

**Igor Martín Rucandio**

**Seleccção de germoplasma, estabelecimento, proliferação e  
enraizamento de arbustos silvestres  
do mirtilo-dos-açores  
(*Vaccinium cylindraceum* Sm.)**



Universidade dos Açores  
Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2013

**Igor Martín Rucandio**

**Seleccção de germoplasma, estabelecimento, proliferação e  
enraizamento de arbustos silvestres  
do mirtilo-dos-açores  
(*Vaccinium cylindraceum* Sm.)**

Dissertação apresentada à Universidade dos Açores, no âmbito do Mestrado de Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal para efeitos de obtenção do grau de Mestre no Ramo de Biologia, Especialidade Biotecnologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Maria João Bornes  
Teixeira Pereira Trota

Universidade dos Açores  
Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2013

*Dedicado a:  
À minha família e amigos que  
fizeram possível que a minha estadia nos  
Açores fosse melhor do que nunca imaginei.*

## **AGRADECIMENTOS**

À orientadora Maria João Pereira, pelo apoio, a ajuda e os conhecimentos, sugestões e orientação neste projecto, o qual sem a sua ajuda teria-se tornado impossível.

Ao Director do Departamento de Biologia Doutor João Luis Silva, pelo reconhecimento da importância dos trabalhos desenvolvidos e pelas facilidades concedidas na sua execução.

À Doutora Monica Moura por ter-me ajudado com os tramites e a burocracia na universidade dos Açores.

Ao Técnico Roberto Resendes, por me ajudar a manter o laboratório em ótimas condições para o trabalho.

A Doutora Ana Neto, por ter-me ajudado e guiado durante a minha estância na Universidade dos Açores.

Ao Doutor Carlos Enrique Prieto, que me concedeu uma oportunidade para trabalhar nos projectos do departamento de Zoologia da Universidade do País Basco e me acolheu como o seu pupilo.

Ao Doutor Joserra Aiartza, por mostrar-me quão emocionante pode ser a Biologia e como é que se amostra ao público.

A todos os professores do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal da Universidade dos Açores.

Em geral a todos os professores que me ensinaram os conhecimentos sobre as diversas materias da Biologia, e que sem eles seria impossível ver o mundo como eu o vejo.

Aos colegas do Mestrado que de diferentes formas contribuíram positivamente para a realização deste trabalho.

Com especial carinho e apreço quero agradecer a todos os meus familiares e amigos o seu apoio incondicional.

# ÍNDICE

RESUMO .....	1
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Enquadramento .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Caracterização geral da espécie.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. <i>Taxonomia</i> .....	2
1.2.2. <i>Descrição morfológica</i> .....	3
1.2.3. <i>Distribuição da espécie</i> .....	3
1.2.4. <i>Ecologia</i> .....	5
1.2.5. <i>Estatuto de conservação</i> .....	7
1.2.6. <i>Utilizações actuais</i> .....	7
<b>1.3. Micropropagação .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. Objetivo do trabalho.....</b>	<b>11</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Equipamento e material de laboratório.....</b>	<b>12</b>
2.1.1. <i>Equipamento</i> .....	12
2.1.2. <i>Material</i> .....	12
<b>2.2. Métodos.....</b>	<b>14</b>
2.2.1. <i>Origem do material vegetal</i> .....	14
2.2.2. <i>Esterilização do material de laboratório</i> .....	14
2.2.3. <i>Desinfecção do material vegetal</i> .....	14
2.2.4. <i>Forçagem</i> .....	15
2.2.5. <i>Composição e preparação do meio de cultura.</i> .....	15
2.2.6. <i>Técnicas de cultura.</i> .....	16
2.2.7. <i>Estabelecimento</i> .....	17
2.2.8. <i>Proliferação</i> .....	17
2.2.9. <i>Enraizamento</i> .....	17
<b>2.3. Recolha e análise dos dados. ....</b>	<b>17</b>
2.3.1 <i>Recolha de dados</i> .....	17
2.3.2 <i>Análise dos dados</i> .....	18

<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. Desinfecção e estabelecimento.</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. Proliferação</b> .....	<b>20</b>
3.2.1. <i>Efeito das citocininas na proliferação dos explantados</i> .....	<b>20</b>
3.2.2. <i>Efeito da subcultura na proliferação dos explantados</i> .....	<b>22</b>
3.2.3. <i>Efeito do clone na proliferação dos explantados</i> .....	<b>25</b>
3.2.4. <i>Efeito da origem da sacarose na proliferação dos explantados</i> .....	<b>26</b>
<b>3.3. Enraizamento</b> .....	<b>27</b>
3.3.1. <i>Efeito do período de tempo de cultura no enraizamento.</i> .....	<b>27</b>
3.3.2. <i>Efeito do clone no enraizamento dos rebentos</i> .....	<b>28</b>
3.3.3. <i>Estudo da interacção das citocininas (fase proliferativa) com a auxina</i> .....	<b>29</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1. Desinfecção e estabelecimento</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2. Multiplicação</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3. Enraizamento</b> .....	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>34</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>35</b>

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo o estabelecimento e a micropropagação de arbustos silvestres de *Vaccinium Cylindraceum* Sm. selecionados pela quantidade e qualidade dos frutos produzidos. Para a obtenção de rebentos uma solução de forragem suplementada com 8-HQS foi aplicada sobre estacas dormentes provenientes de 4 arbustos silvestres na ilha de São Miguel. Em todas as fases culturais da micropropagação foi usado o meio de Zimmermann e Broome de 1980 (meio Z2). O efeito das citocininas Zeatina (3 mg/l) e 2iP (5 mg/l), o efeito da subcultura, o efeito do clone e o efeito origem da sacarose foram testados na fase proliferativa. A auxina IBA (2 mg/l) foi testada na fase de enraizamento, assim como o efeito do tempo e a interação entre reguladores de crescimento foram testado para cada clone, assim como o efeito do próprio clone. Pese às altas taxas de contaminação, estabeleceram-se os 4 clones sem a ação do bicloreto de mercúrio. A Zeatina foi mais eficiente do que o 2iP, o clone 4 foi o que melhor desenvolveu tanto na proliferação, como no enraizamento. A sacarose alimentícia deu melhores resultados do que a laboratorial. O tempo de enraizamento recomendável são 12 semanas onde uma maior proporção de explantados enraizaram. Não se observaram interações entre as citocininas da fase proliferativa e a auxina da fase de enraizamento.

*Palavras chave:* V. Cylindraceum, interesse econômico, clones, micropropagação, citocininas enraizamento, auxinas.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Enquadramento

A origem deste trabalho surge como uma das respostas a dar aos problemas e às ameaças que estão a sofrer, quer os *taxa* nativos dos Açores quer os habitats que os contêm. Assim sendo, a Universidade como uma instituição pública ao serviço do ensino e da ciência, procura mediante a aquisição de conhecimentos úteis à salvaguarda do valor intrínseco das espécies e dos ecossistemas, contribuir para a conservação do património natural das ilhas.

As razões pelas quais *Vaccinium cylindraceum* foi escolhida, são várias e contundentes. Numa perspectiva ambiental, esta espécie faz parte de diversas comunidades naturais dos Açores (Dias, 1996) e as suas sementes estão incluídas na dieta de várias espécies autóctones de aves, entre elas, uma espécie endémica de São Miguel, alvo de várias medidas de protecção: o priôlo (Pereira & Mourato, 2012). Na perspectiva humana, para além do valor ornamental deste arbusto, que resulta não só da floração, mas também da coloração mais ou menos avermelhada da sua folhagem; os seus frutos - os mirtilos - são comestíveis e como acontece com outros mirtilos podem também ser usados na indústria alimentar e farmacêutica (Serra & Berdonces, 2010). Esta espécie endémica possui por isso um grande potencial económico, quer na produção de exemplares destinados à recuperação paisagística, à ornamentação de jardins e à produção agrícola, quer no processamento dos mirtilos produzidos. Além destas razões, a diminuição drástica do número de arbustos adultos de grandes dimensões e o facto de se tratar de um endemismo ao nível de espécie, transformaram esta espécie, numa escolha lógica.

Todo este valor ecológico, ornamental, agrícola e medicinal confere-lhe um relevante valor económico que pode ser a chave do êxito na sua conservação.

## 1.2. Caracterização geral da espécie

### 1.2.1. Taxonomia

*V. cylindraceum* Smith é uma espécie endémica do arquipélago dos Açores pertencente à família *Ericaceae*. Esta espécie foi descrita por Smith no ano 1817, a partir de um exemplar sem frutos colhido na ilha de São Miguel. Posteriormente Vander Kloet & Dickinson, (1992) descreve a espécie com material proveniente da ilha do Pico e finalmente Pereira, (1999) faz

uma descrição da espécie usando plantas de *V. cylindraceum* provenientes de sete ilhas dos Açores. *V. cylindraceum* é também conhecida na região pelos seguintes nomes: uva-da-serra, uva-do-monte, uva-do-mato, uveira, romania.

### **1.2.2. Descrição morfológica**

A uveira é uma espécie lenhosa e arbustiva (Figura 1.A). A altura dos arbustos é fortemente condicionada pela exposição aos ventos fortes, pelo ‘stress’ hídrico e pelo ‘stress’ térmico; o tamanho médio encontra-se entre 1,5 e 2,5 m de altura. As raízes estabelecem associações simbióticas com fungos formando ectomicorrizas. A ramificação é lateral, alterna e os lançamentos têm origem em gemas hibernantes (renovos) e em gemas dormentes (ladrões). A cor dos caules varia do verde ao vermelho consoante a sua menor ou maior exposição à luz respectivamente; os caules mais antigos são muitas vezes cobertos por musgos e líquenes. As folhas são simples, subsésseis, alternas, alongadas, serrilhadas e agudas na ponta, de verde (mais claro na página abaxial) a vermelho sendo que a cor vermelha surge nas folhas sob forte exposição solar; o padrão de nervação é penínérveo, mas as nervuras secundárias não atingem a margem do limbo (Figura 1.B). As inflorescências (Figura 1.C), cachos axilares com brácteas caducas de 7 a 24 flores, apresentam a ráquis e os pedicelos glabros, verdes e/ou vermelhos. As flores pendentes para um e outro lado da ráquis são epigínicas. A corola é 5-mera, raramente 6-mera, mais ou menos tubulosa, de consistência ligeiramente carnuda, glabra e a sua coloração (uniforme ou não) varia entre o branco-esverdeado, branco, rosa-esverdeado, rosa e vermelho. Os grãos de pólen arredondados e trissulcados são dispersos em tétradas. As pseudobagas maduras são negro-azuladas (Figura 1.D), carnudas e suculentas. No seu interior as sementes inicialmente esbranquiçadas vão adquirindo uma coloração amarelada, depois castanha clara, possuindo na maturação uma coloração de castanho a vermelho escuro; o número de sementes por fruto oscila entre 34 – 63, mas apenas um número reduzido destas sementes são aparentemente viáveis (Pereira *et al.*, 1998; Pereira, 1999).

### **1.2.3. Distribuição da espécie**

A distribuição geográfica desta espécie a nível mundial reduz-se a 8 ilhas do arquipélago dos Açores: Santa Maria, São Miguel, Terceira, São Jorge, Pico, Faial e Flores e Corvo (Pereira *et al.*, 2012) (Figura 2).



Figura 1. *Vaccinium cylindraceum*: A. Arbusto silvestre adulto (cortesia de M. Pereira); B. Folhas avermelhadas e folhas verdes (Fonte: [www.siamam.azores.gov.pt](http://www.siamam.azores.gov.pt)); C. Inflorescências (Fonte: [www.siamam.azores.gov.pt](http://www.siamam.azores.gov.pt)); D. Frutos (mirtilos).

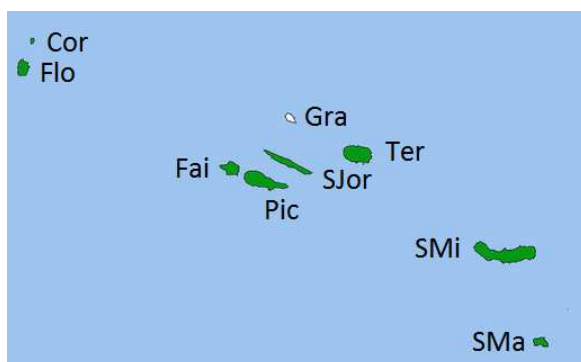


Figura 2. Distribuição de *Vaccinium cylindraceum* no arquipélago dos Açores (extinta na ilha de Graciosa e presente nas restantes ilhas) Fonte: [www.azoresbioportal.angra.uac.pt](http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt)

A uveira encontra-se extinta na ilha da Graciosa (Pereira, 2004) e em perigo nas ilhas de Santa Maria (Pereira, 2009) e Corvo (Pereira, 2007), estas três ilhas são as menores do arquipélago, as de menor altitude e estão sob intensa acção antropomórfica. Na ilha do Corvo encontra-se na parte norte do Caldeirão (Azores Bioportal, 2013). Na ilha de Santa Maria encontra-se na área do Pico alto (587 m) onde tem de competir com a espécie invasora conhecida como conteira (*Hedychium gardnerianum* Ker-Gawler) (Pereira, 2008) (Figura 3). Na ilha de São Miguel as populações estão dispersas na zona da Lagoa do Fogo e na zona da Serra da Tronqueira-Pico da Vara, sendo estes, habitats muito diferentes entre si. Nas restantes ilhas (Flores, Terceira, São Jorge, Faial e Pico) é ainda possível encontrar algumas áreas onde esta espécie se insere nas comunidades naturais a que pertence (Pereira, 1999).



I. Martín-Rucandio

Figura 3. Exemplar de *Vaccinium cylindraceum* no Pico Alto na ilha de Santa Maria.

#### 1.2.4. Ecologia

Em *V. cylindraceum* a propagação vegetativa através de rizomas é mais importante nas plantas jovens, em comunidades naturais pioneiras, em locais expostos a ventos fortes e temperaturas baixas, e em situações de distúrbios imprevisíveis e localizados (Pereira,

1999). A floração ocorre desde o mês de maio até o fim do mês de julho e a frutificação desde o mês de Agosto até ao mês de Outubro (Pereira, 1999). Entre os polinizadores contam-se os microlepidópteros, menos frequentemente alguns macrolepidopteros como *Hipparchia miguelensis* Le Cerf., ou a abella *Apis mellifera* L. (Pereira, 2008). Algumas aves consomem as sementes como o priôlo (*Pyrrhula murina*) (Figura 4) ou o tentilhão *Fringilla coelebs*, mas outras aves como o melro-preto (*Turdus merula*), ou o pisco-de-peito-ruivo (*Erithacus rubecula*) contribuem para a dispersão das sementes. A dispersão das sementes é feita não só por endozoocoria, mas também por pluviocoria. O estabelecimento de plântulas ocorre, sobretudo em espaços abertos. (Pereira & Mourato, 2012).

A uveira aparece nas florestas bosques e matos naturais geralmente acima dos 300 metros de altitude até cerca dos 1800 metros (Pereira, 1999; Dias 1996). A sua distribuição a baixa altitude é intensamente limitada pelas actividades humanas, enquanto acima dos 900 m a sua distribuição vê-se influenciada por fatores climáticos mais rigorosos (Dias, 1996).

Trata-se de uma espécie colonizadora em substrato rochoso recente e não antropizado e encontra-se presente em locais húmidos expostos, bosques, fendas, cavidades montanhosas abrigadas, cortes abruptos de areias, formações arborescentes naturais pouco expostas (Dias, 1996).

A uva-da-serra faz parte do estrato arbóreo da floresta laurifólia, do estrato arbóreo do mato de vassoura-louro, do estrato subarbustivo do mato de vassoura e do estrato intermédio do bosque de cedro (Dias, 1996).



Figura 4. O priôlo (*Pyrrhula murina*) consome as sementes da uveira. Fonte: <http://life-priolo.spea.pt>

#### **1.2.5. Estatuto de conservação**

A uva-da-serra tem sido considerada uma espécie quase ameaçada (probabilidade alta de ser uma espécie ameaçada num futuro próximo) segundo os critérios da IUCN.

*Assim, V.cylindraceum* tem sido considerada uma espécie alvo de proteção por vários autores (Silva *et al.*, 2009) devido às diferentes ameaças que afronta, já sejam de origem antrópica: degradação do habitat, aumento da superfície agrícola, mudança do uso do solo, contaminação, invasão por exóticas, uso turístico do habitat ou uso cultural; Naturais: tempestades, derrocadas e vendavais; e Biológicas: baixa densidade populacional, isolamento das populações e habitat reduzido.

Ainda assim não se encontra abrangida pela Directiva Habitats, Convenção de Berna ou CITES (Silva *et al.*, 2009), sendo protegidos unicamente aqueles exemplares que estão dentro das áreas protegidas ao nível de habitats (Rede Natura 2000).

A recuperação dos habitats, a construção de corredores ecológicos, o controlo de exóticas, o reforço de populações, a gestão sustentada do uso da espécie, podem ajudar à sua conservação (Silva *et al.*, 2009).

#### **1.2.6. Utilizações actuais**

Actualmente esta espécie é produzida a nível da região Açores pelos serviços florestais pelo Jardim Botânico dos Faial, pelo projecto ‘Laurissilva sustentável’ (Project LIFE 07 NAT/P/000630 *in* European Commission) e pela Universidade dos Açores (Floramac

2012). Os exemplares produzidos têm sido utilizados para a restauração de habitats, para a ornamentação dos jardins, miradouros e taludes das estradas (– Life+, 2007) e para o estabelecimento dos primeiros campos experimentais para a produção dos frutos (Hummer, Project LIFE 07 NAT/P/000630 in European Commission).

### **1.3. Micropropagação**

Durante os últimos 30 anos, as técnicas de cultura de tecidos têm sido aplicadas no género *Vaccinium* com os objetivos de micropropagar várias espécies, cultivares e híbridos de interesse comercial (e.g. Nickerson, 1978; Garley *et al.*, 1979; Reed & Abdelnour-Esquível, 1991; Ostrolucká *et al.*, 2007; Litwińczuk 2013), solucionar incompatibilidades de cruzamento entre espécies diferentes (Muñoz & Lyrene, 1985; Chavez & Lyrene, 2009), produzir e selecionar poliplóides (Dweikat & Lyrene, 1989; Lyrene & Perry, 1982; Perry & Lyrene, 1988; Goldy & Lyrene, 1984; Zeldin & McCown, 2004; Hirotooshi *et al.*, 2012) e produzir antocianinas (Fang *et al.*, 1998; Shibli *et al.*, 1999).

Por micropropagação define-se a multiplicação conforme de um genótipo selecionado, através da utilização de técnicas de cultura *in vitro* (Debergh & Read, 1991). Dentro da micropropagação, a cultura de microestacas (caulogénese axilar) é a técnica que apresenta menor risco de ocorrência de variação somaclonal (Debergh & Read, 1991; Candeias, 1992). Mediante a micropropagação os tempos de produção diminuem significativamente pelo que esta abordagem permite produzir grandes quantidades de plantas num período muito curto, que se revela de interesse económico.

No departamento de Biologia da Universidade dos Açores têm vindo a decorrer ensaios de micropropagação desde finais de 1993 com o objetivo de conservar as espécies endêmicas da flora açoriana incluindo *V. cylindraceum* (Moura, 1995; Pereira 1999).

O estabelecimento das primeiras culturas de *V. cylindraceum* a partir de exemplares adultos data de 1998 (Pereira & Debergh, 1998). Estes autores concluíram que o período mais favorável para a iniciação das culturas se situava entre Fevereiro e Abril, sendo Março o mês que ofereceu melhores resultados de gemas em desenvolvimento (69,2%). Relativamente à desinfecção do material vegetal oriundo do campo, apenas os ensaios que usaram 0,3% HgCl<sub>2</sub> permitiram o estabelecimento das culturas: o material não tratado com HgCl<sub>2</sub> apresentou uma taxa de contaminação média de 96,7% enquanto o material tratado com HgCl<sub>2</sub> uma taxa de 60,1% (Pereira & Debergh, 1998). Para o

estabelecimento de culturas foram usados 19 meios sem reguladores de crescimento, com diferentes concentrações de sacarose e agar e diferentes valores de pH (Tabela 1); no entanto apenas os seguintes 5 meios revelaram potencial para serem usados na micropropagação da espécie; são eles os meios de Z2 e Z3 de Zimmerman & Broomme, (1980), o meio de Eccher *et al.*, (1986), o meio de Cohen & Elliot, (1979) e o meio de Lloyd & McCown, (1981). Estes meios produziram valores de gemas axilares em desenvolvimento claramente acima dos 50%. (Pereira & Debergh, 1998). Quando os cinco melhores meios foram testados com explantados de arbustos adultos provenientes de quatro populações distintas, o meio Z2 foi aquele que produziu resultados mais constantes independentemente da origem dos explantados (Pereira & Debergh, 1998). O meio Z2, permitiu também o estabelecimento de explantados nodais provenientes de plântulas, com origem em três ilhas diferentes: São Miguel, Faial e Flores (Pereira & Debergh, 1998; Pereira, 1999).

Para a proliferação das culturas Pereira, (1999) recorreu aos reguladores de crescimento; para o isopentenil-adenina (2iP) foram testadas diferentes concentrações (7,38; 12,3; 24,6; 36,9; 49,2 e 73,8  $\mu\text{M}$ ), tendo observado que para explantados nodais com origem em plântulas, concentrações crescentes de 2iP produziam números crescentes de rebentos de dimensões decrescentes. Para explantados com origem em arbustos adultos, este padrão de acção só foi observável apenas nos rebentos que adquiriram características juvenis (folhas pequenas e arredondadas). A concentração de 7,38  $\mu\text{M}$  de 2iP (45% de gemas reativas) foi a mais indicada para a fase proliferativa (Pereira, 1999). Esta autora também testou a interação do 2iP com outros reguladores de crescimento em concentrações crescentes de ácido naftalenacético (NAA) e ácido indolacético (IAA), tendo os melhores resultados sido obtidos em 49.20  $\mu\text{M}$  2iP + 53.70  $\mu\text{M}$  NAA (36,1% de gemas reativas). A Zeatina também foi avaliada como regulador de crescimento, 27.37  $\mu\text{M}$  foi a concentração que mais gemas reativas produziu (86,7%).

Em 2006 é publicada a técnica de micropropagação desta espécie a partir de sementes; a germinação ocorre *in vitro*, e as plântulas são usadas como dadores de explantados; os explantados nodais passam directamente à fase proliferativa num meio Z2 suplementado com 12.3 ou 24.6  $\mu\text{M}$  2iP e o enraizamento (99%) é conseguido com a repicagem para o mesmo meio sem a citocinina (Pereira, 2006).

Para a recuperação de arbustos adultos, Pereira, (2009) desenvolveu um método eficiente para propagar rebentos de arbustos adultos silvestres mediante proliferação de

gemas axilares de ramos epicórmicos (rebentos ladrão e de toija) para produzir características juvenis. Na cultura inicial o 47% das gemas epicórmicas produziram novos rebentos com características juvenis. O comprimento dos rebentos e o número de nós por rebento foi superior nas gemas de origem epicórmica em relação às gemas invernantes e semelhante aos valores obtidos com gemas provenientes das plântulas. As três gemas mais distais produziram melhores taxas de iniciação de rebentos.

Tabela 1. Meios usados para avaliação do estabelecimento de culturas de *V. cylindraceum*. Modificações introduzidas: \*Sem glicina, \*\*Sem K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, \*\*\*Sem sulfato de adenina. (Pereira, 1999).

Meio usado	Sacarose (g/l)	Agar (g/l)	pH
Anderson, 1975	30	8	4,8
Anderson, 1975 Modificado	30	8	4,8
Anderson, 1978/80	30	7	4,8
Anderson, 1984	30	7	4,8
Anderson Modificado *	30	4	5,7
Cohen & Elliot, 1979	30	6	5,7
Eccher <i>et al.</i> , 1986*	30	7	5
Economou & Read, 1984	30	6,5	4,8
Knoops Modificado *	30	4	5,7
Linsmaier & Skoog, 1965	20	6	5,8
Lyrene, 80*	30	9	5,7
Murashige & Skoog, 1962*	20	6	5,8
Smagula & Lyrene, 1984-WPM*	30	4	5,7
Lloyd & McCown, 1981-WPM*	30	6	5,2
Lloyd & McCown, 1981-WPM Modificado *	30	6	5,2
Lloyd & McCown, 1981-WPM Modificado *	30	4	5,7
Lloyd & McCown, 1981-WPM Modificado **	30	6	5,2
Zimmerman & Broome, 1980-Z2***	30	10	4,8
Zimmerman & Broome, 1980-Z3***	30	10	4,8

#### **1.4. Objetivo do trabalho**

Este trabalho teve como objectivo seleccionar exemplares silvestres com potencial valor económico e estabelecer, proliferar e enraizar *in vitro* os arbustos seleccionados.

O critério que presidiu à selecção dos arbustos consistiu na quantidade e qualidade (tamanho, firmeza da pele e ausência de doença) dos frutos produzidos. Para o estabelecimento foram usados rebentos com origem na forçagem das gemas dos rebentos ladrão e de toiça. Na fase proliferativa, testaram-se para cada genótipo, duas citocininas (Zeatina e 2iP) e dois tipos de sacarose (Sinaga® e Scharlab®). Na fase do enraizamento foi testado o ácido indolbutirico (IBA) nos diferentes genótipos multiplicados e a sua interacção com as citocininas utilizadas na fase proliferativa.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Equipamento e material de laboratório**

#### *2.1.1. Equipamento*

A água bidestilada foi obtida num destilador elétrico Millipore® (Figura 5A) e a preparação dos meios foi feita num termoagitador eletromagnético Heidolph® (Figura 5B). As pesagens foram efectuadas com recurso a uma balança de precisão. As soluções-mães conservadas no frigorífico a 4°C no escuro.

A esterilização dos meios de cultura, água e papel Kraft foi efectuada numa autoclave vertical semiatomática Uniclave 88 da marca AJC® (Figura 5C). Os instrumentos de dissecação foram esterilizados numa estufa Memmert® (Figura 5E).

Os trabalhos que requereram um ambiente de assepsia controlada foram executados numa câmara de fluxo laminar horizontal Sanyo® (Figura 5D). Durante os trabalhos realizados na câmara de fluxo laminar, os instrumentos de dissecação foram esterilizados num esterilizador elétrico Steri 350® (Figura 5F).

Utilizou-se como câmara de crescimento, uma câmara frigorífica industrial Evergreen Refrigeration®, equipada com um aparelho de climatização de bomba de calor com controlo de temperatura assegurado por um termostato e três sondas (Figura 5G).

#### *2.1.2. Material*

Na preparação dos meios de cultura foi utilizado material de vidro (pipetas, provetas, matrizes e copos de precipitação) Pyrex® e as soluções-mãe foram conservadas em frascos de vidro de borosilicato de 1L. Na manipulação do material vegetal utilizaram-se pinças de aço inoxidável e bisturis nº4 com laminas nº 20 e 22. Os meios de cultura foram distribuídos pelos tubos de ensaio com um dispensador regulável Dispensette®. Os tubos de ensaio da marca Pyrex® (125 X 25 mm) foram fechados com tampas de polipropileno translúcidas Kapp Ut™.



Figura 5. Equipamento: A) Bidestilador elétrico Millipore®. B) Termoagitador eletromagnético Heidolph®. C) Autoclave vertical semiautomático AJC®. D) Câmara de fluxo laminar horizontal Sanyo®. E) Estufa Memmert®. F) Câmara frigorífica industrial Evergreen Refrigeration®.G) Esterilizador elétrico Steri 350®.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Origem do material vegetal**

Em Outubro de 2011 foram seleccionados 4 arbustos adultos de uva-da-serra na zona das Furnas no concelho de Povoação na ilha de São Miguel, tendo por base 4 critérios: abundância de cachos, número de frutos por cacho, firmeza dos frutos, aparência saudável do arbusto. Em Fevereiro de 2012 foram cortados com uma tesoura limpa com etanol (96%) rebentos ladrão e de toíça nos exemplares seleccionados. Entre cada arbusto a tesoura de poda foi limpa e os ramos transportados em frascos com água com uma gota de lixívia comercial (5% de cloro activo).

### **2.2.2. Esterilização do material de laboratório**

O material de laboratório foi lavado numa máquina de lavar louça comercial, com detergente comercial sem fragrância, o material foi seguidamente lavado com água destilada e posto a secar numa estufa eléctrica a 60°C.

A esterilização do papel Kraft, do material de vidro e dos meios de cultura foi efetuada na autoclave a 121°C durante 20 minutos. A água destilada foi esterilizada na autoclave a 121°C durante 90 minutos. Os instrumentos de dissecação foram esterilizados mediante calor seco numa estufa eléctrica a 180°C durante uma hora, e depois durante a manipulação do material vegetal na câmara de fluxo laminar, no esterilizador eléctrico a 250°C durante 2 minutos.

### **2.2.3. Desinfecção do material vegetal**

As folhas foram retiradas e os ramos cortados em secções com cerca de 5 cm de comprimento. Estes foram lavados com água corrente durante 5 minutos e posteriormente mergulhados numa solução 0,6% (p/v) de fungicida Benlate® durante 30 minutos. Seguidamente foram enxaguados 3 vezes com água bidestilada esterilizada, introduzidos numa solução 15% (v/v) de lixívia comercial (NaClO) mais 0,5 ml do detergente Tween 20® durante 10 minutos e enxaguados 3 vezes com água bidestilada esterilizada. Finalmente os raminhos foram introduzidos durante 30 segundos em etanol 96° (Sinaga®) e enxaguados 6 vezes com água bidestilada esterilizada. Após a desinfecção as extremidades mortas foram cortadas sobre papel esterilizado.

#### 2.2.4. Forçagem.

Estes raminhos foram inoculados em tubos com 10ml de solução de forçagem com 200 m-g/l de HQS (8-Hydroxyquinoline-5-sulfonic acid) e 2% (p/v) de sacarose (Scharlab®).

#### 2.2.5. Composição e preparação do meio de cultura.

Com base na bibliografia consultada (Pereira,2006; Pereira & Debergh, 1998), selecionou-se meio Z2 (Zimmerman & Broome 1980) cuja formulação detalhada para macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos consta da Tabela 2.

Tabela 2. Composição do meio Z2 (Zimmerman & Broome 1980).

<b>Macronutrientes</b>	<b>Peso</b>
<b>Z2-1980</b>	<b>mg/L</b>
KNO <sub>3</sub>	202
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	160
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	198
Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	708
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	408
<b>Micronutrientes</b>	<b>Peso</b>
<b>Button&amp;Botha-1975</b>	<b>□g/l</b>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16901
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8600
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6200
KI	830
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	250
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	55700
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	74500
<b>Vitaminas</b>	<b>Peso</b>
<b>Linsmaier &amp; Skoog-1965</b>	<b>mg/L</b>
Tiamina.HCl	0,4
Inositol	100

Foram realizadas várias soluções-mãe concentradas dos macronutrientes (1 L, 10 vezes concentrado), micronutrientes (100 ml, 1000 vezes concentrado) e vitaminas (100 ml, 100 vezes concentrado). A solução mãe de quelato de ferro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) da solução mãe nº7, foi preparada separadamente e previamente incubada a 60 °C durante 24 horas. Utilizou-se água bidestilada esterilizada para dissolver os macro, micronutrientes e as vitaminas, e o volume final das soluções mãe foi completado com água destilada. As auxinas e as citocininas foram pesadas nas quantidades necessárias para a realização dos meios de cultura, dissolvidas em NaOH ou bem HCl a 1M, completando-se para um volume final (100ml) com água bidestilada esterilizada. Não se prepararam soluções mãe de sacarose e inositol. As soluções mãe de macro, micronutrientes e vitaminas foram mantidas no frio aproximadamente a 5 °C. As soluções mãe dos reguladores foram conservadas quando necessário no congelador abaixo dos 0 °C.

O meio foi preparado de acordo com a sua formulação original, adicionando os componentes diretamente à água destilada contida num Erlenmeyer. Durante este processo manteve-se o Erlenmeyer sobre o termoagitador eletromagnético, com agitação e temperatura abaixo do ponto de ebulição da água. O pH foi acertado a 5 com NaOH ou bem HCl a 1M. O meio foi sempre solidificado com 10 g de Bacto Agar (Difco®) cujo cozimento foi efetuado por fervura no termoagitador.

Finalmente o meio foi distribuído com um dispensador (Dispensette®) à razão de 10 ml por tubo.

#### **2.2.6. Técnicas de cultura.**

Todos os explantados foram preparados em condições assépticas na câmara de fluxo laminar sobre papel Kraft esterilizado e com auxílio de pinças bisturis esterilizados.

Nos ensaios, sempre que os explantados foram microestacas uninodais, inseriu-se uma dentro de cada tubo de forma que o nó com a gema axilar ficasse acima do meio de cultura.

Todas as culturas foram mantidas numa câmara climatizada, à temperatura de 21°C ( $\pm$  1°C) fornecida por lâmpadas fluorescentes.

### **2.2.7. Estabelecimento**

Após 8 semanas de forçagem, os novos rebentos sem contaminação foram inoculados no meio Z2 suplementado com 9,12µM de zeatina.

### **2.2.8. Proliferação**

O meio utilizado nas diversas fases proliferativas foi o meio Z2, suplementado para cada clone com as citocininas Zeatina (3 mg/l) ou 2-Isopentenil-adenina (2iP) (5mg/l) (PEREIRA, 1999, 2006, 2008, 2009, 2012).

Para o clone 4 também se testaram para o meio Z2, dois tipos de sacarose: a sacarose extra pura da Scharlab® e a sacarose de beterraba produzida pela Sinaga® nos Açores.

### **2.2.9. Enraizamento**

Parte dos rebentos foram inoculados diretamente para o meio Z2 suplementado com Ácido indolbutírico (IBA) (2 mg/l) (PEREIRA, 2012), tendo em consideração o histórico das citocininas usadas na fase proliferativa e parte dos rebentos foram inoculados num meio Z2 sem citocininas onde permaneceram 4 semanas num meio Z2; após esse período de tempo os rebentos de cada clone foram inoculados no meio Z2 suplementado com 2 mg/l de IBA.

## **2.3. Recolha e análise dos dados.**

### **2.3.1 Recolha de dados**

Apesar da cultura *in vitro* ter sido caracterizada frequentemente como a cultura de material vegetal asséptico, resulta muitas vezes difícil ou impossível, detectar visualmente certas contaminações de natureza bacteriana ou viral (Leifert et al. 1994). Na impossibilidade de verificar assepsia das culturas, utilizar-se-á o termo ‘sem contaminação visível’ (Leifert et al., 1994), para designar aquelas culturas que numa observação a olho nú, não registraram quaisquer sinais de contaminação. Reciprocamente o termo contaminado refere-se ao explantado cuja contaminação foi possível detectar visualmente.

Salvo indicação contrária os resultados, foram recolhidos 12 semanas após a inoculação dos explantados e 8 e 12 semanas após a colocação dos rebentos no meio de enraizamento. O número de rebentos, o comprimento dos rebentos e o número de nós por rebento foram contados e medidos no momento da sua subcultura nas fases proliferativas, assim como a percentagem de enraizamento, o número de raízes e o seu comprimento na fase de enraizamento.

### *2.3.2 Análise dos dados*

Para os dados apresentados como medidas ou contagens foi utilizado a análise da variância para um fator (ANOVA); a homogeneidade de variâncias foi verificada mediante o teste de Levene e para a comparação múltipla foi usado o teste de Tukey. Quando se deu o caso de não existir homogeneidade de variâncias, os dados foram tratados estatisticamente com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a análise da variância, e um teste não paramétrico para comparações múltiplas. Para os dados apresentados como proporções foi utilizado o teste da  $\chi^2$  para analisar as tabelas de contingência.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Desinfecção e estabelecimento.

O desenvolvimento de fungos foi responsável pela maior parte da contaminação visível. As percentagens de contaminação dos segmentos de ramos inoculados na solução de forçagem situaram-se entre os 47 e os 74%. A repicagem dos rebentos desenvolvidos em ramos sem contaminação visível para o meio de cultura Z2 revelou percentagens de contaminação entre os 72 e os 81% e de necrose entre os 0 e 30%. As percentagens de contaminação dos ramos diferiram significativamente entre os clones e em regra a contaminação dos rebentos produzidos em ramos sem contaminação visível manteve-se ou subiu significativamente na passagem para o meio de cultura. O clone que permitiu a obtenção de um número maior de rebentos com desenvolvimento foi aquele que apresentou percentagens de contaminação mais baixas nas duas fases do estabelecimento (tabela 3).

Tabela 3. Estabelecimento *in vitro* de clones selecionados de *V. cylindraceum*. Contaminação nos ramos recolhidos e inoculados numa solução de forçagem (200mg/l 8-HQS + sacarose 2% p/v) após 8 semanas de cultura. Contaminação, necrose e desenvolvimento dos rebentos desenvolvidos na solução de forçagem e inoculados no meio Z2 suplementado com 9,12 $\mu$ M de zeatina após 8 semanas de cultura. A separação das médias ao nível de 5% é indicada com letras diferentes entre os clones e com \* entre os ramos contaminados e os rebentos contaminados.

Clone	Ramos (n°)	Ramos contaminados (%)	Rebentos (n°)	Rebentos contaminados (%)	Rebentos necróticos (%)	Rebentos com desenvolvimento (n°)
1	36	56 bc*	47	81 a*	11	8
2	60	47 b*	104	72 a*	0	29
3	44	73 ac	30	80 a	17	5
4	120	74 a	38	74 a	30	7

## 3.2. Proliferação

### 3.2.1. Efeito das citocininas na proliferação dos explantados

No clone 1, a Zeatina produziu resultados significativamente superiores em relação ao 2iP na fase proliferativa 1 mas não na fase proliferativa 2 (Tabela 4).

Tabela 4. Clone 1 (*V. cylindraceum*). Efeito das citocininas na proliferação de explantados no meio Z2 suplementado com citocininas após 12 semanas de cultura. Em cada coluna e para cada fase proliferativa (FP), os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

FP	Citocinina	N	Rebentos por explantado (n°)	N	Nós por rebento (n°)	N	Comprimento do rebento (mm)
1	2iP (5mg/l)	11	1,2 ± 0,4 a	14	4,2 ± 1,8 a	14	0,1 ± 0 a
	Zeatina (3mg/l)	16	1,9 ± 0,7 b	31	9,4 ± 5,1 b	31	0,7 ± 0,5 b
2	2iP (5mg/l)	5	1,0 ± 0 a	5	4,2 ± 1,6 a	5	0,3 ± 0,2 a
	Zeatina (3mg/l)	37	1,0 ± 0,2 a	39	6,9 ± 3,3 a	39	0,4 ± 0,2 a

No clone 2, a Zeatina produziu resultados significativamente superiores em relação ao 2iP em todas as fases proliferativas (Tabela 5).

Tabela 5. Clone 2. (*V. cylindraceum*). Efeito das citocininas na proliferação de explantados no meio Z2-80 suplementado com citocininas após 12 semanas de cultura. Em cada coluna e para cada fase proliferativa (FP), os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

FP	Citocinina	N	Rebentos por explantado (n°)	N	Nós por rebento (n°)	N	Comprimento do rebento (mm)
1	2iP (5mg/l)	29	1,2 ± 0,4 a	36	9,6 ± 3,9 a	25	0,9 ± 0,5 a
	Zeatina (3mg/l)	30	2,1 ± 1,1 b	61	14,5 ± 7,7b	61	1,7 ± 0,9 b
2	2iP (5mg/l)	20	1,0 ± 0 a	20	4,0 ± 2,0 a	20	0,3 ± 0,2 a
	Zeatina (3mg/l)	36	1,1 ± 0,3 b	40	16,2 ± 5,8 b	40	1,5 ± 0,7 b
3	2iP (5mg/l)	22	1,0 ± 0 a	22	5,6 ± 3,4 a	22	0,4 ± 0,4 a
	Zeatina (3mg/l)	23	1,1 ± 0,3 b	27	17,4 ± 0,4 b	27	1,3 ± 0,4 b

O clone 3 não apresentou desenvolvimento quando foi inoculado num meio Z2-80 suplementado com 2iP, e não conseguiu comparar o efeito das duas citocininas no clone, o que demonstra que para o clone 3 a Zeatina é a única eficiente no desenvolvimento dos rebentos (Tabela 6).

Tabela 6. Clone 3 (*V. cylindraceum*). Efeito das citocininas na proliferação de explantados no meio Z2-80 suplementado com citocininas após 12 semanas de cultura. Em cada coluna e para cada fase proliferativa (FP), os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

FP	Citocinina	Rebentos por explantado		Nós por rebento		Comprimento do rebento (mm)
		N	(n°)	N	(n°)	
1	2iP (5mg/l)	-	-	-	-	-
	Zeatina (3mg/l)	8	2,1 ± 0,6	16	15,3 ± 6,1	1,7 ± 0,8
2	2iP (5mg/l)	-	-	-	-	-
	Zeatina (3mg/l)	30	1,0 ± 0	30	5,1 ± 2	0,4 ± 0,2
3	2iP (5mg/l)	-	-	-	-	-
	Zeatina (3mg/l)	29	1,2 ± 0,6	36	9,5 ± 0,4	0,5 ± 0,4

O clone 4 apresentou resultados diferentes em relação aos clones anteriores. Isto é a zeatina não apresentou os melhores resultados em todas as fases proliferativas. Apesar da utilização da zeatina ter resultado num número de rebentos superior nas fases proliferativas 1 e 3, o número de nós rebento e o comprimento dos rebentos foram significativamente menores nas fases proliferativas 2 e (Tabela 7).

Tabela 7. Clone 4 (*V. cylindraceum*). Efeito das citocininas na proliferação de explantados no meio Z2-80 suplementado com citocininas após 12 semanas de cultura. Em cada coluna e para cada fase proliferativa (FP), os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

FP	Citocinina	N	Rebentos por explantado (n°)	N	Nós por rebento (n°)	N	Comprimento do rebento (mm)
1	2iP (5mg/l)	23	1,2 ± 0,4 a	27	10,5 ± 4,6 a	27	1,4 ± 0,9 a
	Zeatina (3mg/l)	27	2,5 ± 1 b	69	14,8 ± 6 b	69	1,4 ± 0,7 a
2	2iP (5mg/l)	41	1,0 ± 0 a	41	13,1 ± 4,5 a	41	1,6 ± 0,7 a
	Zeatina (3mg/l)	36	1,0 ± 0,2 a	37	5,8 ± 3,3 b	37	0,3 ± 0,2 b
3	2iP (5mg/l)	40	1,0 ± 0 a	40	13,7 ± 5,2 a	40	1,7 ± 0,8 a
	Zeatina (3mg/l)	39	2,3 ± 1,5 b	89	11 ± 5 b	89	1,3 ± 0,6 b

### 3.2.2. Efeito da subcultura na proliferação dos explantados

A proliferação dos explantados do clone 1 no meio Z2 suplementado com Zeatina apresentou variações significativas entre as 3 subculturas: o maior n° de rebentos por explantado foi obtido na fase proliferativa 1, o maior número de nós por rebento foi obtido nas fases proliferativas 1 e 3 e os rebentos mais longos foram obtidos na fase proliferativa 3 (Tabela 8). Já a proliferação dos explantados deste clone no meio Z2 suplementado com 2iP não apresentou variações significativas entre as 2 subculturas (Tabela 9).

Tabela 8. Clone 1 (*V. cylindraceum*). Efeito da subcultura na proliferação de explantados num meio Z2 suplementado com Zeatina (3mg/l) após 12 semanas de cultura. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

FP	N	Rebentos por explantado (n°)	N	Nós por rebento (n°)	N	Comprimento do rebento (mm)
1	16	1,9 ± 0,7 a	31	9,4 ± 5,1 a	31	0,7 ± 0,5 a
2	37	1,0 ± 0,2 b	39	6,9 ± 3,3 b	39	0,4 ± 0,2 b
3	30	1,2 ± 0,6 b	37	11 ± 0,8 a	37	1,0 ± 0,5 c

Tabela 9. Clone 1 (*V. cylindraceum*). Efeito da subcultura na proliferação de explantados num meio Z2 suplementado com 2iP (5mg/l) após 12 semanas de cultura. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

<b>FP</b>	<b>N</b>	<b>Rebentos por explantado (n°)</b>	<b>N</b>	<b>Nós por rebento (n°)</b>	<b>N</b>	<b>Comprimento do rebento (mm)</b>
1	11	1,2 ± 0,4 a	14	4,2 ± 1,8 a	14	0,1 ± 0 a
2	5	1,0 ± 0 a	5	4,2 ± 1,6 a	5	0,3 ± 0,2 a

A proliferação dos explantados do clone 2 no meio Z2 suplementado com Zeatina apresentou variações significativas entre as 3 subculturas apenas para n° de rebentos por explantado que foi superior na fase proliferativa 1 (Tabela 10). A proliferação dos explantados deste clone no meio Z2 suplementado com 2iP apresentou variações significativas entre as 3 subculturas, tendo os melhores resultados sido obtidos na fase proliferativa 1 (Tabela 11).

Tabela 10. Clone 2 (*V. cylindraceum*). Efeito da subcultura na proliferação de explantados num meio Z2 suplementado com Zeatina (3mg/l) após 12 semanas de cultura. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

<b>FP</b>	<b>N</b>	<b>Rebentos por explantado (n°)</b>	<b>N</b>	<b>Nós por rebento (n°)</b>	<b>N</b>	<b>Comprimento do rebento (mm)</b>
1	30	2,1 ± 1,1 a	61	14,5 ± 7,6 a	61	1,7 ± 0,9 a
2	36	1,1 ± 0,3 b	40	16,2 ± 5,8 a	40	1,5 ± 0,7 a
3	23	1,2 ± 0,4 b	27	17,4 ± 0,4 a	27	1,3 ± 0,4 a

Tabela 11. Clone 2 (*V. cylindraceum*). Efeito da subcultura na proliferação de explantados num meio Z2 suplementado com 2iP (5mg/l) após 12 semanas de cultura. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

<b>FP</b>	<b>N</b>	<b>Rebentos por explantado (n°)</b>	<b>N</b>	<b>Nós por rebento (n°)</b>	<b>N</b>	<b>Comprimento do rebento (mm)</b>
1	29	1,2 ± 0,4 a	36	9,6 ± 3,9 a	25	0,9 ± 0,5 a
2	20	1,0 ± 0 b	20	4,0 ± 2,0 b	20	0,3 ± 0,2 b
3	22	1,0 ± 0 b	22	5,6 ± 3,4 b	22	0,4 ± 0,4 b

A proliferação dos explantados do clone 3 no meio Z2 suplementado com Zeatina apresentou variações significativas entre as 3 subculturas, tendo os melhores resultados sido obtidos na fase proliferativa 1 (Tabela 12).

Tabela 12. Clone 3 (*V. cylindraceum*). Efeito da subcultura na proliferação de explantados num meio Z2 suplementado com Zeatina (3mg/l) após 12 semanas de cultura. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

<b>FP</b>	<b>N</b>	<b>Rebentos por explantado (n°)</b>	<b>N</b>	<b>Nós por rebento (n°)</b>	<b>N</b>	<b>Comprimento do rebento (mm)</b>
1	8	2,1 ± 0,6 a	16	15,3 ± 6,1 a	17	1,7 ± 0,8 a
2	30	1,0 ± 0 b	30	5,1 ± 2 b	30	0,4 ± 0,2 b
3	29	1,2 ± 0,6 b	36	9,5 ± 0,4 c	36	0,5 ± 0,4 b

A proliferação dos explantados do clone 4 no meio Z2 suplementado com Zeatina apresentou variações significativas entre as 3 subculturas, tendo os melhores resultados sido obtidos na fase proliferativa 1 (Tabela 13). A proliferação dos explantados do clone 4 no meio Z2 suplementado com 2iP apresentou variações significativas entre as 3 subculturas, o n° de rebentos por explantado foi significativamente superior na fase proliferativa 1, enquanto o n° de nós por rebento foi superior nas fases proliferativas 2 e 3 (Tabela 14).

Tabela 13. Clone 4 (*V. cylindraceum*). Efeito da subcultura na proliferação de explantados num meio Z2 suplementado com Zeatina (3mg/l) após 12 semanas de cultura. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

FP	N	Rebentos por explantado (n°)	N	Nós por rebento (n°)	N	Comprimento do rebento (mm)
1	27	2,5 ± 1 a	69	14,8 ± 6 a	69	1,4 ± 0,7 a
2	36	1,0 ± 0,2 b	37	5,8 ± 3,3 b	37	0,3 ± 0,23 b
3	39	2,3 ± 1,5 a	89	11 ± 5 c	89	1,3 ± 0,6 a

Tabela 14. Clone 4 (*V. cylindraceum*). Efeito da subcultura na proliferação de explantados num meio Z2 suplementado com 2iP (5mg/l) após 12 semanas de cultura. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

FP	N	Rebentos por explantado (n°)	N	Nós por rebento (n°)	N	Comprimento do rebento (mm)
1	23	1,2 ± 0,4 a	27	10,5 ± 4,6 a	27	1,4 ± 0,9 a
2	41	1,0 ± 0 b	41	13,1 ± 4,5 ab	41	1,6 ± 0,7 a
3	40	1,0 ± 0 b	40	13,7 ± 5,2 b	40	1,7 ± 0,8 a

### 3.2.3. Efeito do clone na proliferação dos explantados.

Na fase proliferativa 1 (Tabela 15) os clones 2, 3 e 4 obtiveram resultados similares e significativamente superiores que o clone 1 em todas as variáveis.

Tabela 15. Fase proliferativa 1 (*V. cylindraceum*). Efeito do clone na proliferação de explantados no meio Z2 suplementado com citocininas. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

Clone	N	Rebentos por explantado (n°)	N	Nós por rebento (n°)	N	Comprimento do rebento (mm)
1	27	1,6 ± 0,7 a	45	7,8 ± 5,0 a	45	0,5 ± 0,5 a
2	60	1,6 ± 0,9 a	97	12,7 ± 6,9 b	97	1,4 ± 0,9 b
3	14	1,6 ± 0,7 a	23	12,8 ± 6,8 b	23	1,4 ± 0,9 b
4	50	1,9 ± 1,0 a	96	13,6 ± 5,6 b	96	1,4 ± 0,7 b

Na fase proliferativa 2, os clones 2 e 4 apresentaram resultados significativamente superiores para o n° de nós por rebento e para o comprimento dos rebentos (Tabela 16).

Tabela 16. Fase proliferativa 2 (*V. cylindraceum*). Efeito do clone na proliferação de explantados no meio Z2 suplementado com citocininas. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

Clone	Rebentos por explantado		Nós por rebento		Comprimento do rebento	
	N	(n°)	N	(n°)	N	(mm)
1	42	1,0 ± 0,2 a	44	6,6 ± 3,3 a	44	0,4 ± 0,2 a
2	56	1,1 ± 0,2 a	60	12,2 ± 7,6 b	60	1,2 ± 0,8 b
3	30	1,0 ± 0 a	30	5,1 ± 2,1 a	30	0,4 ± 0,2 a
4	77	1,0 ± 0,1 a	78	9,7 ± 5,3 b	78	1,0 ± 0,8 b

Na fase proliferativa 3, o clone 4 apresenta um n° de rebentos por explantado significativamente superior ao clone 2 e apresenta os rebentos significativamente mais longos em relação a todos os outros clones (Tabela 17).

Tabela 17. Fase proliferativa 3 (*V. cylindraceum*). Efeito do clone na proliferação de explantados no meio Z2 suplementado com citocininas. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

Clone	Rebentos por explantado		Nós por rebento		Comprimento do rebento	
	N	(n°)	N	(n°)	N	(mm)
1	30	1,3 ± 0,6 ab	37	11,0 ± 3,9 a	37	1,0 ± 0,5 a
2	45	1,1 ± 0,3 a	49	12,1 ± 7,7 a	49	0,9 ± 0,6 a
3	29	1,2 ± 0,6 ab	36	9,6 ± 4,2 a	36	0,5 ± 0,3 b
4	79	1,6 ± 1,2 b	129	11,9 ± 5,2 a	129	1,4 ± 0,7 c

#### 3.2.4. Efeito da origem da sacarose na proliferação dos explantados

No teste realizado com o clone 4 a sacarose alimentícia da Sinaga® produziu rebentos significativamente mais longos e com um maior n° de nós que a sacarose laboratorial Scharlab® (Tabela 18).

Tabela 18. Clone 4. Efeito da origem da sacarose na proliferação de explantados de *V. cylindraceum* num meio Z2-80 suplementado com 2iP (3mg/l) após 12 semanas de cultura (fase proliferativa 4). Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

Sacarose	N	Rebentos por	N	Nós por	N	Comprimento
		explantado		rebentos		dos rebentos
		(n°)		(n°)		(mm)
Alimentícia (Sinaga®)	88	1,0 ± 0,2 a	91	16,4 ± 5,4 a	91	2,3 ± 1,0 a
Laboratorial (Scharlab®)	52	1,0 ± 0,2 a	54	10,7 ± 5,1 b	54	1,4 ± 0,9 b

### 3.3. Enraizamento

#### 3.3.1. Efeito do período de tempo de cultura no enraizamento.

Para a determinação do tempo de cultura necessário para a avaliação do efeito do clone no enraizamento dos rebentos num meio suplementado com IBA (2mg/l) foram registados os resultados às 8 e 12 semanas de cultura. O clone 1 não desenvolveu raízes durante o tempo de cultura analisado (12 semanas). O aumento do tempo de cultura de 8 para 12 semanas fez variar para alguns clones os dados relativamente ao enraizamento; após 12 semanas a percentagem de enraizamento foi significativamente superior para o clone 3; o número de raízes por rebento foi significativamente superior para o clone 4 e o comprimento das raízes foi significativamente superior para os clones 2 e 4 (Tabela 19).

Tabela 19: Efeito do período de tempo de cultura no enraizamento de rebentos de *V. cylindraceum* num meio Z2-80 suplementado com IBA (2mg/l). Em cada coluna e para cada clone os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

Clone	Tempo de cultura (semanas)	N	Enraizamento (%)	N	Raízes por plântula (n°)	N	Comprimento da raiz (mm)
1	8	18	0 ± 0 a	-	-	-	-
	12	18	0 ± 0 a	-	-	-	-
2	8	18	38,8 ± 5,1 a	7	2,4 ± 1,7 a	14	0,4 ± 0,1 a
	12	18	44,4 ± 5,2 a	8	4,9 ± 3,4 a	21	0,6 ± 0,3 b
3	8	18	44,4 ± 5,1 a	9	1,8 ± 0,9 a	18	0,5 ± 0,3 a
	12	18	77,7 ± 4,2 b	15	1,9 ± 1,2 a	26	0,7 ± 0,6 a
4	8	18	55,5 ± 0,5 a	10	2,6 ± 2 a	19	1,2 ± 0,1 a
	12	18	55,5 ± 0,5 a	10	8,6 ± 6,2 b	26	2,1 ± 0,2 b

### 3.3.2. Efeito do clone no enraizamento dos rebentos

Os clones diferiram significativamente entre si na sua capacidade de enraizamento. Os clones 3 e 4 foram apresentados os que apresentaram a maior capacidade de enraizamento (Tabela 20).

Tabela 20. Efeito do clone no enraizamento de rebentos de *V. cylindraceum* num meio Z2 suplementado com IBA (2mg/l), após 12 semanas de cultura. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

Clone	N	Enraizamento (%)	N	Raízes por plântula (n°)	N	Comprimento da raiz (mm)
1	18	0 ± 0 a	-	-	-	-
2	18	44,4 ± 0,5 b	8	4,9 ± 3,4 bc	21	0,6 ± 0,3 b
3	18	77,7 ± 0,4 c	14	1,9 ± 1,4 b	25	0,7 ± 0,6 b
4	18	55,5 ± 0,5 bc	10	8,6 ± 8,6 c	26	2,1 ± 1,0 c

### 3.3.3. Estudo da interação das citocininas (fase proliferativa) com a auxina (fase de enraizamento).

Para o clone 4, após 12 semanas de cultura não se verificaram diferenças significativas no enraizamento dos rebentos provenientes da fase proliferativa com Zeatina ou da fase proliferativa com 2iP (Tabela 21).

Tabela 21: Efeito da interação entre reguladores no enraizamento de explantados de *V. cylindraceum* num meio Z2-80 suplementado com IBA (2mg/l) para o clone 4 após 12 semanas. Em cada coluna os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente entre si (grau de confiança 95%).

Origem	N	Enraizamento (%)	N	Raízes por plântula (n°)	N	Comprimento da raiz (mm)
Fase proliferativa com 2iP (5mg/l)	35	68,5 ± 0,4 a	24	4,6 ± 5,6 a	50	1,0 ± 0,7 a
Fase proliferativa com Zeatina (3mg/l)	36	75,0 ± 0,4 a	28	7,4 ± 5,8 a	66	1,2 ± 0,8 a

## 4. Discussão

### 4.1. Desinfecção e estabelecimento

As percentagens de contaminação dos segmentos de ramos desinfectados superficialmente e inoculados na solução de forçagem situaram-se entre os 47 e os 74%; estas diferenças podem ser explicadas pelas condições fito-sanitárias das plantas-mãe que podem influenciar profundamente as taxas de contaminação obtidas (*e.g.* Cassells, 1991; Debergh & Read, 1991; Leifert *et al.*, 1994). Geralmente material proveniente das plantas estabelecidas no campo apresenta maiores níveis de contaminação, requerendo desinfecções mais drásticas. Também a proximidade do material vegetal relativamente ao solo – como estavam os rebentos de toixa recolhidos - e a sua sujeição a condições de elevada humidade – como ocorrem nos Açores - potenciam o aumento das taxas de contaminação (Leifert *et al.*, 1994).

Quando os rebentos (que tiveram origem em gemas de ramos que não apresentaram contaminação visível na forçagem) passaram à fase de estabelecimento, as percentagens de contaminação oscilaram entre os 72 e 81, não diferindo significativamente entre si, o que pode ser explicado pela revelação tardia de contaminantes presentes na fase de forçagem ou pela presença de contaminantes endofíticos (Leifert *et al.*, 1994).

As taxas de contaminação, em geral, são relativamente altas. Segundo Pereira, (1999) e Liefert *et al.*, (1994), podiam ter-se obtido menores taxas de contaminação, se tratamentos mais fortes e mais prolongados fossem aplicados, no entanto estes aumentam fortemente as taxas de necrose nos explantados e diminuem nos número de gemas reactivas.

Apesar de trabalhos anteriores com *V. cylindraceum* mostraram a impossibilidade de estabelecer culturas *in vitro* a partir de arbustos silvestres sem a utilização de bicloreto de mercúrio (usando apenas benomyl, lixívia e etanol) (Pereira & Debergh, 1998). Neste trabalho foi possível o estabelecimento de arbustos adultos directamente a partir do campo sem a utilização do bicloreto de mercúrio, associando à desinfecção com os descontaminantes clássicos (fungicida, lixívia e etanol) uma etapa de forçagem em 8-HQS, permitindo rejeitar antes da fase de estabelecimento (e conseqüente gasto de

consumíveis) uma parte considerável da contaminação inicial. 8-HQS exibe propriedades antisépticas e desinfetantes (Sigma-Aldrich, 2012) que são amplamente utilizadas para preservar as flores cortadas (Ramezanizadeh *et al.*, 2012; Asrar, 2012; Amjad & Ahmad, 2012) e menos utilizadas para reduzir a contaminação no corte (Moura & Silva, 2009) ou para reduzir a contaminação dos explantes na micropropagação (Laimer *et al.*, 1991; Yu & Reed, 1995).

## **4.2. Multiplicação**

A Zeatina e o 2iP são duas citocininas usualmente utilizadas na cultura *in vitro* do género *Vaccinium* (Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991; Oostrolucká, 2004). Neste trabalho a utilização da Zeatina (3mg/l) e o 2iP (5mg/l) resultou no desenvolvimento de todos os rebentos não necróticos ou não contaminados, excepto no clone 3 com o regulador de desenvolvimento 2iP, que não apresentou desenvolvimento.

Testaram-se estes dois reguladores de crescimento nas concentrações referidas em outros trabalhos com esta espécie (Pereira & Debergh, 1998; Pereira, 1999; 2006; 2009; 2012) para comprovar há diferença entre elas na proliferação das culturas. Os resultados concluem que sim há diferença entre a utilização do 2iP e a Zeatina, obtendo em regra melhores resultados com a Zeatina, seja quanto ao comprimento, número de rebentos ou número de folhas. Isto confirma o referido noutros artigos onde se concluiu que ambos reguladores promovem o desenvolvimento (Pereira, 2012), mas neste trabalho destaca-se que embora os dois reguladores promovam desenvolvimento, não o fazem com a mesma eficácia. Isto pode ser devido a natureza dos reguladores de desenvolvimento, sendo a zeatina um regulador de origem natural e o 2iP um regulador de origem sintético. Segundo Eccher & Noe, (1989), a zeatina mostra-se menos tóxica do que o 2iP, especialmente em altas doses. O alto custo da zeatina impede a sua utilização generalizada na cultura *in vitro*, mas em baixa concentração pode ser usada na iniciação do desenvolvimento dos explantados com objectivos comerciais ou na investigação (Reed & Abdelnour-Esquivel, 1991).

Enquanto ao efeito da subcultura os dados aportam conclusões díspares segundo os diferentes clones, sendo que a subcultura num mesmo meio com a mesma concentração de regulador de desenvolvimento resultou em taxas proliferativas frequentemente menores. Estas diferenças significativas nas distintas variáveis podem explicar-se com a

interacção do regulador de desenvolvimento aplicado exogenamente aos tecidos e os níveis internos de citocinina que os explantados tinham inicialmente e que diferiam consoante a idade de formação da gema no arbusto e as condições físicas (*e.g.* temperatura, exposição ao vento e à luz) e químicas (*e.g.* disponibilidade de água, nutrientes, exposição a químicos artificiais) (Kacer *et al.*, 2005; Yew *et al.*, 2010) a que estavam sujeitas. Segundo trabalhos desenvolvidos por outros autores os níveis de citocinina aplicadas exogenamente variam com as diferentes subculturas (Kacer *et al.*, 2005; Yew *et al.*, 2010). A utilização de citocininas diferentes em cada subcultura tem sido usada para manter as taxas proliferativas em algumas espécies (Bennett *et al.*, 1994).

O estado fitossanitário dos clones assim como as suas diferenças genéticas fazem de cada clone um espécime com diferentes capacidades para o estabelecimento, multiplicação e enraizamento (Pereira & Debergh, 1998; Pereira, 1999; 2012). Neste trabalho observa-se que há dois clones com qualidades superiores para a *cultura in vitro*, são os clones 2 e 4 apresentando o clone 4 ainda melhores características; o clone 4 foi o clone que mais crescimento apresentou nas fases proliferativas (1 e 3) e clone 2 apresenta maior crescimento na fase proliferativa 2. A posição das gemas no arbusto pode também ter influenciado o desenvolvimento, já que as gemas provenientes dos rebentos de toça, terão uma sua capacidade proliferativa maior em virtude da gema que originou o rebento de toça ter sido formada no início da vida do arbusto que corresponde a uma fase de grande crescimento vegetativo. As gemas dormentes dos rebentos ladrão também teriam uma grande capacidade de desenvolvimento, mas menor do que os rebentos de toça que resultam ideais para a micropropagação (Sudarsono & Goldy, 1991; Thirunavoukkarasu, 2010).

Testou-se também o efeito de duas marcas diferentes de sacarose, uma genérica de distribuição generalizada nos Açores e com uso alimentício (Sinaga®) e outra com usos experimentais em laboratório (Scharlab®). Os resultados concluem que há diferença significativa entre as duas sacaroses sendo a da Sinaga® com a que se obtêm mais nós por rebento e uns rebentos mais compridos. Sendo a sacarose da Sinaga® de pureza desconhecida, também é desconhecido o resto de componentes que não são estritamente

sacarose, sendo esta composição presumivelmente a que terá um efeito diferenciador no desenvolvimento dos rebentos frente à sacarose da Scharlab®. A utilização da sacarose alimentícia permite converter a micropropagação de *V. cylindraceum* mais acessível no aspecto económico.

### **4.3. Enraizamento**

O IBA tem sido comumente utilizado no enraizamento (Castrillon *et al.*, 2007; Sedlak & Paprstein, 2011; Ruzic *et al.*, 2012). No enraizamento determinou-se o período de 12 semanas como sendo mais adequado para a avaliação do efeito do IBA. Este período de tempo foi também o utilizado na fase proliferativa neste e em outros trabalhos com a mesma espécie (Pereira, 2006; 2009; 2012).

Apesar da concentração de IBA (2 mg/l) ter resultado nas melhores percentagens de enraizamento para esta espécie (Pereira *et al.*, 2012), o clone 1 não desenvolveu raízes. Também aqui, o estado fitossanitário, as diferenças genéticas e a posição original das gemas no corpo da planta influenciam a capacidade de enraizamento dos clones (Pereira & Debergh, 1998; Pereira, 1999; Sudarsono & Goldy, 1991; Thirunavoukkarasu, 2010). Os dados apresentam diferenças significativas entre os diferentes clones sendo de novo os clones 2 e 4 os que maior enraizamento apresentaram.

As diferenças associadas à biossíntese, transporte e degradação (oxidação, conjugação e hidrólise) das diferentes citocininas têm sido usadas para explicar a influência dos tipos de citocininas usadas na fase proliferativa no posterior enraizamento (Podlešáková *et al.*, 2012). No presente trabalho ao estudar a interação entre o tipo de citocinina usada na fase proliferativa (2iP ou zeatina) e o posterior enraizamento, verificamos que ao contrário de algumas espécies (Podwyszyńska *et al.*, 2012). o tipo de citocinina usado não interferiu com as diferentes capacidades de enraizamento dos clones.

## 5. Conclusões

As condições sanitárias das plantas-mãe influenciam profundamente as taxas de contaminação obtidas. O clone 2 e o que apresenta melhor estado fitossanitário. Neste trabalho ainda as taxas de contaminação sejam altas, consegue-se estabelecer todos os clones só com etanol, lixívia e fungicida (sem bicloreto de mercúrio). O 8-HQS exibe propriedades antisépticas e desinfetantes, que suplementado no meio de forragem foi imprescindível para ultrapassar a contaminação. Existe contaminação não visível na solução de forragem que se manifesta no meio de cultura.

A Zeatina (3mg/l) e o 2iP (5mg/l) são dois reguladores de crescimento que dão bons resultados no desenvolvimento dos rebentos, sendo o efeito da Zeatina significativamente superior, mas sendo o custo econômico muito maior o da zeatina que o 2iP, impede o seu uso generalizado. Enquanto ao efeito da subcultura os dados aportam conclusões díspares segundo os diferentes clones. A fase proliferativa 1 mostra uns maiores dados de crescimento sendo a fase proliferativa 2 a que menos indícios de crescimento apresenta das três. A fase proliferativa 3 aponta uns maiores índices de crescimento que nalguns casos voltam-se a agrupar com a fase proliferativa 1. O estado fitossanitário dos clones assim como as suas diferenças genéticas e o origem das gemas, fazem de cada clone e cada gema um espécime com diferentes capacidades para a desinfecção, multiplicação e enraizamento, sendo o clone 4 o melhor deles, seguidamente do clone 2. Enquanto a sacarose, destaca que a sacarose alimentícia não é só tão boa como a de uso laboratorial, se não que até apresenta melhores resultados no desenvolvimento dos rebentos.

No enraizamento comprovou-se que o fator tempo tinha influência no desenvolvimento da raiz depois das primeiras 8 semanas. Como na fase anterior o estado fitossanitário e as diferenças genéticas e o origem das gemas, também influenciam no enraizamento. Os dados apresentam diferenças significativas entre os diferentes clones sendo de novo os clones 2 e 4 os que maior enraizamento apresentam. , enquanto as citocininas da fase de multiplicação. Os dados destacam que não há diferença significativa no enraizamento entre os tubos que provêm do meio com 2iP e os que vêm do meio com Zeatina.

## Referencias

- Amjad, A. & I. Ahmad (2012). "Optimizing plant density, planting depth and postharvest preservatives for *Lilium longifolium*". Journal of Ornamental and Horticultural Plants 2(1):13-20.
- Asrar, A. (2012). "Effects of some preservative solutions on vase life and keeping quality of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) cut flowers". Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 11(1):29-35.
- Bennett, I. J; McComb, J. A; Tonkinf C. M. & D. A. J. McDavid (1994) "Alternating Cytokinins in Multiplication Media Stimulates in Vitro Shoot Growth and Rooting of *Eucalyptus globulus* Labill.".Annals of Botany 74: 53-58.
- Bermejo, E. H; P. Contreras, S. Capaldi & M. Clemente (1994). "Planes de recuperación de especies andaluzas amenazadas: cultivo *in vitro* de *Betula pendula*". In: *Actas do III Simpósio da Associação Ibero-Macaronésica de Jardins Botânicos, Horta, Portugal, 11-16 Setembro 1994* (ed. Direcção Regional do Ambiente dos Açores), Horta, Portugal pp. 107-122.
- Bramwell, D. (1990). "The role of *in vitro* cultivation in the conservation of endangered species". In: Bermejo, J. E. H., M. Clemente & V. Heywood (Eds.) Conservation techniques in botanic gardens, pp: 3-16 Koeltz Scientific Books, Germany.
- Candeias, M. I. (1992). "Estudo das técnicas de cultura *in vitro* do craveiro. Obtenção de plantas sãs e a sua multiplicação acelerada". Tese de Doutoramento, 183 pp. Estação Agronómica Nacional, Oeiras.
- Cassels, A. C. (1991). "Problems in tissue culture: culture contamination". In: *Micropropagation. Technology and application* (ed. P. Debergh & R. Zimmerman), Kluwer Academic Publishers, Dordrech, pp: 31-44.
- Castrillon, J. C., Carvajal, E., Ligarreto, G. and Magnitskiy, S. (2008). "El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) en diferentes sustratos". *Agronomia Colombiana*. 26(1):16-22.
- Chavez D. J., Lyrene, P. M. (2009). "Production and Identification of Colchicine-derived Tetraploid *Vaccinium darrowii* and Its Use in Breeding". Journal of the American Society for Horticultural Science. vol. 134 no. 3356-363
- Cohen, D. & Elliot D. (1979) "Micropropagation methods for blueberries and tamarillos". Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society 29:177-179

- Debergh, P. C., Read, P. E. (1991). "Micropropagation". In: Debergh, P. C. & R. H. Zimmenman (Eds.) *Micropropagation, technology and application*, pp: 1-14. Kluwer Academic Publishers, London.
- Dias, E. (1996). "*Vegetação Natural dos Açores. Ecologia e Sintaxonomia das Florestas Naturais*". Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo. Tese de Doutoramento. 302 pp.
- Dweikat, I. M. & P. M. Lyrene (1989). "Production and evaluation of a synthetic hexaploid in blueberry". *Theoretical and applied genetics*, 77:799-804.
- Eccher, T., Noe, N. (1989). "Comparison between 2ip and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*)". *Acta Hort. (ISHS)* 241:185-190
- Fang, Y., M. A. L. Smith & M-F. Pépin (1998). "Benzyl adenine restores anthocyanin pigmentation in suspension cultures of wild *Vaccinium pahalae*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54:113-122.
- Fay, M. (1992). "Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods". *In vitro Cellular Dev. Biology.*, 28:1-4.
- Fay, M. (1993). "Micropropagation of plants from the Canary islands". *Boletim do Museu Municipal do Funchal*, 2:85-88.
- Fay, M. (1994). "In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?". *Biodiversity and Conservation*, 3:176-183.
- Fernandes, F. M. & M. S. P. Teles (1994). "Propagação *in vitro* do *Pittosporum coriaceum* Ait., endemismo madeirense em risco de extinção". In: *Actas do III Simpósio da Associação Ibero-Macaronésica de Jardins Botânicos, Horta, Portugal, 11-16 Setembro 1994*.(ed. Direcção Regional do Ambiente dos Açores), Horta, Portugal, p.131.
- Garley, Bruce, C. Stushnoff, D. Willdung & P. E. Read (1979). "Micropropagation of blueberry hybrids using single bud stem segments and stemtips". *HortScience*, 14(3): 101.
- Goldy, R. & P. Lyrene (1984). "*In vitro* colchicine treatment of 4x blueberries *Vaccinium* sp." *Journal of American Society of Horticultural Sciences*, 109(3): 336-338.
- Hirotooshi, T; Shoko, K; Takuya, T; Haruki, K; Hisato, K. (2012). "Induction of Polyploids in *Vaccinium* Using Oryzalin and Colchicine Treatments". *Horticultural Research (Japan)*; ISSN:1347-2658; VOL.11; NO.2; PAGE.205-212;
- Iglesias, I; S. F. Fernández & A. Ferreiro (1996). "Conservación efectiva de plantas en peligro de extinción mediante tecnologías aplicadas sobre el terreno y/o laboratorio". In: *Actas*

del IV Simposio de la Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos, Santiago de Compostela, España, 18-20 Junio 1996.(ed. Jardín Botánico de Galicia) Imprenta Universitaria, Santiago de Compostela, España, p.69.

- IUCN (2013) “Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN”. Versão 3.1. Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom.
- Kacer, Y. A; Mazmanoglu, M; Mendi, Y. Y; Serce, S. and Cetiner, S. (2005). “The Effect of Cytokinin Type and Concentration on Multiplication Rate of *Spathiphyllum* (Fam. Araceae)”. *Asian Journal of Plant Sciences*, 4: 401-404.
- Laimer, M., Machado, A., Hanzer, V., Kalthoff, B., Weib, H., Mattanovich, D., Regner, F. and Katinger, H. (1991). “A new, efficient method using 8-hydroxy-quinolinol-sulfate for the initiation and establishment of tissue cultures of apple from adult material”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27:155-160.
- Leifert, C., E. Morris & W. M. Waites (1994). “Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination *problems in vitro*”. *Critical Reviews in Plant Science*, 13(2): 139-183.
- Litwińczuk W. (2013). “Micropropagation of *Vaccinium* sp. by in vitro axillary shoot proliferation”. *Methods in Molecular Biology*. 2013;11013:63-76.
- Lloyd, G. & B. McCown (1981). "Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture". *Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society* 30: 421–427.
- Lyrene, P. & I. Perry (1982). “Production and selection of blueberry polyploids *in vitro*”. *The Journal of Heredity*, 73: 377-378.
- Lyrene, P. & J. Perry (1988). “Blueberries (*Vaccinium* spp.)”. *In: Biotechnologie in agriculture and forestry* (ed. Y P S Bajaj) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 6 (Crops II): 181-198.
- Mbanaso, E. N. A. (2008) “Effect of multiple subcultures on *Musa* shoots derived from cassava starch-gelled multiplication médium during micropropagation”. National Root Crops Research Institute, Umudike, PMB 7006, Nigeria.
- Moura, M. (1995). “Cultura *in vitro* de seis taxa vasculares endémicos dos Açores: *Hypericum foliosum* Aiton, *Lotus azoricus* P. W. Ball, *Euphorbia azorica* Seubert, *Daboecia azorica* Tutin & Warburg, *Tolpis azorica* P. Silva e *Leontodon filii* (Hochst.) Paiva & Ormonde”. Tese de Mestrado 152 pp.. Universidade dos Açores, Ponta Delgada.

- Moura, M. & L. Silva (2009). "Vegetative propagation of the Azorean endemic shrub *Viburnum treleasei*". Gand. Arquipélago. Life and Marine Sciences 26:01-07.
- Muñoz, C. & P. Lyrene (1985). "In vitro attempts to overcome the cross-incompatibility between *Vaccinium corymbosum* L. and *V. elliottii* Chapm.". *Theoretical and Applied Genetics*, 69: 591-596.
- Rudi Hari Murti, R. H., Yeoung, Y. R. (2013). "Effects of BA and IBA concentrations and subculture frequent on meristem culture of strawberry" ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. VOL. 8, NO. 5.
- Nickerson, N. L. (1978). "In vitro shoot formation in lowbush blueberry plântula explants". *HortScience*, 13(6): 698.
- Ostrolucká, M.G., Libiaková, G., Ondrušková, E. and Gajdošová, A. (2004). "In vitro propagation of *Vaccinium* species". *Acta Universitatis Latviensis, Biology* 676:207-212.
- Ostrolucká, M. G; Gajdošová, A; Libiaková, G; Hrubíková, K; Bežo M. (2007)." Protocol for Micropropagation of Selected *Vaccinium* spp.". *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, pp. 445-455.
- Palhinha, R. T. (1966). "Catálogo das plantas vasculares dos Açores". Edição da Sociedade de Estudos Açoreanos Afonso Chaves, Lisboa. 186 pp.
- Pereira, M. J. (2012). "Germplasm Selection and Breeding by In Vitro Culture of Wild Grown Azorean Blueberry (*Vaccinium cylindraceum*) at São Miguel Island". *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science.
- Pereira, M. J. (1999). "Contribuição para o estudo e conservação de *Vaccinium cylindraceum* Smith, uma espécie endémica da flora Açoriana". Unpublished D. Phil Thesis, Azores University.
- Pereira, M.J. (2006). "Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (*Ericaceae*) by micropropagation using seedling nodal explants". *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42(1):65-68.
- Pereira, M. J; Debergh P. (1998). "In vitro establishment of *Vaccinium cylindraceum* Smith". *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent*, 63 (1): 69-80.
- Pereira, M. J. *et al.*, (2009). "Catálogo das plantas vasculares citadas para a ilha de Santa Maria". *Relatórios e Comunicações do Departamento de Biologia*, 36, 131-165, (2009). (Santa Maria Island Checklist of Vascular Plants).

- Pereira, M. J. *et al.*, (2007). “*Catálogo das plantas vasculares da ilha do Corvo*”. Relatórios e Comunicações do Departamento de Biologia, 35, 125-142,
- Pereira, M. J. *et al.*, (2004). “*Catálogo das plantas vasculares da Ilha Graciosa*”. Relatórios e Comunicações do Departamento de Biologia, 32, 69-92, (2004).
- Pereira, M. J.; Ponte, M.; Pietrzak, M. & Martín-Rucandio, I. (2012). “*In vitro* establishment of Azorean blueberry (*Vaccinium cylindraceum* Sm.) selected clones from São Miguel Island”. FloraMac congress 2012.
- Pereira, Maria J. B. T. (2008). "Reproductive biology of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae) an endemic species of Azores archipelago. ", *Can. J. Bot.*, 4: 359 - 366.
- Pereira, M. J. (2009). “Reversion to juvenility: the use of epicormics in the micropropagation of mature wild shrubs of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae)”. *Arquipélago. Life and Marine Sciences* 26: 63-68.
- Pereira, Maria J. B. T; Mourato, C.. (2012). "Effects of bird ingestion on seed germination of *Vaccinium cylindraceum* Smith, an endemic species of Azores Archipelago.", *Botany* 90, 5: 373 - 377.
- Podlešáková, K; Zalabák, D; Čudejková, M; Plíhal, O; Szüčová, L; *et al.* (2012). “Novel Cytokinin Derivatives Do Not Show Negative Effects on Root Growth and Proliferation in Submicromolar Range”. *PLoS ONE* 7(6): e39293. doi:10.1371/journal.pone.0039293
- Podwyszyńska, M; Węgrzynowicz-Lesiak, E; Doležal, K; Krekule, J; Strnad, M; and Saniewski 1o, M; (2012). “New cytokinins – meta-methoxytopolins in micropropagation of *cotinus coggygria* scop. (royal purple)”. (*Propagation of Ornamental Plants*12(4): 220-228.
- Ramezanizadeh, R., Karimzadeh, G. and Babaei A. (2012). “Programmed cell death in rose (*Rosa hybrida* cv. Dolce vita+) cut flowers as influenced by chemical or physical factors”. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 62:507-508.
- Pérez, C; J. M Iriondo J. M; Gonzalez-Benito, C. Martín & F. Pérez-García (1994). “Aplicación de nuevas técnicas a la conservación *ex situ* de la flora ibero-macaronésica amenazada”. *In: Actas do III Simpósio da Associação Ibero-Macaronésica de Jardins Botânicos, Horta, Portugal, 11-16 Setembro 1994.*(ed. Direcção Regional do Ambiente dos Açores), Horta, Portugal, pp. 30-40.
- Red Natura 2000 (2013) “Natura 2000 barometer”. European Topic Centre on Biological Diversity. Paris, França.

- Reed, B. & A. Abdelnour-Esquível (1991). "The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars". *HortScience*, 26(10): 1320-1322.
- Reed, B. & A. Abdelnour-Esquível (1991). "The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience* 26(10):1320-1322.
- Ružić, D., Vujović, T., Libiakova, G., Cerović, R. and Gajdošova A. (2012). "Micropropagation *in vitro* of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)". *Journal of Berry Research* 2(2):97-103.
- Schäfer, H. (2002). "Flora of the Azores. A Field Guide". Margraf Verlag. Weikersheim 264pp.
- Sedlák, J. and Paprštejn F. (2011). "Micropropagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) through shoot tip cultures". *Horticulturae Science (Prague)* 38(4):159-162.
- Serra, I. & J. L. Berdonces (2010) "Gran Enciclopedia De Las Plantas Medicinales/ Great Encyclopedia of Medicinal Plants: El Dioscorides Del Tercer Milenio" Editoroal Susaeta.
- Shibli, R. A., M. A. L. Smith & M. A. Shatnawi (1999). "Pigment recovery from encapsulated-dehydrated *Vaccinium pahalae* (ohelo) cryopreserved cells". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 119-123.
- Sigma-Aldrich. Quinolines. (2012). [www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16269315](http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16269315)
- Silva, L; Martins, M; Maciel, G; Moura, M; (2009). "Flora vascular dos Açores. Prioridades em conservação". Amigos dos Açores & CCPA, Ponta Delgada, 116 pp.
- Smith, J. E. (1817) "Protologue of *Vaccinium cylindraceum*" in Rees's Cyclopaedia, Vol. 36. London: Longman, Hurst, Rees, Orme and Brown.
- Sudarsono, J. B & R. G. Goldy (2010). "Growth Regulator and Axillary Bud Position Effects on *in Vitro* Establishment of *Vitis rotundifolia*". *Hortscience* 26(3):304-307.
- Thirunavoukkarasu, M; Panda, P. K; Nayak, P; Behera, P. R; Satpathy, G. B. (2010). "Effect of media type and explant source on micropropagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. - An important multipurpose forest tree". *International Research Journal of Plant Science (ISSN: 2141-5447)* Vol. 1(6) pp. 155-162.
- Vander Kloet S. P. & T. A. Dickinson (1992). "The taxonomy of *Vaccinium* section *Hemimyrtillus*". *The Botanical Magazine-Tokyo*, 105:601-614.
- Yew, C. K; Balakrishnan, B; Sundasekaran, J. and Subramaniam, S. (2010). "The effect of cytokinins on *in vitro* shoot length and multiplication of *Hymenocallis littoralis*". *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(24), pp. 2641-2646.

- Yu, X. and Reed, B. (1995). "A Micropropagation system for hazelnuts (*Corylus Species*)". Hortscience 30(1):120–123.
- Zeldin, E. L. & B. H. McCown (2004). "Polyploid breeding and the potential of its use for transgene containment with american cranberry (*Vaccinium macrocarpon*)". Acta Hort. (ISHS)663:835-840.
- Zimmerman, R. H. & O. C. Broome (1980). "Blueberry micropropagation". *In: Proceedings of the Conference on Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture-Applications and Feasibility* (ed. R. H. Zimmerman), Md. USDA Publ., Beltsville, USA, pp. 44-47.