio de enraizamento. O enraizamento desses rebentos foi conseguido cultivando-os em meio MS sem hormonas.

Os resultados do comportamento dos rebentos, na fase de enraizamento *in vitro*, provenientes de diferentes meios de indução foi registado ao fim de 4 semanas, em meio de enraizamento e estão registados na tabela 4 e na figura 10.

À exceção dos rebentos provenientes dos meios CB4 e CB6, verificou-se que todos os rebentos enraizaram com sucesso e sem diferenças significativas para os parâmetros de desenvolvimento radicular registados (Tab. 4), entre os 4 tratamentos de indução de organogênese. Em todos os tratamentos observou-se a presença de raízes secundárias e a ausência de calo na base nos meios CB1 e CB3 e a presença de calo em alguns rebentos dos meios CB2 e CB5.

O meio CB2 (2 mg/L BA) e CB5 (2,0 mg/L BA + 1,0 mg/L mT) foram os que apresentaram o tamanho médio dos rebentos superior, em relação aos restantes meios de indução (Tab.4).

Com o intuito de avaliar o alongamento em meio líquido, explantes do limbo com 4 semanas de indução foram submetidos a condições de imersão permanente, no entanto sem sucesso relativamente à formação de rebentos, tendo-se verificado a formação de umas estruturas nodosas e compactas nos explantes com morfologia irregular (Fig. 11).

Tabela 4- Registo dos parâmetros de caracterização dos rebentos caulinares provenientes de diferentes tratamentos na fase de indução do processo de organogénese, após o seu enraizamento *in vitro*. Os valores apresentados correspondem ao valor médio \pm SD (n>8).

TRATAMENTO	Nº MÉDIO DE RAÍZES	COMPRIMENTO MÉDIO DA MAIOR RAIZ (CM)	CALO NA BASE (NÃO/SIM)	COMPRIMENTO MÉDIO DO REBENTO (CM)	RAÍZES SECUNDÁRIAS (SIM/NÃO)
CB1	2,83 \pm 1,1	5,33 \pm 0,5	100% N	1,75 \pm 0,7	100% S
CB2	2,87 \pm 1,7	5,63 \pm 1,7	80% N 20% S	2,97 \pm 1,3	7% N 93% S
CB3	3,13 \pm 1,8	5,88 \pm 1,3	100% N	2,75 \pm 1,9	100% S
CB5	2,63 \pm 1,3	7,31 \pm 2,5	7% S 93% N	3,00 \pm 1,0	100% S

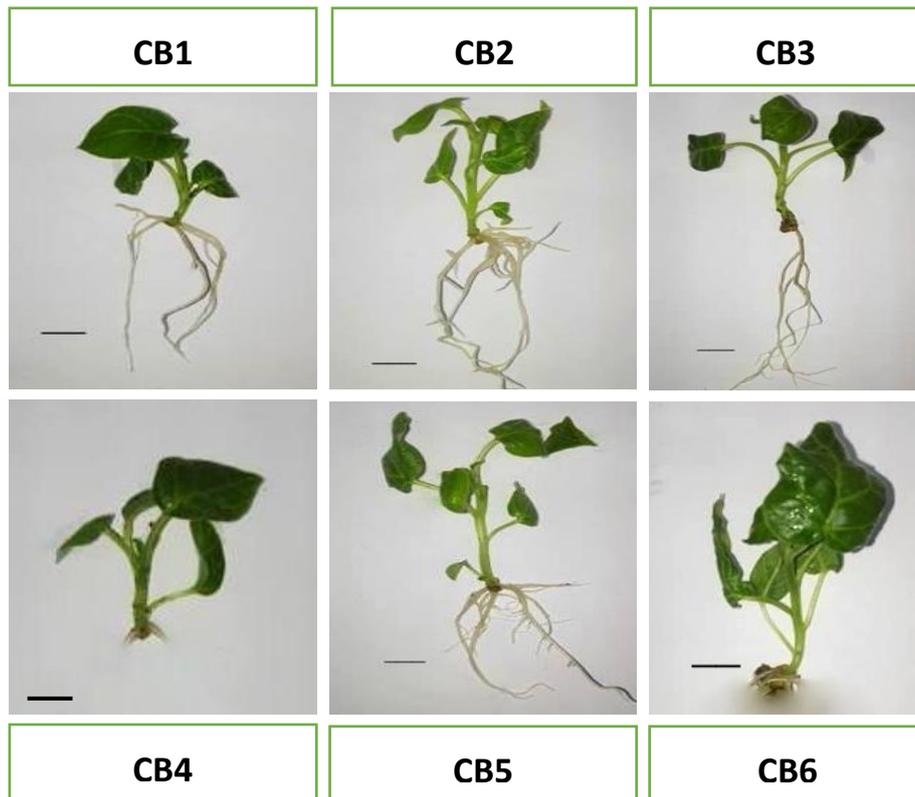


Figura 10- Enraizamento *in vitro* de rebentos de tamarilho vermelho provenientes de diferentes meios de indução de organogênese. As barras correspondem a 1 cm.

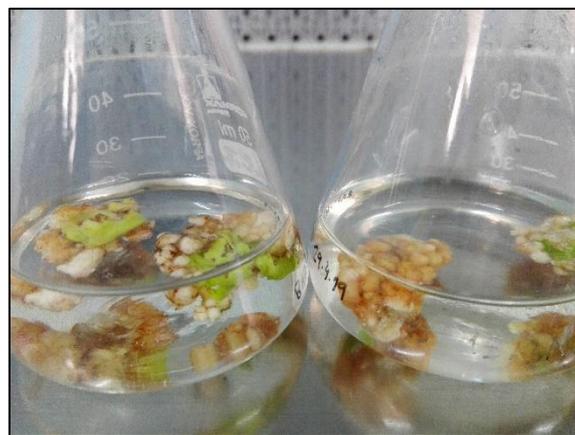


Figura 11- Explantes do limbo com 4 semanas de indução, em meio de alongamento celular e em condições de imersão permanente.

Na fase de aclimatização (Fig. 12) todas as plantas provenientes de uma organogênese bem-sucedida foram aclimatizadas com sucesso. As plantas apresentaram um bom desenvolvimento radicular e da parte aérea, com folhas grandes e cor verde intensa.



Figura 12- Diferentes estádios de aclimatização das plantas provenientes do processo de organogênese. (A) Após 2 semanas; (B) Após 4 semanas; (C) Após 6 semanas de aclimatização.

3.2. Proliferação de calo embriogénico em sistemas de imersão permanente

Nos resultados referentes à proliferação de calo embriogénico em imersão permanente em meio líquido (Fig. 13) verificaram-se diferenças significativas entre o crescimento de calo no meio líquido e no controlo em meio sólido, sendo que no meio líquido o incremento foi superior ao fim de 3 e 6 semanas em relação ao meio sólido. Houve um visível crescimento e desenvolvimento do calo embriogénico em meio líquido, atingindo um incremento de aproximadamente 140 mg, a partir de uma massa inicial de 40 mg. No meio sólido houve um ligeiro aumento da massa de calo nas primeiras 3 semanas de cultura, no entanto o mesmo não se verificou ao fim de 6 semanas de cultura. Desta forma, o meio líquido mostrou ser o melhor para a proliferação de calo embriogénico.

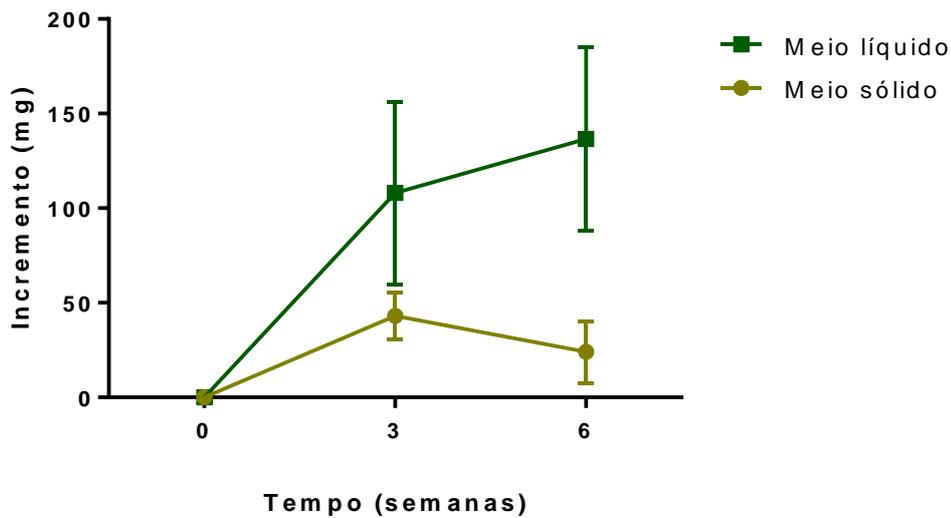


Figura 13- Proliferação de calo embriogênico em meio sólido e líquido, com o respectivo incremento em mg, ao fim de 3 e 6 semanas de cultura.

Parte desse calo que esteve em proliferação em meio líquido (Fig. 14A) foi transferido para meio de desenvolvimento (MS com 4% de sacarose, sem auxinas), que levou à formação de embriões (Fig. 14B). O número de embriões resultantes de calo que esteve em proliferação no meio líquido foi significativamente superior, em comparação com o meio sólido (Fig. 15A). Após a transferência dos embriões para meio de germinação ocorreu o desenvolvimento de plântulas (Fig. 14C), também em número superior no meio líquido, proporcionalmente ao que já se verificava na etapa de desenvolvimento dos embriões, embora não significativamente (Fig. 15B).

Devido a problemas técnicos durante a fase de aclimatização, nenhuma das plântulas obtidas, quer no sistema de proliferação de calo em meio líquido quer em meio sólido, sobreviveu, pelo que não foi possível avaliar as taxas de sobrevivência após a fase de aclimatização.

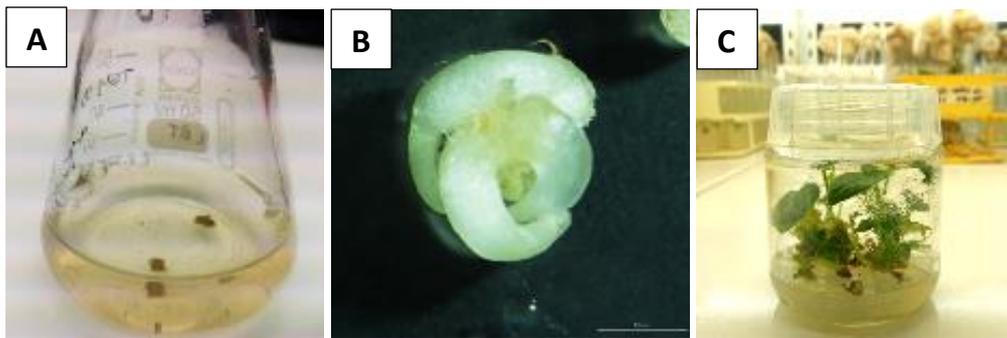


Figura 14- Embriogênese somática. A) Proliferação de CE em meio líquido; B) Embrião resultante da proliferação de CE em meio líquido; C) Formação de plântulas.

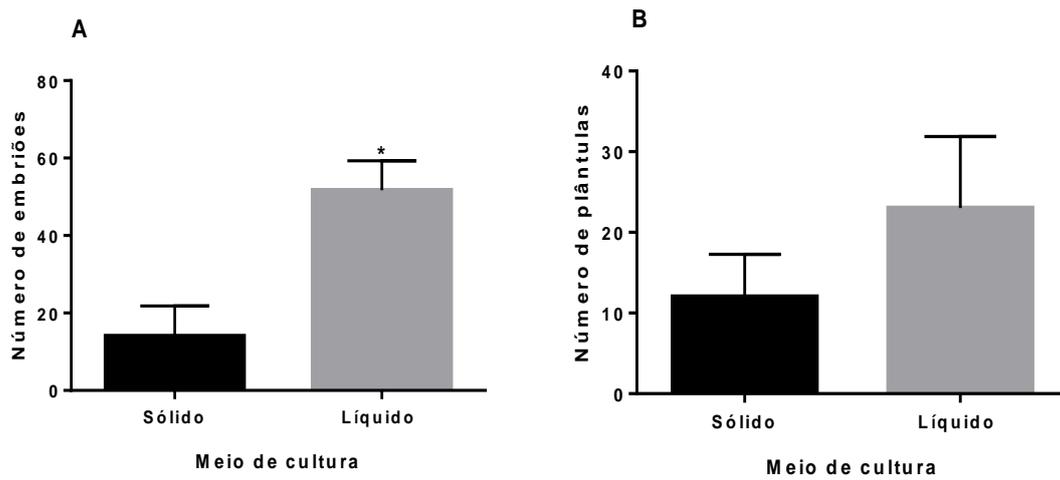


Figura 15- Embriogênese somática. A) Número de embriões; B) Número de plântulas formadas a partir de CE em meio líquido e sólido de proliferação. * indica diferenças significativas nos tratamentos.

3.3. Proliferação de rebentos em biorreator de imersão temporária

Neste ensaio foram testadas diferentes composições do meio de cultura, assim como condições de imersão (Tab. 2, secção 2.2.4, Material e Métodos) para a proliferação de tamarilho em biorreatores de imersão temporária.

Para o material em cultura nos biorreatores A e B (meio de cultura com 0,5 e 1,0 mg/l de BA, respetivamente) observou-se que, após 4 semanas de cultura, era visível o alongamento acentuado dos segmentos, no entanto não se verificou o desenvolvimento de rebentos axilares (Fig. 16). De salientar ainda, o comportamento de alguns rebentos provenientes do biorreator B, onde se observou a presença de raízes (Fig. 16).

O alongamento dos rebentos foi quantificável, através do registo do seu tamanho médio, verificando-se diferenças significativas nos dois biorreatores, sendo que no biorreator A foi de $4,8 \pm 1,47$ cm e no biorreator B de $5,7 \pm 1,32$ cm (Fig. 17). De qualquer modo, e ao longo do tempo de cultura dos rebentos em ambos os biorreatores, os explantes não apresentaram sinais de hiperidricidade, mostrando-se vigorosos, alguns com um tamanho considerável e a formação de pelo menos 3 folhas por rebento.

Com o objetivo de se conseguir taxas de multiplicação efetivas, foram realizados mais ensaios com diferentes meios e condições de cultura (Fig. 18). À semelhança dos testes anteriores, analisou-se o comportamento e o desenvolvimento dos rebentos no BIT. Ao fim de 3 semanas o desenvolvimento dos rebentos axilares era já visível (Fig. 18A e 18B), mantendo-se a sua cor verde original. No entanto, após 4 semanas de cultura verificou-se uma oxidação acentuada da totalidade dos explantes e em todos os meios de cultura testados (Fig. 18C).

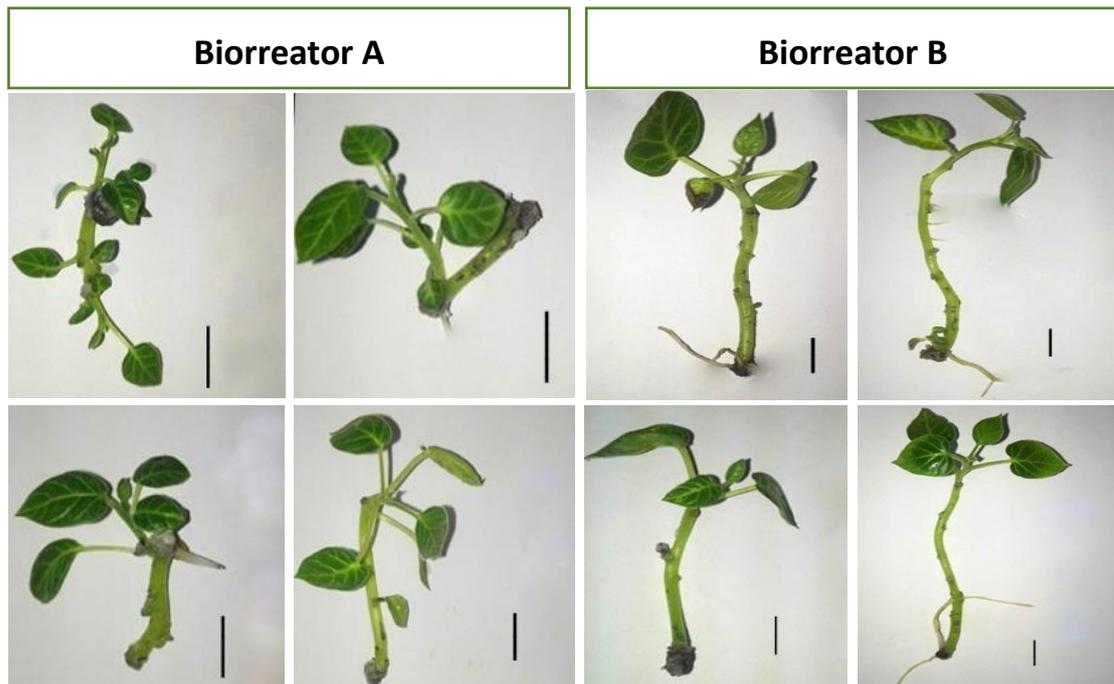


Figura 16- Segmentos resultantes de biorreator de imersão temporária (A e B), após 4 semanas de cultura. Nos rebentos do biorreator B observaram-se raízes. As barras correspondem a 1 cm.

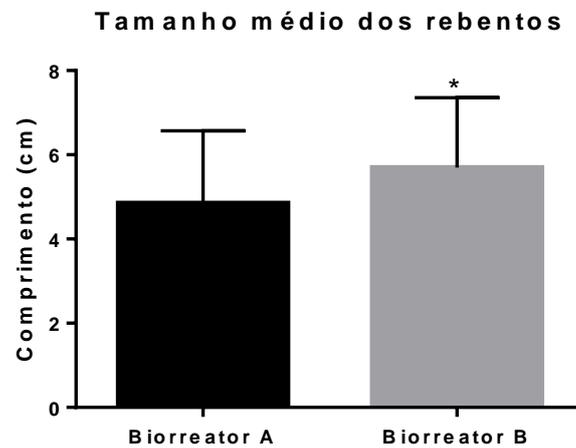


Figura 17- Tamanho médio dos segmentos provenientes dos dois biorreatores (A e B), com composições diferentes do meio de cultura,* indica diferenças significativas nos tratamento. $p \leq 0,05$

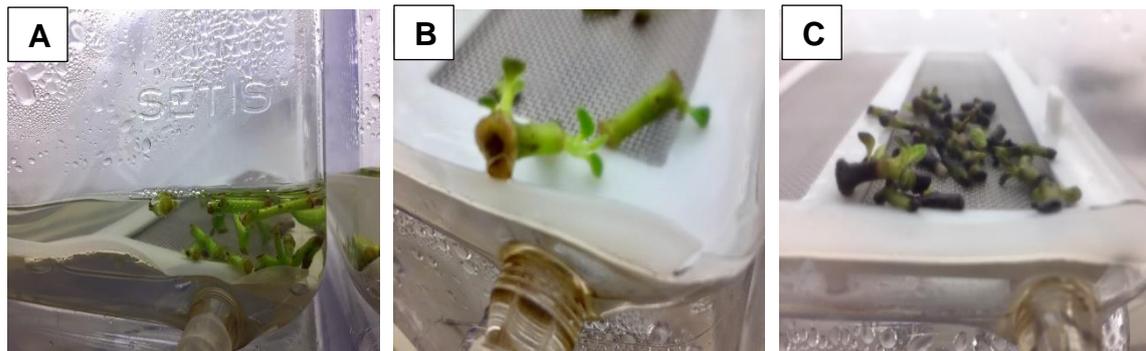


Figura 18- Comportamento dos segmentos de tamarilho em biorreator de imersão temporária ao longo do tempo. (A) 1 semana de cultura; (B) 3 semanas; (C) 4 semanas.

3.3.1. Enraizamento dos rebentos e aclimatização das plantas provenientes dos biorreatores de imersão temporária

O enraizamento dos rebentos, provenientes dos biorreatores A e B, foi realizado *ex vitro* (Fig. 19) e ao fim de 3 semanas observou-se um desenvolvimento radicular mais rápido e mais acentuado nas plantas provenientes do Biorreator B (Fig. 19D), cujo meio de cultura utilizado na fase de proliferação continha 1,0 mg/L de BA. Para as plantas do Biorreator A o processo de enraizamento foi realizado exatamente nas mesmas condições, no entanto a formação de raízes foi mais tardia (Fig. 19B).

A aclimatização das plantas ocorreu em simultâneo com o seu enraizamento, obtendo-se taxas de 75% de sobrevivência das plantas do Biorreator A e 92% para o biorreator B. As plantas do biorreator A eram notoriamente menos desenvolvidas (Fig. 19A e 19B), em comparação com as do biorreator B, que se apresentavam mais vigorosas e com uma expansão foliar (Fig. 19C) e radicular (Fig. 19D) mais evidentes.

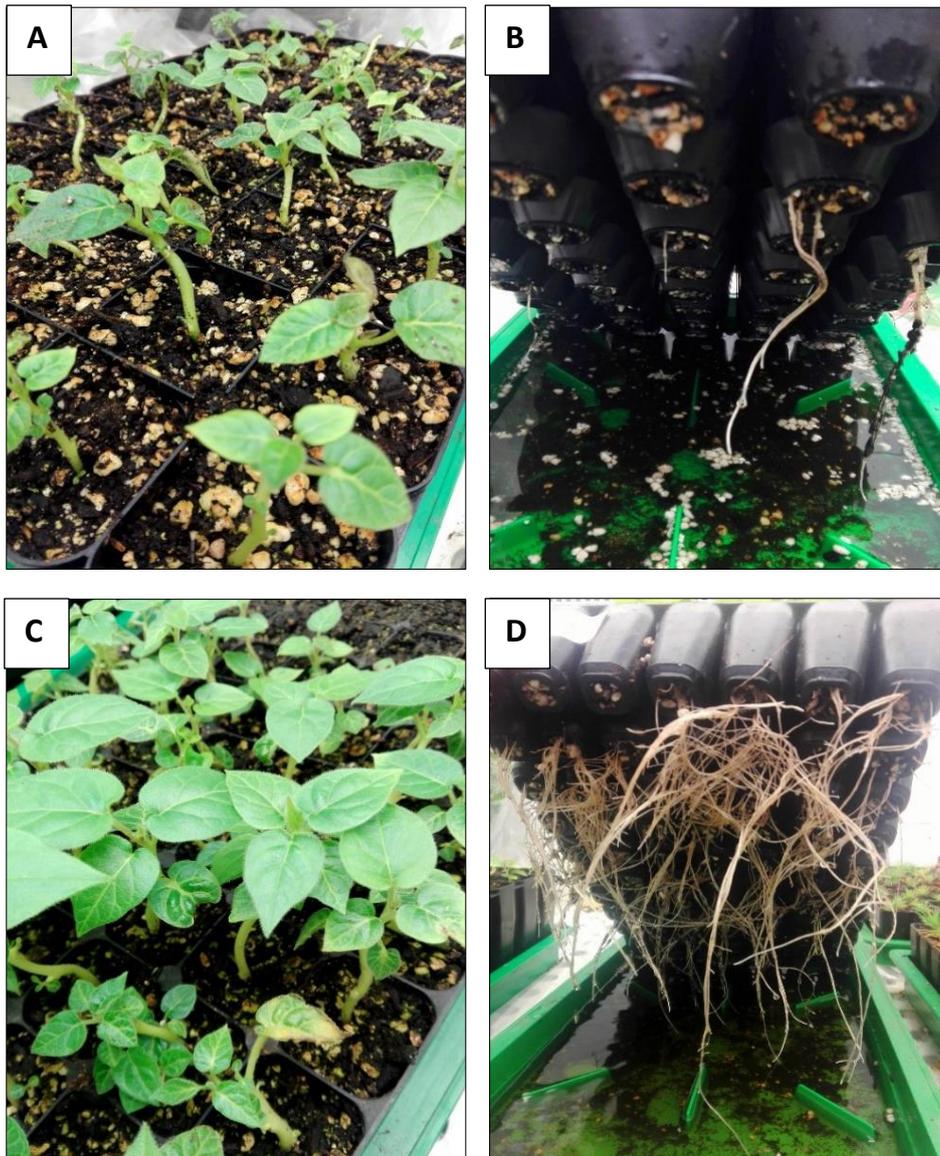


Figura 19- Aclimatização de plantas de tamarilho provenientes de biorreator de imersão temporária (Bioreator A e B) e desenvolvimento radicular correspondente.

3.4. Parâmetros de crescimento e estado fisiológico das plantas aclimatizadas provenientes de organogénese e biorreatores de imersão temporária

Após a fase de aclimatização, para avaliar os parâmetros de crescimento e desenvolvimento das plantas, foram pesadas as biomassas da parte aérea e radicular e registada a altura das plantas, obtidas através dos diferentes métodos de propagação e também de um grupo de plantas, obtidas através da germinação de sementes, e que funcionou como controlo, cuja metodologia está explicada nos métodos na secção 2.2.1.

Como é visível na figura 19, as plantas provenientes da germinação de sementes apresentaram uma área foliar maior e raízes mais desenvolvidas. No que diz respeito à quantificação da biomassa da raiz e parte aérea, esse mesmo grupo das plantas distinguiu-se significativamente das restantes, com valores de peso seco que ultrapassam os 400 mg (Fig. 21A e B).

Comparando apenas as plantas obtidas através dos diferentes métodos de propagação, pode observar-se que as plantas obtidas na condição CB1 (1 mg/L BA na indução de organogénese) e do biorreator B (1 mg/L BA) foram as que apresentaram valores de biomassa mais baixos, o que se confirma pela análise da figura 20. Foram também as que apresentaram um maior comprimento (maior alongamento), sendo de registar uma relação inversa entre a biomassa (Fig. 21A e B) e a altura da planta (Fig. 21 C). Estes 2 grupos de plantas apresentaram ainda valores superiores de potencial hídrico (Fig. 21D).

Relativamente à altura das plantas (Fig. 21C), as médias registadas para o comprimento da parte aérea das plantas dos vários tratamentos mostraram ser significativamente diferentes. As plantas provenientes de organogénese do meio de indução CB3 (3,0 mg/L BA na indução de organogénese) e as plantas do biorreator A (0,5 mg/L BA na proliferação de rebentos axilares) destacaram-se pelo facto de terem registado valores inferiores, em simultâneo com valores altos de biomassa, o que revela a maior robustez destas plantas comparativamente aos outros tratamentos.

O parâmetro do potencial hídrico (Fig. 21D) é um indicador bastante importante para a compreensão das relações hídricas nas plantas e entre estas e o meio exterior (solo e atmosfera). O grupo das plantas do biorreator A apresentaram um valor maior neste parâmetro, comparativamente com os restantes tratamentos, com valores de $-0,5$ MPa, aproximadamente.

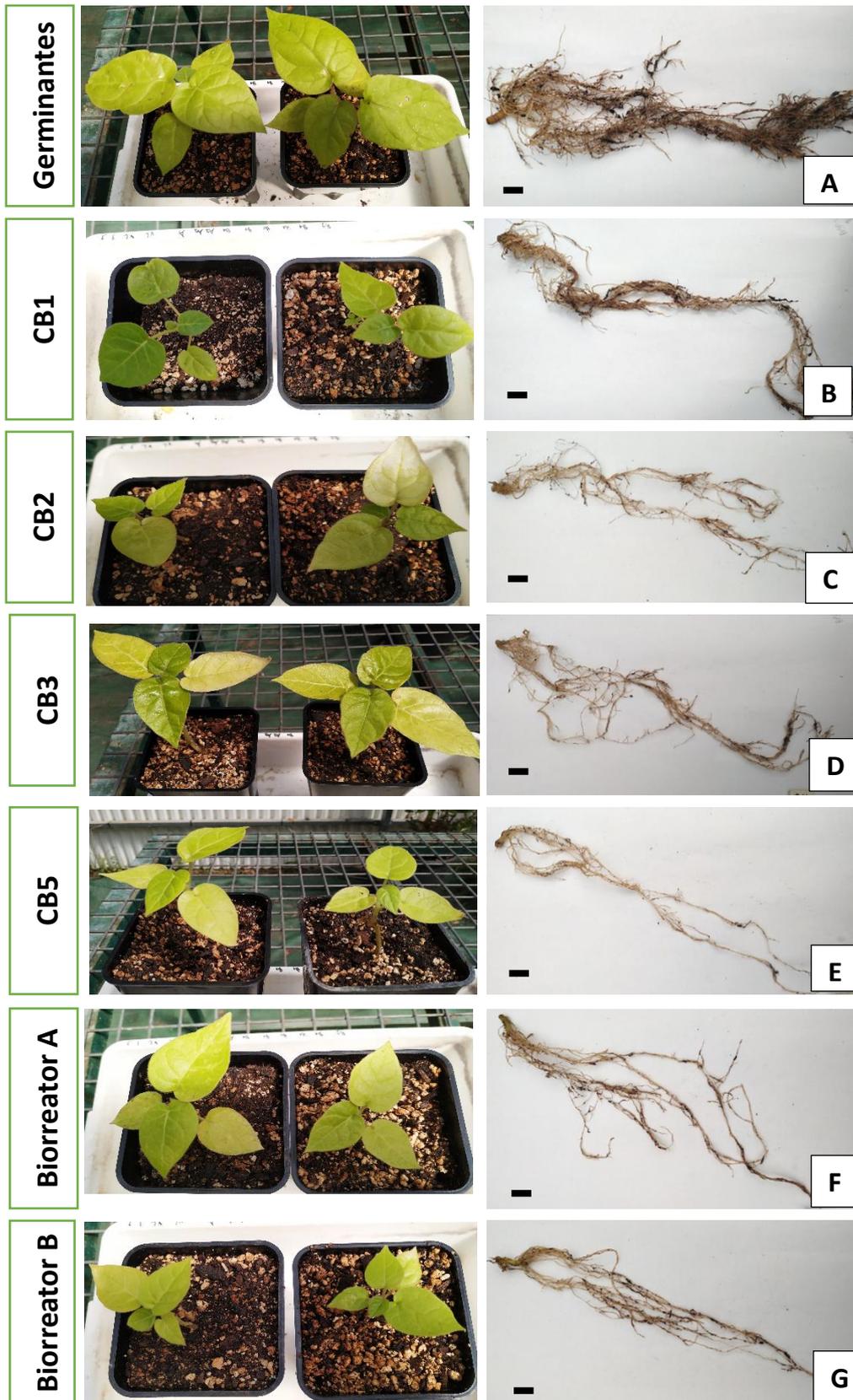


Figura 20- Plantas representativas dos diferentes tratamentos em estudo e raízes correspondentes, após a fase de aclimatização. Destaque da parte aérea e radicular. As barras correspondem a 1 cm.

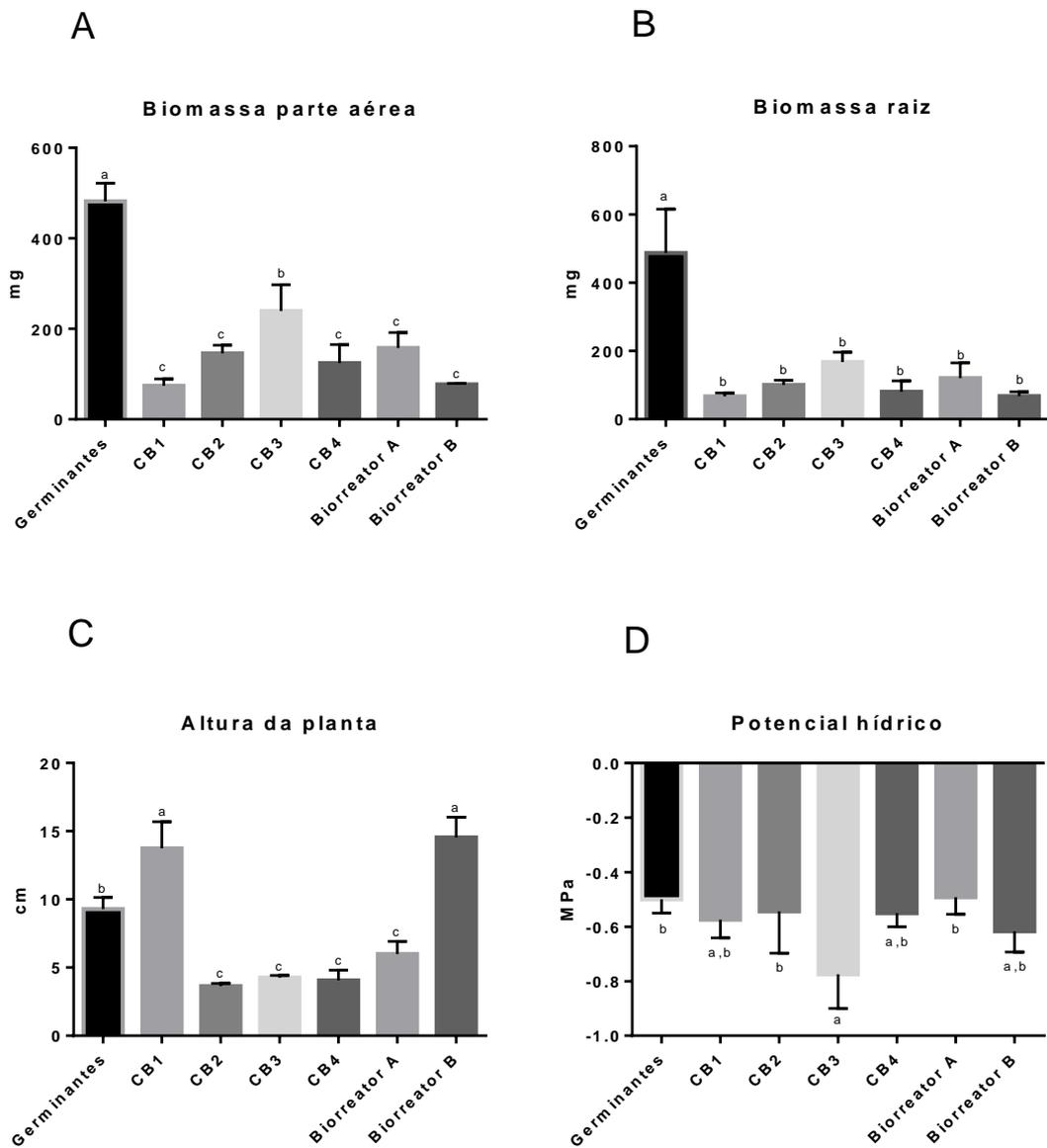


Figura 21- Parâmetros de crescimento e desenvolvimento e estado hídrico das plantas aclimatizadas. Letras diferentes representam diferenças significativas, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Relativamente aos parâmetros de trocas gasosas efetuadas pelas plantas foi analisado o conteúdo intracelular de CO₂ (ci), a taxa de transpiração (E), a condutância estomática (gs), as médias de assimilação de CO₂ (A) e a *intrinsic water use efficiency* (WUEi) (Fig. 22).

Para o parâmetro ci (Fig. 22A) não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos. Em todos eles o conteúdo intracelular de CO₂ manteve-se entre os 200 e os 300 ppm, com poucas oscilações entre os diversos tratamentos.

No parâmetro E (Fig. 22B) os resultados foram semelhantes ao que se observou em A (Fig. 22D). As taxas de transpiração assim como a assimilação de CO₂ foram superiores em plantas provenientes do biorreator A.

Relativamente à gs (Fig. 22C) constatou-se que a condutância estomática foi superior nas plantas do tratamento do biorreator A, ainda que não se tenham verificado diferenças significativas.

Sendo WEUi (Fig. 22E) o rácio dos dois parâmetros previamente descritos, e tal como era esperado, as plantas do biorreator A apresentaram uma maior eficiência no uso de água, embora não se tenham verificado diferenças significativas entre as plantas dos outros tratamentos.

Na avaliação da fluorescência da clorofila a, também não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos, tendo os valores do rendimento máximo oscilado entre os 0,6 e 0,8.

No rendimento quântico do fotossistema II (Fig. 23 A) não se observaram diferenças significativas nos tratamentos, no entanto na eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fig. 23B) já se verificaram diferenças significativas, sendo que as plantas provenientes de organogénese do meio CB1 (1 mg/L BA) apresentaram valores superiores à semelhança das germinantes, em comparação com os outros tratamentos.

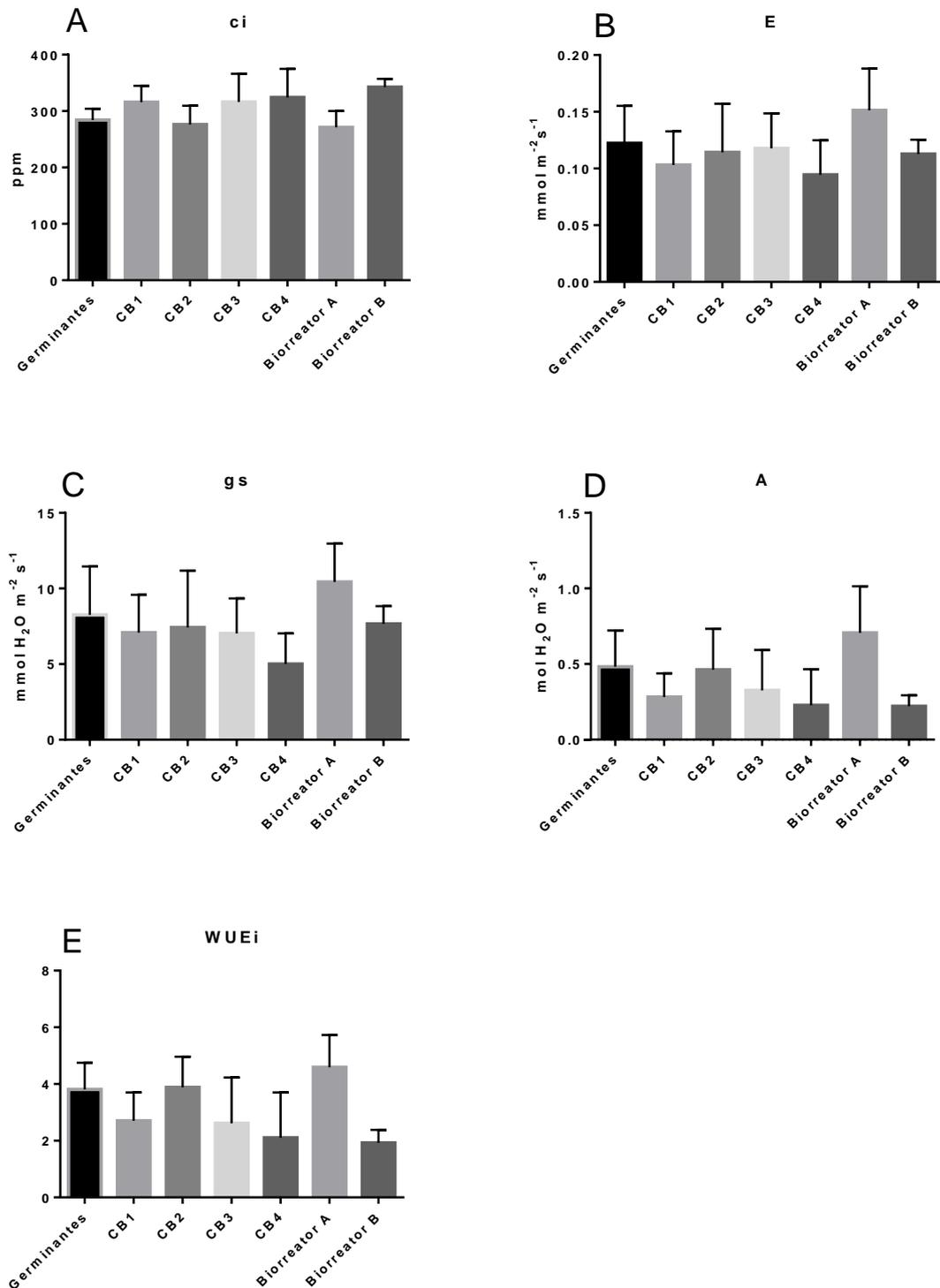


Figura 22- Parâmetros fotossintéticos registrados nas plantas provenientes de organogênese e dos biorreatores. A) Conteúdo intracelular de CO₂ (ci); B) Taxa de transpiração (E); C) Condutância estomática (gs); D) Assimilação de CO₂ (A); E) Intrinsic water use efficiency.

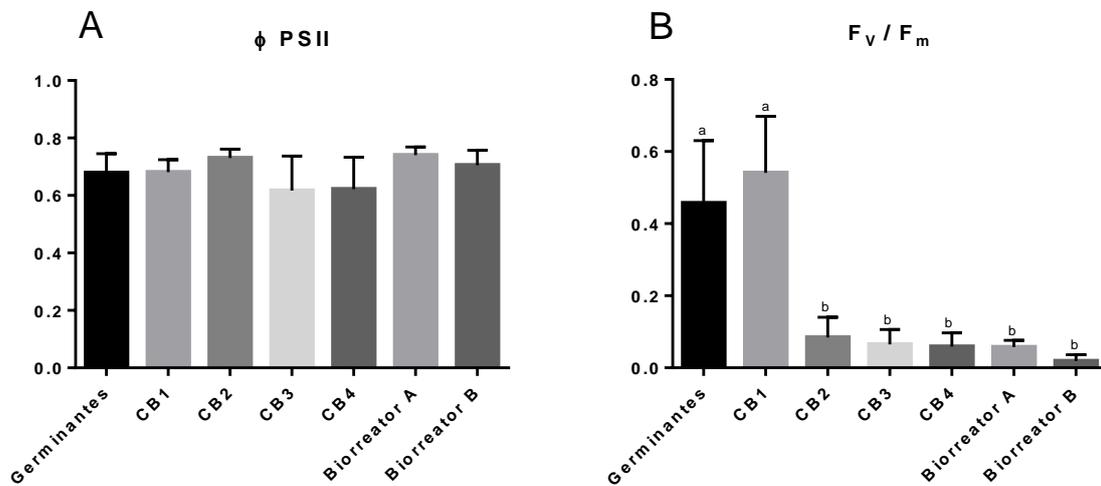


Figura 23- Parâmetros de fluorescência da clorofila. A) Rendimento quântico do fotossistema II (PSII); B) Eficiência fotoquímica do fotossistema II (F_v/F_m). Letras diferentes representam diferenças significativas, segundo o teste Tukey ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO



4.1. Organogênese

4.1.1. Otimização das condições de indução

Ao longo dos ensaios realizados, a citocinina BA mostrou desempenhar um papel fundamental na indução de rebentos de tamarilho, uma vez que em todos os tratamentos em que este regulador de crescimento foi utilizado isoladamente, ocorreu a formação de rebentos. Em conjugação com a metatopolina (mT, meios CB4 e CB5) e com o NAA (meio CB6), em concentrações específicas, também ocorreu a formação de rebentos. O mesmo não aconteceu quando se utilizou a metatopolina isoladamente ou em combinação com outros reguladores de crescimento. Dos resultados obtidos foi também possível observar que os explantes do limbo foliar têm melhor capacidade de regeneração do que os explantes de pecíolos quando cultivados em meio suplementado com BA.

O efeito do BA na indução da formação de rebentos é descrito em vários trabalhos e foi estudado em diferentes espécies de plantas lenhosas ou não e em diversos explantes (Atkinson e Gardner, 1993; Ntui *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2012). Esta tem sido referida como a citocinina mais utilizada na indução de organogênese, aplicada isoladamente ou em combinação com as auxinas NAA e IBA, estas últimas numa concentração baixa (Mousavi *et al.*, 2012). No caso da aplicação isolada do BA, é comumente referido que os meristemas adventícios se formam com frequência a partir de estruturas nodulares compactas (Atkinson e Gardner, 1993).

Embora existam vários fatores que possam influenciar a resposta organogénica, há muito tempo que se conhece que este tipo de morfogénese é regulado por um balanço entre auxinas e citocininas (Skoog e Miller, 1957). No entanto, no caso do tamarilho e nas combinações de reguladores de crescimento testadas, apenas se obtiveram rebentos no meio CB6 (1,0 mg/L BA + 0,25 mg/L NAA).

Nos meios CB4 e CB6 verificou-se um reduzido número de rebentos formados, e uma acentuada formação de calos em praticamente todo o explante, comportamento este que pode justificar a inibição da formação de rebentos, descrito noutras espécies (Dal Vesco e Guerra, 1999; Mantovani *et al.*, 2001). Esta formação de calo na extremidade dos explantes já foi discutida e estudada em várias espécies, incluindo o tamarilho (Atkinson e Gardner, 1993; Guimarães, 1996; Moyom *et al.*, 2009; Sujatha *et al.*, 2005).

A formação de raízes no meio CB6, poderá estar associada à presença de concentrações elevadas da auxina NAA no meio de cultura. O papel das auxinas na cultura de tecidos tem sido descrito como fundamental na organização de meristemas, promovendo a formação de tecido desorganizado (calo) ou órgãos definidos, geralmente raízes (Gaspar *et al.*, 1996). Na cultura de tecidos, o NAA é muitas vezes utilizado em conjugação com BA para indução de organogênese. O seu efeito na indução de rebentos caulinares verifica-se a baixas concentrações, uma vez que à medida que estas vão aumentando, o seu efeito é mais acentuado na formação de calo (Moyom *et al.*, 2009), o que acaba por inibir a formação de rebentos (Mezzetti *et al.*, 1996; Dal Vesco e Guerra, 1999; Mantovani *et al.*, 2001) e a formação de raízes.

É de salientar que o papel das auxinas e citocininas na cultura de tecidos, nomeadamente na formação de calo e raízes tem sido alvo de estudo não apenas no tamarilho (Guimarães *et al.*, 1991; 1996) mas também noutras espécies da mesma família como a beringela, o tomateiro e na batateira (Esna-Ashari e Villiers, 1998; Anjum e Ali, 2004) associado a diferentes tipos de explantes.

A formação de raízes também é um exemplo de organogênese, mas em termos de micropropagação interessa apenas obter gemas caulinares que, após sofrerem alongamento e darem origem a rebentos que possam ser enraizados e formar plantas. Pode haver formação de meristemas adventícios que se desenvolvem em rebentos caulinares ou formação de um calo a partir do qual se diferenciam gemas. Em algumas espécies a formação de nódulos organogénicos, estruturas compactas, de forma esférica podem multiplicar-se de forma autónoma e evoluir em rebentos caulinares (Hussain *et al.*, 2012). No meio CB6, onde se verificou a formação de raízes a partir dos explantes, observou-se a formação de rebentos, que está de acordo com a referência mencionada. No entanto, durante a fase de enraizamento os rebentos não formaram raízes adventícias. Tudo indica que a presença do NAA no meio CB6 de indução inibiu o enraizamento dos rebentos. No meio CB4, houve formação de calo e de rebentos, no entanto também não se verificou a formação de raízes, na fase de enraizamento. Por sua vez, nos ensaios com os meios CB1, CB2, CB3 e CB5 observou-se a formação de gemas e o enraizamento realizou-se com sucesso em todas as plantas obtidas.

Nos ensaios efetuados determinou-se a concentração e o regulador de crescimento ideal para a formação de rebentos. Após realizar todos os ensaios referidos, considerou-se que o meio CB2 (2,0 mg/L BA) era o melhor para a indução de organogênese em tamarilho. Este apresentou resultados mais consistentes e um número e tamanho médio de rebentos superior. Usando a citocinina combinada com o NAA ou com a mT, a ação calogénica intensifica-se e a formação de rebentos diminui. Adicionalmente, é referido em alguns trabalhos que ao aumentar a concentração de BA a proliferação de calo diminui (Mezzetti *et al.*, 1996).

Relativamente aos restantes meios, os resultados não foram positivos na formação de rebentos caulinares, no entanto a ocorrência de oxidação em explantes de plantas lenhosas é um problema comum (Jaskani *et al.*, 2008). Este comportamento é por vezes explicado tendo por base o etileno. Assim, verificou-se que ensaios realizados com compostos que promovem a libertação de etileno, de que é exemplo o etefon (ácido 2-cloroetanofosfónico) ou com compostos que inibem a produção (cloreto de cobalto) ou a ação (nitrato de prata) do etileno os processos de organogénese e embriogénese somática são afetados (Neves, 2018). Esses estudos têm mostrado que o etileno promove a formação de calos em algumas espécies enquanto a organogénese e a embriogénese somática são inibidas provavelmente devido aos seus efeitos inibitórios no transporte polar de auxinas (Taiz *et al.*, 2014), sendo esta uma possibilidade que pode justificar a não formação de rebentos nos restantes meios de cultura. Santana *et al.* (2006) relataram os efeitos do etileno sobre explantes de pimenta durante a indução de rebentos. Ambos os estudos evidenciaram a alta sensibilidade da espécie à acumulação de etileno nos recipientes de cultura.

Nos resultados obtidos, os recipientes também pode ter tido influência no facto de não se ter verificado a formação de rebentos. A oxidação presente em alguns dos explantes nas *multiwell* pode ser explicada pelo facto de que os tubos permitem a libertação de etileno através das rolhas de algodão e as *multiwell* serem seladas e terem um volume de atmosfera muito reduzido (Neves, 2018), daí o aumento da oxidação e consequente inibição da formação de rebentos axilares

Os resultados relatados por Niedz e Evens (2011) confirmaram o potencial da mT na possível substituição de BA em cultura de tecidos e, particularmente, na organogênese *in vitro*. No entanto os resultados obtidos em tamarilho com mT não parecem confirmar o efeito benéfico da mT. Pesquisas anteriores, realizadas em *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*, relataram uma maior taxa de proliferação, em meio de cultura suplementado com 1 mg/L de BA, em comparação com a mT (Bordón *et al.*, 2000; Moreira-Dias *et al.*, 2000).

A ação dos diferentes reguladores de crescimento no comportamento dos explantes é condicionada por outros fatores, entre eles, a espécie e o tipo de explante que se utilizam. Numa mesma família de plantas um regulador de crescimento é mais eficaz num tipo de explante, enquanto que noutra espécie o efeito pode ser oposto. A regeneração de rebentos a partir da técnica de organogênese tem sido descrita como dependente e afetada por diferentes fatores como a combinação de reguladores de crescimento, o tipo de explante e o genótipo (Guimarães *et al.*, 1996; Magioli e Mansur, 2005; Moyom *et al.*, 2009; Ntui *et al.*, 2009).

Na avaliação do alongamento em meio líquido, onde explantes do limbo com 4 semanas de indução foram submetidos a condições de imersão permanente, não se observou a formação de rebentos, apenas se verificou a formação de estruturas rígidas nos explantes e com formas irregulares. Este comportamento pode ser explicado tendo em conta que a imersão permanente dos explantes pode levar à anoxia das culturas (Ziv, 2003). Para além disso, não existe uma orientação gravítica dos explantes no meio de cultura e isso também pode ser conduzido à inibição do desenvolvimento celular e consequente formação de rebentos.

4.2. Proliferação de calo embriogénico

A clonagem de plantas de interesse através de embriogénese somática possui um enorme potencial não apenas na clonagem em larga escala, mas também em estudos de biologia fundamental (Correia e Canhoto, 2012).

O agar é um agente gelificante para meios de cultura e já provou ser eficaz na cultura de células embriogénicas (Correia, 2011). Todavia, em comparação com o meio sólido, os meios líquidos são mais adequados para uma produção em larga escala e adaptáveis para reduzir custos e mão-de-obra (Suarez, 2013). Atualmente, uma cultura líquida de calos derivada da embriogénese somática tem um grande potencial de proliferação a um ritmo acelerado (Thorat *et al.*, 2017). Este trabalho comprova o excelente crescimento de calos embriogénicos de tamarilho em meio líquido, com taxas de proliferação superiores, comparativamente com o meio sólido, que levou consequentemente há formação de um maior número de embriões e posteriormente de plântulas. Os resultados obtidos por Alves *et al.*, 2017 em tamarilho, comprovam a eficiência de culturas de células embriogénicas em suspensão que foram estabelecidas a partir de 40 mg de células em 20 mL de meio líquido, o que vai de encontro aos resultados obtidos neste trabalho. Também nos ensaios realizados por Wang *et al.*, 2019, a proliferação de massas embriogénicas de *Anthurium andraeanum* em meio líquido destacou-se apresentando um maior crescimento e na suspensão de células vegetais observou-se um longo período de crescimento no estágio inicial da proliferação.

O meio líquido como sistema de proliferação tem sido usado em muitas espécies, por exemplo, cacau (*Theobroma cacao*, Niemenak *et al.*, 2012), café (*Coffea arabica*, Ribas *et al.*, 2011), cenoura (*Daucus carota*, de Vries *et al.*, 1988; Komamine *et al.*, 2005), tomateiro (*Solanum lycopersicum*, Blewett *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004), batateira (*Solanum tuberosum*, Vargas *et al.* 2005), faia (*Fagus sylvatica*, Vieitez *et al.*, 1992) e tamareira (*Phoenix dactylifera*, Sané *et al.*, 2006). Além disso, a cultura de suspensão de células embriogénicas oferece a possibilidade de propagação clonal em larga escala em biorreatores, e os embriões de suspensões celulares podem ser utilizados para armazenamento a longo prazo em bancos de germoplasma (Chawla, 2009).

4.3. Multiplicação de rebentos axilares em biorreator de imersão temporária

A micropropagação de plantas é um conjunto de técnicas que têm vindo a ser cada vez mais aplicadas com sucesso na clonagem de um vasto número de espécies, através da aplicação da cultura de meristemas, organogénese ou embriogénese somática (Rathore *et al.*, 2004; Read e Bavougian, 2013). No entanto, as plantas lenhosas são geralmente consideradas mais difíceis de propagar através destas técnicas (Rathore *et al.*, 2004). Para além disso, a cultura de tecidos de plantas lenhosas apresenta alguns problemas relacionados com as particularidades do seu desenvolvimento, o que é relevante quando se pretende estabelecer *in vitro* clones selecionados pelas suas características de interesse e que já não se encontram na fase juvenil do desenvolvimento (von Aderkas e Bonga, 2000). Outro entrave é o facto de os explantes apropriados para cultura *in vitro* por vezes estarem apenas disponíveis em determinadas alturas do ano, a não ser que os clones selecionados sejam propagados em estufa, normalmente através de técnicas de macropropagação como a estacaria ou enxertia (Acquaah, 2012). Como forma de ultrapassar estas dificuldades a propagação de plantas de tamarilho em larga escala em biorreatores de imersão temporária (BIT), é mais uma das possibilidades de clonagem desta espécie.

Os ensaios realizados em biorreatores de imersão temporária, cujo meio de cultura foi suplementado com BA (0,5 e 1 mg/L) foram positivos e promissores. Os rebentos provenientes do biorreator B (1 mg/L) apresentaram um tamanho médio superior, em relação aos do biorreator A, o que sugere um maior alongamento dos explantes no meio com a concentração mais alta de BA. Esta citocinina está diretamente relacionada com a divisão celular, favorecendo o desenvolvimento de rebentos axilares (Andrade *et al.*, 2006). No entanto, nos ensaios realizados, isso não se verificou. Existem reguladores de crescimento, como a cinetina, que tem a capacidade de aumentar o número de microtubos das células (Romanov, *et al.*, 2000), o que leva a um alongamento. O que se verificou nos resultados obtidos foi precisamente um alongamento acentuado dos rebentos de tamarilho, que pode ter afetado positivamente o enraizamento, em que também se observou a formação de raízes mais desenvolvidas e longas nos rebentos provenientes do biorreator B (1,0 mg/L BA).

Os rebentos cultivados na presença de BA apresentaram características morfológicas adequadas durante o cultivo em BIT, com folhas verdes, caule espesso e sem hiperidricidade. Oliveira *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes, em que rebentos de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophyllacultivadas* em meio com baixa concentração de BA também não apresentaram sintomas de hiperidricidade no cultivo em biorreator. Em geral, verificou-se uma grande heterogeneidade no crescimento dos explantes, para um mesmo tratamento, em todos os ensaios. Resultados semelhantes foram obtidos nos trabalhos de Correia *et al.* (1995) e Oliveira *et al.* (2011), ambos trabalhando com espécies do género *Eucalyptus*. Essa variação no crescimento *in vitro* dos explantes pode estar relacionada com as características morfológicas inerentes a cada explante, como diâmetro do caule bem como as idades cronológica, fisiológica e ontogénica das culturas (Oliveira *et al.*, 2011).

Estes resultados vão ainda de encontro aos obtidos por Nasri *et al.* (2019), que concluíram que a inclusão de 1,0 mg/L de BA no meio de cultura resulta no alongamento acentuado dos rebentos em comparação com concentrações superiores. Nos ensaios realizados por Jan *et al.* (2019) com a planta medicinal *Saussurea lappa*, a concentração de BA de 1,0 mg/L foi a que apresentou melhor resposta, no que diz respeito ao alongamento da parte aérea em comparação com concentrações de 0,2 e 0,5 mg/L.

O enraizamento realizou-se com sucesso sem adição de PGRs para os rebentos provenientes de ambos os biorreatores, apenas com a transferência dos rebentos de tamarilho para o substrato. O mesmo já foi referido para outras espécies de plantas como a soja (*Glycine max*), o meloeiro (*Colocynthis citrullus*), a marula (*Sclerocarya birrea*) ou a *babchi* (*Psoralea corylifolia*) cujo enraizamento foi conseguido pela simples passagem dos rebentos do meio de indução para um meio sem adição de reguladores de crescimento ou diretamente para substrato (Anis e Faisal, 2005; Barwale, *et al.*, 1986; Ntui, *et al.*, 2009; Moyom, *et al.*, 2011), facto que pudemos confirmar no enraizamento *ex vitro* de tamarilho. Isto revela uma vantagem económica relativamente a outras espécies, em que o enraizamento não é tão simples e económico, e constitui uma mais-valia na perspetiva global do processo de micropropagação da espécie com recurso a biorreatores. Além disso, o enraizamento sem recurso à utilização de auxinas permite evitar a formação de calos e a ulterior diferenciação de raízes a partir desses mesmos calos, situação que muitas vezes leva a uma difícil conexão vascular entre o rebento original e as raízes adventícias que se formam (Canhoto, 2010). As plantas obtidas dos rebentos do biorreator B apresentaram raízes maiores e mais desenvolvidas, o que também pode ter contribuído para o maior desenvolvimento da sua parte aérea.

Relativamente ao comportamento dos segmentos de tamarilho no BIT, em ensaios com outros reguladores de crescimento e com outros tempos de imersão e aeração, verificou-se que nas primeiras 3 semanas os resultados foram favoráveis, tendo-se verificado o início da multiplicação dos rebentos caulinares. Um fator que parece favorecer o crescimento e a multiplicação dos explantes nos biorreatores é a constante renovação do ar durante o período de transferência do meio (Lemos *et al.* 2001). Segundo Debergh (1982) quanto maior a superfície de contacto dos explantes com a solução nutritiva, maior a absorção dos seus compostos nutricionais e, conseqüentemente, maior o crescimento. No entanto, após 4 semanas de cultura, os resultados não foram favoráveis, tendo-se verificado uma oxidação total dos explantes em todos os biorreatores. A oxidação pode ocorrer quando, em contacto com o meio de cultura, os explantes excisados produzem metabolitos secundários, resultando numa coloração acastanhada do tecido levando por vezes à senescência (Takamori *et al.*, 2015). Este comportamento é usualmente observado em situações de stresse, causando alterações na fisiologia e no metabolismo celular, que levam à morte celular (Fehér, 2003). Uma possível explicação para a oxidação dos explantes pode estar relacionada com a intensidade luminosa, uma vez que no biorreator A e B a intensidade luminosa da câmara de crescimento era metade da intensidade da câmara onde se encontravam os restantes biorreatores. Os explantes no biorreator A e B desenvolveram-se normalmente e sem apresentarem oxidação.

4.4. Parâmetros de crescimento e estado hídrico das plantas aclimatizadas

Relativamente aos parâmetros da biomassa e comprimento da planta, as plantas provenientes do BIT, de um modo geral, apresentavam valores superiores em comparação com plantas resultantes do processo de organogénese. As plantas resultantes da imersão temporária tendem a ser mais desenvolvidas quando comparadas com as de meio sólido, em termos de tamanho dos rebentos e biomassa. Isso pode estar relacionado com uma absorção mais eficiente de nutrientes devido à grande área de contacto com o meio, pois os nutrientes também podem penetrar pelas folhas através dos estomas (De Klerk e Ter Brugge, 2011) e, até mesmo pela cutícula, em folhas de rebentos ou plântulas em crescimento *in vitro*, permitindo a troca entre o meio de cultura e os tecidos vegetais (Ferreira *et al.*, 2003). De facto, esta estrutura que reveste os órgãos aéreos tende a ser mais fina nas plantas propagadas *in vitro*, o que pode facilitar a entrada de nutrientes e compensar a deficiente organização estrutural que muitas vezes as folhas de plantas micropropagadas apresentam (Ferreira *et al.*, 2003). As plantas do género *Musa*, propagadas em BIT mostraram parâmetros morfológicos semelhantes aos obtidos por Roels *et al.* (2005),

O potencial hídrico (ψ_w) foi maior em plantas provenientes do biorreator e menor em plantas de organogénese do meio de indução CB3. As plantas obtidas em meio sólido tendem a apresentar um potencial hídrico significativamente mais reduzido, comparativamente a plantas obtidas por outros métodos mais dinâmicos, como o meio líquido (Martins, 2019). A redução do potencial hídrico na planta está intimamente relacionada com a acumulação de solutos orgânicos, que em conjunto com outros mecanismos fisiológicos, como o fecho estomático e a redução da transpiração, contribuem para a manutenção da hidratação dos tecidos (Rosa *et al.*, 2009; Sami *et al.*, 2016).

A frequência de rega das plantas foi a mesma para todas as plantas, no entanto existem necessidades inerentes a cada planta, dependendo por exemplo do desenvolvimento da parte aérea e da parte radicular. Em condições de défice hídrico ocorrem mudanças nos sistemas de transporte de iões de água através de membranas em células-guarda que estimulam o fecho dos estomas, o que afeta diretamente as taxas fotossintéticas e a produtividade das plantas devido aos baixos níveis de CO₂ disponíveis (Osakabe *et al.* 2014).

De acordo com relatórios anteriores (Castell e Terradas, 1994, Gratani e Varone 2004, Navarro-García *et al.*, 2011), a redução da condutância estomática (gs) geralmente ocorre quando existe stresse hídrico na planta. De facto, as plantas desenvolvem mecanismos para se adaptar às condições ambientais desfavoráveis, reduzindo o consumo de recursos e ajustando o seu crescimento (Osakabe *et al.* 2014).

No que se refere ao teor intracelular de CO₂ (ci) não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos. Alguns estudos mostram que o stresse hídrico afeta negativamente o conteúdo intracelular de CO₂ (Dias *et al.*, 2014; Dias e Brüggemann, 2010) devido ao fecho estomático, que para além de proteger as plantas de perda de água, também limita a presença de CO₂ no espaço intracelular das células do mesófilo. No entanto, todas as plantas foram regadas com a mesma frequência e nas mesmas quantidades e os valores são relativamente próximos. Os efeitos da redução da disponibilidade hídrica sobre a taxa fotossintética foram reportados em diversos estudos (Rahmati *et al.*, 2015; Pazzagli *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). A redução na fotossíntese está relacionada com o fecho estomático e a consequente redução do fluxo de CO₂ para fixação (Bosco *et al.*, 2009),

É conhecido que o stresse hídrico é um fator que afeta a condutância estomática (gs) (Souza *et al.*, 2004) e esta parece estar intimamente ligada com a taxa de transpiração (E) e assimilação de CO₂ (A). No caso do tamarilho, em plantas sujeitas a stress hídrico verificou-se uma paragem do crescimento foliar e fecho estomático associado a taxas de transpiração significativamente inferiores, o que por sua vez se reflete na assimilação de CO₂ (A) e na produtividade (Braga, 2015).

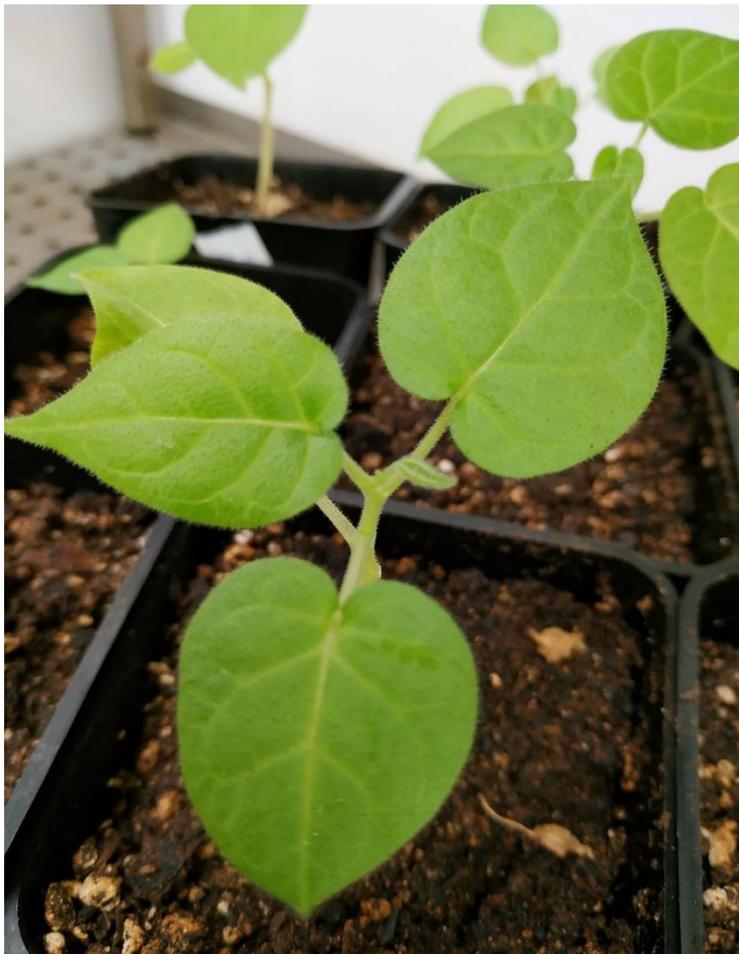
Nestes parâmetros destacaram-se as plantas do biorreator A, com valores ligeiramente superiores, apesar de não se terem observado diferenças significativas. As plantas ao apresentarem taxas de transpiração superiores significa que os estomas estão abertos e conseqüentemente leva ao aumento da assimilação de CO₂. Martins, *et al.* (2019) verificaram que plantas de medronheiro desenvolvidas em meio líquido apresentavam um melhor desempenho em comparação com as produzidas em meio sólido, o que corrobora os resultados obtidos no tamarilho.

Relativamente ao parâmetro *Intrinsic water use efficiency* (WUEi), as plantas cultivadas no biorreator A apresentaram uma eficiência superior. Segundo a bibliografia, as plantas com estas características apresentam uma melhor regulação da função estomática e podem, assim, controlar mais eficazmente a perda de água no primeiro período de aclimação (Hazarika 2003, Perveen *et al.* 2013).

A fluorescência da clorofila é uma ferramenta importante para avaliar o desempenho fotossintético e monitorizar a resposta das plantas ao stresse ambiental (Adams e Demmig-Adams, 2004). De acordo com a bibliografia, o Fv/Fm (eficiência fotoquímica do fotossistema II) está tipicamente entre 0,75-0,85 para plantas não estressadas (Bolhar-Nordenkampf *et al.* 1989). Este parâmetro foi usado com sucesso para registar e acompanhar a adaptação das plantas micropropagadas às mudanças de irradiância durante a aclimatização *ex vitro* (van Huylbroeck *et al.* 1998, 2000). No caso do tamarilho, verificou-se que os resultados obtidos ficam aquém do intervalo de valores definido. Plantas sujeitas ao tratamento CB1 apresentaram valores próximos a 0,6 e todos os outros variaram entre 0 e 0,2, o que sugere a possibilidade de stress das plantas que foram submetidas a este ensaio. A redução do PSII pode estar em grande parte relacionada com uma diminuição da proporção de centros de reação do fotossistema II em estado “aberto” devido ao consumo limitado de NADPH ou à reduzida eficiência na captura da energia de excitação por parte dos centros de reação do PSII (Correia *et al.*, 2006). Por sua vez, no rendimento quântico do fotossistema II, não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos, verificando-se um rendimento superior a 0,6 em todos os tratamentos.

No trabalho realizado, as plântulas obtidas por germinação de sementes foram usadas como controlo na avaliação de parâmetros de desenvolvimento e fisiológicos. A análise dessas plantas permitiu definir os parâmetros de desenvolvimento, que as plantas micropropagadas deveriam apresentar para serem consideradas plantas fisiologicamente aptas (Pringle e Murray, 1991; Prohens e Nuez, 2001; Canhoto *et al.*, 2005). Comparados entre si, os parâmetros registados para os diferentes tratamentos permitiram tirar conclusões, relativamente ao efeito do método de propagação (desde a fase de indução), não só no número, mas também na qualidade e performance das plantas obtidas.

5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS



O recurso às técnicas de cultura *in vitro* tem sido uma das ferramentas mais úteis no melhoramento genético dos cultivares e na manutenção de espécies de interesse, permitindo a sua propagação em larga escala.

O presente estudo permitiu verificar a possibilidade de regenerar *in vitro* plantas de *Solanum betaceum* por organogénese. Nos ensaios efetuados testou-se o potencial organogénico de segmentos do limbo e pecíolos, verificando-se que estes explantes apresentavam capacidade para formar rebentos a partir dos quais se podem obter plantas, como tem vindo a ser descrito para várias famílias de plantas, incluindo diferentes espécies da família das solanáceas, como o tomateiro, a batateira e a beringela entre outras. As diferentes respostas obtidas, consoante a exposição dos explantes aos diferentes tratamentos, demonstrou que a escolha dos reguladores de crescimento é determinante para a resposta morfogénica e capacidade de regeneração dos rebentos.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível verificar que a presença de BA no meio de cultura induz a formação de rebentos, o que corrobora os resultados obtidos por alguns autores e para diferentes espécies. O meio CB2 (2,0 mg/L BA) mostrou ser o melhor meio de indução, uma vez que permitiu obter um número considerável de rebentos e mais do que um rebento por explante. A aclimação das plântulas obtidas por organogénese foi realizada com sucesso. No entanto, mais combinações de reguladores de crescimento ainda podem ser testadas, bem como meios de enraizamento, uma vez que alguns dos rebentos resultantes de organogénese não enraizaram.

De realçar ainda a proliferação de calo embriogénico de tamarilho em meio líquido, cujos resultados foram bastante promissores. Obteve-se um maior crescimento daqueles em meio líquido, bem como um maior número de embriões e consequentemente de plântulas. Este resultado tem todo o interesse uma vez que a cultura de suspensão de células embriogénicas oferece a possibilidade de propagação clonal em larga escala em biorreatores. Um ensaio promissor que ainda não foi realizado em tamarilho, é a formação de embriões e consequentemente de plantas em sistema de imersão temporária imersão temporária, uma vez que neste trabalho apenas se testou a proliferação em meio líquido do calo embriogénico.

Os biorreatores de imersão temporária têm vindo a mostrar resultados bastante interessantes na propagação clonal de um número cada vez maior de espécies. A sua eficácia resulta do facto de ocorrer uma maior disponibilidade de nutrientes e uma melhor oxigenação que se reflete na obtenção de propágulos de melhor qualidade.

Dos resultados obtidos com o tipo de biorreatores que foi utilizado destaca-se o comportamento das plantas do biorreator B (1,0 mg/L BA), no que diz respeito ao alongamento acentuado dos rebentos e aos parâmetros de biomassa. As plantas provenientes do BIT, de um modo geral, apresentam valores dos parâmetros morfológicos e fisiológicos superiores em comparação com plantas resultantes do processo de organogénese, o que remete para perspetivas positivas na utilização desta técnica como método de propagação em larga escala do tamarilho. Todavia, ainda é necessário otimizar o processo para que se possam obter taxas mais elevadas de multiplicação.

Como perspetiva futura, a repetição do ensaio dos biorreatores com diferentes meios de cultura e tempos de imersão seria uma boa aposta, uma vez que a oxidação dos explantes não permitiu observar o comportamento destes, face às variáveis em questão. Outra sugestão é a diminuição da intensidade luminosa na câmara de crescimento, onde se encontram os biorreatores, com vista a evitar a oxidação dos explantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Acosta-Quezada, P.G., Martínez-Laborde J.B., Prohens J. (2011) Variation mong tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) accessions from different cultivar groups: implications for conservation of genetic resources and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 943-960.
- Acquaah, M. (2012) Social networking relationships, firm-specific managerial experience and firm performance in a transition economy: A comparative analysis of family owned and nonfamily firms. *Strategic Management Journal* 33: 1215-1228.
- Adams, W. W. e Demmig-Adams, B. (2004) Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. In: G.C. Papageorgiou, Govindjee (eds) *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, Dordrecht, 19: 583-604.
- Alvard, D., Côte, F.X., Teisson, C. (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell Tiss & Org Cult* 32: 55-60.
- Andrade, W. F., Almeida, M., Gonçalves, A. N. (2006) Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 715-1719.
- Anis, M. e Faisal, M. (2005) *In vitro* regeneration and mass multiplication of *Psoralea corylifolia* – an endangered medicinal plant. *Indian Journal of Biotechnology* 4: 261 – 264.
- Anjum, M. e Ali, H. (2004) Effect of culture medium on direct organogenesis from different explants of various potato genotypes. *Biotechnology* 3: 187 -193.
- Apraez, M., Romo, D., Lagos, B. (2012) Regeneration of tree tomato plants (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt.) induced by organogenesis from callus. *Revista de Ciências Agrícolas* 29: 110-117.
- Aslam, J., Khan, S.A., Cheruth, A.J., Mujib, A., Sharma, M.P., Srivastava, P.S. (2011) Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 369-380.
- Atkinson, R. e Gardner, R. (1993) Regeneration of transgenic tamarillo plants. *Plant Cell Rep* 12: 347 351.
- Barghchi, M. (1986) *In vitro* rejuvenation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo). *Plant Physiology Division Biennial Report, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR), New Zealand*, pp. 52.

- Barghchi, M. (1998) *In vitro* regeneration, plant improvement and vírus elimination of tamarillo [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt]. In: M. R. Davey *et al.* (eds). Tree biotechnology - towards the millennium. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 173-185.
- Barwale, U., Kerns, H., Widholm, J. (1986) Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167: 473-481.
- Blewett, J., Burrows, K., Thomas, C. (2000) A micromanipulation method to measure the mechanical properties of single tomato suspension cells. *Biotechnol Lett.* 22:1877-1883.
- Bohs, L. (1991) Crossing studies in *Cyphomandra* (Solanaceae) and their systematic and evolutionary significance. *Amer J Bot* 78: 1683-1693.
- Bois, D. (1927) *Les plantes alimentaires*, vol I. Paris, Ed. Paul Lechevalier.
- Bolhar-Nordenkamp, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Oquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct Ecol* 3:497-514.
- Bordón, Y., Guardiola, J.L., and García-Luis, A. (2000) Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. *Ann Bot* 86: 159-166.
- Borlaug, N. E. e Dowswell, C. R. (2003). Feeding a world of ten billion people: a 21st century challenge. In: R. Tuberosa, R. L. Phillips e M. Gale (Eds.), *Proceedings of the International Congress "In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution"*, Bolonha, pp. 3-23.
- Bosco, M. R., de Oliveira, A. B., Hernandez, F. F. F., de Lacerda, C. F. (2009). Efeito do NaCl sobre o crescimento, fotossíntese e relações hídricas de plantas de berinjela. *Revista Ceres* 56: 296-302.
- Braga, A. (2015) Estabelecimento *in vitro* de genótipos de tamarillo e avaliação fisiológica das plantas obtidas. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Canhoto, J.M., Lopes, M.L., Cruz, G.S. (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). *Plant Cell Tiss & Org Cult* 57: 13-21.

- Canhoto, J.M., Lopes, M.L., Cruz, G.S. (2005) Protocol for somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). In: S.M., Jain, P.K., Gupta (Eds.) Protocol for Somatic Emryogenesis in Woody plants, Dordrecht, Springer, pp. 379-389.
- Canhoto, J.M., Rama, S., Cruz, G.S. (2006) Somatic embryogenesis and plant regeneration in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *In vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 514 – 519.
- Canhoto, J.M. (2010) Biotecnologia Vegetal: da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Chawla, H. (2009) Introduction to Plant Biotechnology. 3rd Edition. Science Publishers, USA.
- Chrispeels, M. J. e Gepts, P. L. (Eds.). (2018). Plant, Gene and Agriculture – Sustainability through Biotechnology. Sinauer Associates, New York.
- Cid, P. B., Cruz, A. R., Teixeira, J. M. (2002) Biorreatores de imersão permanente. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 25: 50-53.
- Cohen, D. e Elliot, D. (1979) Micropropagation methods for blueberries and tamarillos. *Comb Proc Int Plant Prop Soc* 29: 177-179.
- Correia, D., Gonçalves, A. N., Couto, H. D., Ribeiro, M. C. (1995). Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. 48: 107-116.
- Correia, S. e Canhoto, J. M. (2012) Biotechnology of tamarillo (*Cyphomandra betacea*): From *in vitro* cloning to genetic transformation. *Scientia Horticulturae* 148: 161-168.
- Correia, S., Lopes, M., Canhoto, J. (2009) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. *Act Hort* 839: 157 -164.
- Correia, S. (2011) Somatic embryogenesis in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (tamarillo): optimization and molecular analysis. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra.
- Correia, S., Lopes, M. L., Canhoto, J. M. (2011) Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Trees* 25: 1009-1020.

- Correia, S., Vinhas, R., Manadas, B., Lourenço, A.S., Veríssimo, P., Canhoto, J.M. (2012) Comparative Proteomic Analysis of Auxin-Induced Embryogenic and Nonembryogenic Tissues of the Solanaceous Tree *Chyphomandra batacea* (Tamarillo). *J Proteomic Res* 11: 1666-1675.
- Correia, S., e Canhoto, J. M. (2018) Somatic Embryogenesis of Tamarillo (*Solanum betaceum Cav.*). In *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody*. Cham Plants, Springer, pp. 171-179.
- Correia, S. I., Alinho, A. T., Casimiro, B., Miguel, C. M., Oliveira, M. M., Veríssimo, P., Canhoto, J. M. (2019) NEP-TC a rRNA Methyltransferase Involved on Somatic Embryogenesis of Tamarillo (*Solanum betaceum Cav.*). *Front Plant Sci* 10: 438. Doi: 10.3389/fpls.2019.00438.
- D'Amato, F. (1991) Nuclear Changes in cultured plant cells. *Caryologia* 44: 217-224.
- Dal Vesco, L. e Guerra, M. (1999) Organogénese e micropropagação de goiabeira serrana. *Rev Bras de Frutic* 21: 60-64.
- Dawes, S.N. e Pringle, G.L. (1983) Subtropical fruit from South and Central America. In: Wratt GS *et al.* (Eds.) *Plant breeding in New Zealand*. Butterworths, Wellington, pp. 123-138.
- De Klerk, G.J. e Ter Brugge, J. (2011) Micropropagation of dahlia in static liquid medium using slow-release tools of medium ingredients. *Sci Hort* 127: 542-547.
- de Vries, S.C, Booij, H., Meyerink, P., Huisman, G., Wilde, H.D., Thomas, T.L., van Kammen, A. (1988) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta* 176:196–204.
- Debergh, P.C. (1982) Physical properties of culture media. In: A., Fujiwara (Ed.) *Proc. of the 5th International Congress of Plant Cell Tiss & Org Cult*, Tokyo, pp. 135-136.
- Dias, M. C., e Brüggemann, W. (2010) Limitations of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* under drought stress: gas exchange, chlorophyll fluorescence and Calvin cycle enzymes. *Photosynthetica* 48: 96-102.
- Dias, M. C., Azevedo, C., Costa, M., Pinto, G., Santos, C. (2014) *Melia azedarach* plants show tolerance properties to water shortage treatment: An ecophysiological study. *Plant physiology and biochemistry* 75: 123-127.
- Dixon, R. e Gonzales, R. (2003) *Plant Cell Culture. A Practical Approach*. 2nd Edition. Oxford University Press, New York.

- Duarte, O. e Alvarado, E. (1977) Tratamientos para mejorar la propagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt.) por semillas y estacas. Proc Interamer Soc Trop Hort 41: 248– 251.
- Duke, J. A. e du Cellier, J. L. (1993) Handbook of alternative cash crops. Boca Raton, FL: CRC.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., Borroto, C. G. (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Rep 18: 743-748.
- Esna-Ashari e Villiers, T. (1998) Plant Regeneration from tuber discs of potato (*Solanum tuberosum* L.) using 6-benzylaminopurine (BAP). Potato Research 41: 371 – 382.
- Etienne, H e Berthouly, M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tiss & Org Cult 69: 215-231.
- Faye, A., Sagna, M., Kane, P. M. D., Sane, D. (2015) Effects of different hormones on organogenesis *in vitro* of some varieties of cassava (*Manihot esculenta* CRANTZ) grown in Senegal. African Journal of Plant Science 9:305-312.
- Federico, G. (2005) Not guilty? Agriculture in the 1920s and the Great Depression. The Journal of Economic History 65: 949-976.
- Fehér, A., Pasternak, T.P., Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tiss & Org Cult 74: 201–228.
- Feuser, S., Meler, K., Daquinta, M., Guerra, M. P., Nodari, R. O. (2003) Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. Plant Cell Tiss & Org Cult 72: 221-227.
- Ferreira, C., Dias, J. D., Canhoto, J. M. (2003) *In vitro* propagation of *Leucadendron laureolum* x *L. salignum* cv. Safari Sunset: ultrastructural and anatomical studies of regenerated plantlets. Act Hort 602: 29-38.
- Flick, C., Evans, D., Sharp, W. (1983) Organogenesis. In D. Evans *et al.* (editors) Handbook of Plant Cell Culture, vol 1. Techniques for Propagation na Breeding. Macmillan Pubis. Comp., Ney York, pp. 13-81
- Gahakwa, D., Asiimwe, T., Senkensha, N., Kajuga, J., Rukundo, P., Munganyinka, E., Kahia, J. (2013) Biotechnology for Improving Food Security in Rwanda. Rwanda Journal 28: 95-106.

- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H.; Reid, D., Torphe, T. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 32: 271 – 289.
- Gatita, I.C. e Almeida, J. (2003) Micropropagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.), solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. *Revista Forest Venez* 47: 9-13.
- George, E. (2008) *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The Background.* 3rd Edition. Springer, Netherlands.
- Gerald, L. T. S. e Lee, L. L. (2011). Biofábrica de plantas: por que biorreator? In: Gerald, L.T.S. *Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas in vitro.* 1 ed., São Paulo, Antiqua, 1: 14-31.
- Grattapaglia, D. e Machado, M. (1990) Micropropagação. In: Torres, A., Caldas, L. (Editores) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.* Brasília. ABCTP EMBRAPA-CNPH, Brasília, pp. 99-169.
- Guimarães, M., Tomé, M., Cruz, G. (1996) *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. (Tamarillo). In Bajaj, Y. (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees IV.* Berlin, Springer-Verlag, pp. 120-137.
- Guimarães, M.; Cruz, G. e Montezuma-de-Carvalho, J. (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Plant Cell Tiss & Org Cult* 15: 161-167.
- Guimarães, M.; Rebelo, M., Cruz, G. (1991) Influência de diferentes reguladores de crescimento na nodulação da resposta morfo genética de embriões zigóticos de *Chyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. cultivados *in vitro*. Abstr XXVI Jornadas Luso-Espanholas de Genética, Coimbra, Portugal, pp.195
- Hanhineva, K. J., Kokko, H.I., Kärenlampi, S.O. (2005) Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41: 826-831.
- Hassan, A., Hawa, S., Bakar, A., Fadzelly, M. (2013). Antioxidative and anticholinesterase activity of *Cyphomandra betacea* fruit. *The Scientific World Journal.*
- Hazarika, B. (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. – *Curr Sci* 85: 1704-1712.
- Holland, B., Unwin, I., Buss, D. H. L. (1992) Supplement to McCance and Widdowson's *The Composition of Foods, 5th edition: Fruits and Nut.* London.

- Hooker, J. D. (1899) *Cyphomandra betacea*. Curtis's Bot Mag 55: 7682.
- Hurtado, N.H., Morales, A.L., González –Miret, M.L., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J. (2009) Color, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). Food Chem 117: 88-93.
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., Ullah, I. (2012) Plant tissue culture: current status and opportunities. In Recent advances in plant *in vitro* culture. Licensee In Tech.
- Irringer, M. (2003) A Evolução da Agricultura—da Idade Média à Era Pré-industrial. Os Genes e a Alimentação. E.V. Schärer–Züblin (Ed.) Foundation Alimentarium pp. 38-46.
- Jan, S., Sajad, M. A., Shah, S. H., Farooq, G., Ali, H. (2019) Micropropagation through apical shoot explants and morphogenic potential of different explants of *Saussurea lappa*: An endangered medicinal plant. Pure and Applied Biology 8: 585-592.
- Jaskani, M., Abbas, H., Sultana, R., Khan, M., Qasim, M., Khan, I. (2008) Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette. Pakistan Journal of Botany 40: 1-105-109.
- Jha, T. e Ghosh, B. (2005) Plant Tissue Culture. Basic and Applied. Universities Press, India.
- Jiménez, V.M. (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. Rev Bras de Fis Veg 13: 196-223.
- Karami, O., Aghavaisi, B., Pour, A.M. (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. J Chem Biol 2: 177–190.
- Komamine, A., Murata, N., Nomura, K. (2005) Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures—morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41:6–10.
- Lemos, E. E. P. D., Ferreira, M. D., Alencar, L., DE, M. C., Oliveira, J. G. L. C., Magalhães, V. S. C. (2001) Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. Revista Brasileira de Fruticultura 23: 482-487.
- Lopes, M.L., Ferreira, M.R., Carloto, J.M., Cruz, G.S., Canhoto, J.M. (2000) Somatic embryogenesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). In: S.M., Jain, P.K., Gupta, R.J., Newton (Eds.) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 433 -455.

- Lorenzo, J. C., Gonzalez, B.L., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P., Borroto, C. (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss & Organ Cult* 54: 197-200.
- Loyola-Vargas, V. M. (2016). The history of somatic embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, pp. 11-22.
- Magioli, C. e Mansur, E. (2005) Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. *Acta Bot Bras* 19: 139 – 148
- Mantovani, N., Franco, E., Vestena, S. (2001) *In vitro* regeneration of Louropardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). *Ciência Florestal* 11: 93-101.
- Martins, J. F., Correia, S., Correia, B., Pinto, G., e Canhoto, J. M. (2019). Shoot proliferation and organogenesis on *Arbutus unedo*: physiological analysis under water stress. *Biologia Plantarum* 63: 278-286.
- Mascarenhas, L. (2018). Micropropagação e análises bioquímicas e fitoquímicas de *Physalis peruviana* L. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- McCane, J. e Widdowson, D.A. (1992) In: Fruit and nut. In: Suppl. yo the composition of foods.) 5th Ed. Unwin & Buss London, Holland, pp. 74 -77.
- Meadows, L.R. (2002) Growing tamarillo relatives. In: *The New Zealand Home Garden*. www.naturalhub.com (acedido a 1 de Março de 2019).
- Mezzetti, B., Savini, G., Carnevali, F., Mott, D. (1996) Plant genotype and growth regulators interaction affecting *in vitro* morphogenesis of blackberry and raspberry. *Biologia Plantarum* 39: 139 – 150.
- Mohamed, A., Ismail, M., Rahman, M. (2012) *In vitro* response from cotyledon and hypocotyls explants in tomato by inducing 6- benzylaminopurine. *African Journal of Biotechnology* 9: 4802 – 4807.
- Moreira-Dias, J.M., Molina, R.V., Bordon, Y., Guardiola, J.L., and Garcia-Luis, A. (2000) Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of *Troyer citrange* differ in hormone requirements and in their response to light. *Ann Bot* 85: 103–110.
- Morton, J.F. (1987) Tree Tomato. In: J.F., Morton (Ed.) *Fruits of Warm Climates*. Miami, FL, pp. 437-440.

- Mossop, D. W. (1977) Isolation, purification and properties of tamarillo mosaic virus, a member of the potato virus Y group. *New Zeal J Agr Res* 20: 535–541.
- Mousavi, E., Behbahani, M., Hadavi, E., Miri, S. (2012) Callus Induction and plant regeneration in *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)*. *Trakia Journal of Sciences* 10: 22-25.
- Moyom, M., Finnie, J., Staden, J. (2009) *In vitro* morphogenesis of organogenic nodules derived from *Scleorocarya birrea* subsp. Caffra leaf explants. *Plant Cell Tiss & Org Cult* 98: 273 – 280.
- Moyom, M., Finnie, J., Staden, J. (2011) Recalcitrant effects associated with the development of basal callus-like tissue on caulogenesis and rhizogenesis in *Sclerocarya birrea*. *Plant Growth Regul* 63: 187 – 195
- Murali, K.S., Patil, M., Maurya, G. (2007) Commercially viable process of *in vitro* mass culture of *Jatropha curcas*. European patent, EP1817956A2.
- Murashige, T. (1974) Plant Propagation through tissue cultures. *Ann Rev Physiol Plant* 25: 135-166.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473 -497.
- Murch, S.J., Liu, C., Romero, R.M., Saxena, P.K. (2004) *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. *Plant Cell Tiss & Org Cult* 78: 63–68.
- Nasri, A., Baklouti, E., Romdhane, A. B., Maalej, M., Schumacher, H. M., Drira, N., Fki, L. (2019) Large-scale propagation of *Myrobolan (Prunus cerasifera)* in RITA® bioreactors and ISSR-based assessment of genetic conformity. *Scientia horticulturae*, 245: 144-153.
- Neves, M. (2018) Effect of ethylene on somatic embryogenesis of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Niedz, R.P. e Evens, T.J. (2011) The effects of benzyladenine and meta-Topolin on *in vitro* shoot regeneration of sweet orange. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science* 6: 64–73.
- Niemenak, N., Awah, T.M., Lieberei, R. (2012) Establishment of suspension culture in *Theobroma cacao* and polyamines associated with cacao embryogenesis. *Plant Growth Regul* 67:1–8.

- Noriega, C. e Söndahl, M.R. (1993) Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: ASIC publishers (eds) 15th International Scientific Colloquium on Coffee, Montpellier, France, pp. 73–81.
- Ntui, V., Thirukkumaran, G., Ilioka, S., Mii, M. (2009) Efficient plant regeneration via organogenesis in “Egusi” melon (*Colocynthis citrulus* L.) *Scientia Horticulturae* 119: 397 – 402.
- O’Neill, K. M., Schilthuis, A. M., Leiter, C. A., Neihaus, K. M., Judge, N. A., Twiddy, E., Curtis, W. R. (2015). Scale-up of transgenic tobacco cells that express intimin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 for use as a transitional platform for an oral cattle vaccine. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51: 315-323.
- Obando, M., Goreux, A., Jordan, M. (1992) Regeneration *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (tamarillo), una especie frutal andina. *Ciencia e Investigacion Agraria* 19: 125-130.
- Oliveira, M. L., Xavier, A., Penchel Filho, R. M., Otoni, W. C., e Teixeira, J. B. (2011) Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. *Revista Árvore* 35: 1207-1217.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran, L.-S.P., Testerink, C. (2014) Response of plants to water stress. - *Front Plant Sci* 5: 86. Doi: 10.3389/fpls.2014.00086
- Osorio, C., Hurtado, N. H., Dawid, C., Hofmann, T., Mira, F. e Morales, A. (2012) Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) fruits. *Food Chem* 132: 1915–1921.
- Paek, K. Y., Hahn, E. J., Son, S. H. (2001) Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 149-157.
- Pazzagli, P. T., Weiner, J., Liu, F. (2016) Effects of CO₂ elevation and irrigation regimes on leaf gas exchange, plant water relations, and water use efficiency of two tomato cultivars. *Agricultural Water Management* 169: 6–33.
- Peña-Ramírez, Y. J., Juárez-Gómez, J., Gómez-López, L., Jerónimo-Pérez, J. L., García-Sheseña, I., González-Rodríguez, J. A., Robert, M. L. (2010) Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 46: 149-160.

- Penchel, R. M., Otoni, W. C., Xavier, A. (2007) Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: A., Borém (Ed.). Biotecnologia Florestal 4: 75-92.
- Perez Ponce, J. N. (1998) (Ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas, pp. 207-224.
- Perveen, S., Anis, M., Aref, I.M. (2013) Lipid peroxidation, H₂O₂ content, and antioxidants during acclimatization of *Abrus precator* to *ex vitro* conditions. *In Vitro Cell Dev Biol. Plant.* 57: 417-424.
- Pringle, G. e Murray, B. (1991) Reproductive biology of the tamarillo, *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Solanaceae), and some wild relatives. *New Zeal J Agr* 19: 263–273.
- Prohens, J. e Nuez, F. (2001) The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): a review of a promising small fruit crop. *Small Fruits Review* 1: 43-68.
- Qin, Q., Bergmann, C.W., Rose, J.K., Saladie, M., Kolli, V.S., Albersheim, P., Darvill, A.G., York, W.S. (2003) Characterization of a tomato protein that inhibits a xyloglucan-specific endoglucanase. *Plant J* 34:327– 338.
- Quiala, E., Barbón, R., Jiménez, E., De Fera, M., Chávez, M., Capote, A., Pérez, N. (2006) Biomass production of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 298-300.
- Quiroga, P.A. (2008) Plantas útiles americanas el tomate Ábol. *Biológica, Boletín de Divulgación de Temas Referidos a las Ciencias Biológicas* 8: 8-10
- Rahmati, M., Davarynejad, G. H., Génard, M., Bannayan, M., Azizi, M., Vercambre, G. (2015) Peach water relations, gas exchange, growth and shoot mortality under water deficit in semi-arid weather conditions. *PLoS One* 10. Doi: 10.1371/journal.pone.0120246.
- Rathore, J. S., Rathore, V., Shekhawat, N. S., Singh, R. P., Liler, G., Phulwaria, M., Dagla, H. R. (2004) Micropropagation of woody plants. In *Plant biotechnology and molecular markers*. Springer, Dordrecht, pp. 195-205.
- Read, P. E., e Bavougian, C. M. (2013) Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants. *Methods in Molecular Biology*. Humana. Press, *New York*, pp.383-395.

- Rech Filho, A., Vesco, L. L. D., Guerra, M. P. (2009). Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic forest. *Ciência Rural*, 39: 909-912.
- Ribas, A.F., Dechamp, E., Champion, A., Bertrand, B., Combes, M.C., Verdeil, J.L., Lapeypre, F., Lashermes, P., Etienne, H. (2011) Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biol* 11:92. Doi: 10.1186/1471-2229-11-92
- Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodríguez, R., Cañal, M., Sandoval, J., Debergh, P. (2005) Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 82: 57-66.
- Romanov, G. A., Aksenova, N. P., Konstantinova, T. N., Golyanovskaya, S. A., Kossmann, J., Willmitzer, L. (2000). Effect of indole-3-acetic acid and kinetin on tuberisation parameters of different cultivars and transgenic lines of potato *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 32: 245-251.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M., Prado, F. E. (2009) Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior* 4: 388-393.
- Rose, R.J., Mantiri, F.R., Kurdyukov, S., Chen, S.K., Wang, X.D, Nolan, K.E., Sheahan, M.B. (2010) Developmental biology of somatic embryogenesis. In: E.C., Pua and M.R., Davey (eds) *Plant developmental biology – biotechnological perspectives*, Springer, Berlin, pp. 3-26.
- Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., e Hayat, S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 109: 54-61.
- Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gassama-Dia, Y.K., Sagna, M., Trouslot, M.F., Duval, Y., Borgel, A. (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Ann Bot* 98: 301–308.
- Santana, N., Canto, A., Iglesias, L. G., Montalvo, M. D. C., López, G., Barahona, F. (2006). Improvement of *in vitro* culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience* 41: 405-409.
- Santos, A. L. (2012) Estudos de organogênese em *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Tese de mestrado. Universidade do Porto, Porto.

- Schwarz, O. Sharma, A. e Beaty, R. (2004) Propagation from nonmeristematic tissues: organogenesis. In: R. Trigiano e D. Gray (Editores) Plant Development and Biotechnology. CRC Press. Boca Raton.
- Silva, A. B. (2006) Biorreator e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro. Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Federal de Lavras.
- Skoog, F. e Miller, C. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *In vitro*, Symp Soc Exp Biol 11:118-30.
- Steinmacher, D. A., Guerra M.P., Saare-Surminski K., Lieberei R. (2011) Temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Ann Bot* 108: 1463-1475.
- Suarez, C.M.C. (2013) Application of ballon type bubble bioreactor for micropropagation of *Aloe barbadensis* and *Liliumhybrid*. Ph.D. Thesis. Tuscia University, Viterbo, Italy.
- Sujatha, M.; Makkar, H.; Becker, K. (2005) Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L.. *Plant Growth Regulation* 47: 83-90.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M., Murphy, A. (2014) Plant physiology and development. 6th edition, Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Takamori, L. M., Neto, N. B. M., Vieira, L. G. E., Ribas, A. F. (2015) Optimization of somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration of *Urochloa* species using picloram. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51: 554-563.
- Takayama, S. e Misawa, M. (1981) Mass propagation of *Begonia x hiemalisplantets* by shake culture. *Plant and Cell Physiology* 22: 461-467.
- Tallón, C.I., Porras, I., Pérez-Tornero, O. (2013) High efficiency *in vitro* organogenesis from mature tissue explants of *Citrus macrophylla* and *C. aurantium*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:145–155.
- Teixeira, J. B. (2002) Biorreatores. *Revista Ciência e Desenvolvimento*, 24: 36-41.
- Teixeira, J. B. (2011) Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*: Capítulo 2 Biorreator de Imersão Temporária – O futuro da produção industrial de plantas *in vitro*. São Paulo: Antiqua, pp. 393.
- Thorat, A. S., Sonone, N. A., Choudhari, V. V., Devarumath, R. M., Babu, K. H. (2017) Plant regeneration from cell suspension culture in *Saccharum officinarum* L. and ascertaining of genetic fidelity through RAPD and ISSR markers. *Biotech* 7: 16.

- Thorpe, T. A. e Stasolla, C. (2001) Somatic Embryogenesis. In: Bhojwani, S. S., Soh, W. Y. (Eds.). *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 279-336.
- van Huylbroeck, J.M., Piqueras, A., Debergh, P.C. (1998) Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during ex vitro acclimatization of micropropagated plants. *Plant Sci* 134:21–30.
- van Huylbroeck, J.M., Piqueras, A., Debergh, P.C. (2000) The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Sci* 155:59–66.
- Vargas, T.E., García, E.D., Oropeza M (2005) Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns. *J Plant Physiol* 162:449–456
- Vervit. (2019) SETIS™. Retrieved from <https://setis-systems.be/home> (acedido a 12 de Abril de 2019).
- Vieitez, F.J., Ballester, A., Vieitez, A.M. (1992) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures from *Fagus sylvatica* L. *Plant Cell Rep* 11:609–613.
- von Aderkas, P., e Bonga, J. M. (2000). Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology* 20: 921-928.
- Wang, C.X., Wang, L., Thomas, C.R. (2004) Modelling the mechanical properties of single suspension-cultured tomato cells. *Ann Bot* 93:443– 453.
- Wang, G., Xu, C., Yan, S., e Xu, B. (2019) An efficient somatic embryo liquid culture system for potential use in large-scale and synchronic production of *Anthurium andraeanum* seedlings. *Front. Plant Sci* 10: 29. Doi: 10.3389/fpls.2019.00029
- Wang, X., Wang, L., e Shangguan, Z. (2016) Leaf gas exchange and fluorescence of two winter wheat varieties in response to drought stress and nitrogen supply. *PloS one*, 11. Doi: 10.1371/journal.pone.0165733.
- Ziv, M., Chen, J., Vishnevetsky, J. (2003) Propagation of plants in bioreactors: prospects and limitations. *Act Hort* 616: 85-93.