



Ana Cristina Pessoa Tavares dos Santos

Conservação *in vitro* e *ex situ* e valorização de endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas

Tese de Doutoramento em Biologia, especialidade de Fisiologia, apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, sob orientação do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e da Professora Doutora Ligia Maria Ribeiro Pires Salgueiro da Silva Couto.

2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Conservação *in vitro* e *ex situ* e valorização de
endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas

Ana Cristina Pessoa Tavares dos Santos

COIMBRA

2012

Conservação *in vitro* e *ex situ* e valorização de
endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas

Tese de Doutoramento em Biologia, especialidade
de Fisiologia, apresentada à Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra, sob orientação do
Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e da
Professora Doutora Lúcia Maria Ribeiro Pires Salgueiro da
Silva Couto.

Ana Cristina Pessoa Tavares dos Santos

COIMBRA

2012

Aos meus Queridos Pais

À Ana Luísa e à Mariana,
as minhas sementinhas prediletas

Ao Tó Campos,
companheiro de viagem,

dedico este trabalho.

Às seguintes instituições que apoiaram este trabalho, o meu reconhecimento: Centro de Ecologia Funcional da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; Centro de Estudos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; Fundação Portuguesa EDP/Biodiversidade pelo apoio financeiro no projeto “Conservação e Valorização da Flora Endémica Ameaçada em Portugal”; Instituto de Investigação Interdisciplinar da Universidade de Coimbra, pela atribuição da Bolsa de Doutoramento (III/05/2007).

AGRADECIMENTOS

A vida desviou-me de um caminho para outro, onde pude concretizar esta tarefa que estava por fazer. Só foi possível com a contribuição de muitas pessoas, laboratórios e instituições, com quem tive o privilégio de trabalhar e a quem quero expressar o meu reconhecimento sincero.

Retomei a minha formação de base no laboratório de biotecnologia, onde encontrei o apoio e a orientação fundamentais do Professor Doutor Jorge Canhoto, pessoa que estimo e admiro e a quem muito agradeço.

As plantas aromáticas e medicinais, meu tema de eleição, foram a matéria-prima. Para o estudo dos óleos essenciais contei com a orientação e acompanhamento inexcedíveis da Professora Doutora Lígia Salgueiro, por quem tenho muito apreço e admiração e estou imensamente reconhecida.

A família das apiáceas, plantas pouco estudadas em Portugal, em particular as endémicas, foi a indicação abalizada do Professor Doutor Jorge Paiva, que tenho a sorte de ter como referência; o meu bem-haja pela permanente disponibilidade e preciosa ajuda.

O tema adequava-se enquanto complemento e enriquecimento do meu trabalho e das coleções do jardim botânico.

Aos Professores Doutores Maria José Gonçalves e Carlos Cavaleiro agradeço pela competente colaboração e ensinamentos e pela amizade e incentivo permanentes.

Aos Professores Doutores João Loureiro e Sílvia Loureiro, a minha amizade e agradecimento pelos ensinamentos e prossecução de técnicas laboratoriais, iniciadas na Universidade de Aveiro, com o apoio das Professoras Doutoras Conceição Santos e Helena Oliveira, a quem igualmente agradeço.

Ao Professor Doutor António Xavier Pereira Coutinho, meu amigo de sempre, agradeço o apoio e acompanhamento laboratorial, e a boa disposição, interesse e incentivo permanentes.

À Professora Doutora Helena Freitas, Diretora do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra, o meu agradecimento pela possibilidade de utilizar os recursos e espaços do jardim.

Ao Professor Doutor Augusto Dinis, agradeço a possibilidade de trabalhar no laboratório de microscopia eletrónica e todo o apoio logístico, bem como ao Dr. José Dias.

Aos Professores Doutores Carlos Aguiar, Gonzalo Mateo e Antonio Pujadas Salvá agradeço pela disponibilidade, simpatia e clarificação nas questões taxonómicas.

À Professora Doutora Fátima Sales, agradeço pela possibilidade de consultar e trabalhar no Herbário de Coimbra, bem como à D.^a Maria Manuela Santos pela disponibilidade, interesse e acompanhamento.

Ao Doutor João Almeida e ao Sr. Arménio Matos, agradeço pela amizade, pelo companheirismo e interesse permanentes, e em particular pelo inestimável apoio e ensinamentos, nas múltiplas saídas de campo que realizámos, de norte a sul do país.

Ao Dr. Alexandre Silva agradeço o apoio logístico na localização e colheita de sementes na Serra da Estrela.

No trabalho de campo, agradeço o apoio das minhas filhas Ana Luisa e Mariana: juntas encontramos a primeira planta a estudar (registo na capa !) e me acompanharam, por vezes em condições climáticas severas; obrigada Mizé e cunhado Veiga, e também a meu Pai. Ao José António Campos, pela companhia, num longo período de saídas de campo, pela inestimável ajuda na localização e na colheita das plantas: ultrapassámos múltiplas dificuldades.

À Dr.^a Noémia Canas agradeço pela simpatia, disponibilidade e apoio nas pesquisas bibliográficas de especialidade e à Dr.^a Ludovina Lopes e à Dr.^a Elisa Figueiredo pela colaboração técnica em situações de maior dificuldade.

À Dr.^a Susana Silva pela amizade e incentivo permanentes e pelo apoio inestimável na revisão do manuscrito e ao Dr. Joaquim Santos pela disponibilidade e competência na formatação final da tese.

À D.^a Eulália Rosa e à D.^a Isabel Ivone, agradeço pelo acompanhamento do trabalho de laboratório e à D.^a Cândida e D.^a Ana Cristina pela dedicação e empenho no decurso dos longos processos laboratoriais; aos Senhores José Brazão e Raul Cardoso agradeço a disponibilidade no apoio laboratorial.

À D.^a Lurdes Serralheiro agradeço a amizade, o incentivo e o sorriso diário.

Aos colaboradores-guias do jardim botânico, com quem sempre pude contar, agradeço pela confiança e incentivo permanentes e aos Senhores Jardineiros pelo apoio no acompanhamento e instalação das culturas no jardim botânico.

Pela possibilidade de usufruir do equipamento e condições para a realização de trabalho experimental, os meus agradecimentos aos Laboratórios de investigação: Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de Aveiro.

Aos Parques e Reservas Nacionais e suas equipas, ao Instituto de Conservação da Natureza e da Biodiversidade; à Dr.^a Conceição Girão e à Polícia Marítima de Peniche agradeço o apoio logístico no transporte para a instalação das plantas. Ao Sr. Marco, pelo acompanhamento de campo no Parque Nacional do Gerês.

Aos Herbários portugueses e espanhóis e suas equipas, agradeço pelo contributo e o apoio a este trabalho.

O meu sincero AGRADECIMENTO a todas as pessoas que me dedicaram parte do seu tempo e que, de uma forma ou de outra, facilitaram o meu trabalho.

Que tenha contribuído um nico para a construção e partilha do conhecimento científico e possa facilitar novas pesquisas.

Por mim, valeu! A busca de conhecimentos de botânica, de fisiologia e das ciências farmacêuticas foi um desafio aliciante que me proporcionou uma aventura gratificante, por entre os infindáveis Segredos da Natureza.

Ana Cristina Tavares

Para a elaboração desta dissertação foram utilizados dados apresentados nos seguintes trabalhos:

Artigos publicados

Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro L. (2008) Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 119:129-134.

Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto JM. (2009-2010) *In vitro* conservation of *Angelica pachycarpa*, an Iberian endemic Apiaceae of the Portuguese Berlenga Islands. *Revista del Jardín Botánico Nacional de Cuba*, 30-31:109-111.

Tavares AC, Gonçalves MJ, Cruz MC, Cavaleiro C, Lopes MC, Canhoto JM, Salgueiro L. (2010) Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: Chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 130:593-598.

Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto J. (2010) *In vitro* propagation of the wild carrot *Daucus carota* L. subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas for conservation purposes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46:47-56.

Gonçalves MJ, Tavares AC, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto JM, Salgueiro L. (2012) Composition, antifungal activity and cytotoxicity of of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lainz from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 39:204-209.

Gonçalves MJ, Cruz MT, Tavares AC, Cavaleiro C, Lopes MC, Canhoto JM, Salgueiro L. (2012) Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Industrial Crops and Products*, 35:166-171.

Artigos em publicação

Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto JM, Paiva J. (2012) Iberian endemic Apiaceae: a reassessment for conservation purposes in Portugal. *Studio Botanica*, 29.

Artigos submetidos

Tavares AC, Loureiro J, Cavaleiro C, Salgueiro L, Canhoto JM, Paiva J. (2012) Characterization and distinction of two subspecies of *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss., an Iberian endemic Apiaceae, using flow cytometry and essential oils composition. *Plant Systematics and Evolution*.

Tavares AC, Loureiro J, Castro S, Coutinho A, Paiva J, Cavaleiro C, Salgueiro L, Canhoto J. (2012) Chemotaxonomic, genomic and morphological assessments of *Daucus carota* L. (Apiaceae) subspecies in Portugal. *Biochemical Systemic and Ecology*.

Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto JM, Paiva J. (2012) New Iberian endemic Apiaceae at the Botanical Garden of the University of Coimbra. Sixth Eurogarden-european Botanic Gardens Congress. Chios, Greece, 28 maio-02 junho. Comunicação em painel. Pg. 64. (Submetido a *Congress Proceedings*).

Comunicações orais

Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L, Canhoto JM. (2008) Iberian-Lusitanian endemic Apiaceae: *in vitro* protocols for *ex situ* conservation and essential oil characterization. Workshop in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. "Search for drugs from natural Sources". Organização CEF (Centro de Estudos Farmacêuticos). Faculdade de Farmácia, UC. Pág. 46.

Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto J. (2009) Micropropagation of the Iberian endemism *Distichoselinum tenuifolium* (Lag.) García Martín & Silvestre through shoot proliferation and somatic embryogenesis. X Simpósio da Associação Ibero-Macaronésica de Jardins Botânicos, Jardim Botânico Histórico La Concepción, Málaga. Pg. 50.

Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto J. (2010) *In vitro* flowering in cultures of *Daucus carota* subsp. *halophilus*, a Portuguese endemic carrot. 28th International Horticultural Congress. Lisboa-2010. Pg. 67.

Tavares AC, Canhoto J, Salgueiro L. (2010) Iberian-Lusitanian endemic Apiaceae: conserving new plants with sustainable uses. VIII Internacional Ethnobotany Symposium. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Pg. 36.

Tavares AC. (2011) Rare plants with new potential uses: *in vitro* and *ex situ* conservation of Portuguese endemic Apiaceae and biochemical characterization of their essential oils. First III-UC Researcher Forum. Institute for Interdisciplinary Research University of Coimbra. September 29-30, 2011. Anfiteatro Langinha Serafim. Pólo II. Universidade de Coimbra.

Tavares AC. (2011) Approaches to explore the potencial of endemic Apiaceae: *in vitro* propagation and essential oil analysis. ScienceCEF 2011. 12 julho. Anfiteatro Tomé Pires. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Comunicações em painel

Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto J. (2008) Ibero-Lusitanian endemic Apiaceae: geographical distribution and characterization of habitats for *in vitro* and *ex situ* conservation. VII Encontro Internacional da Associação Lusitana de Fitossociologia. Pgs. 48-49.

Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L, Canhoto JM. (2010) *In vitro* conservation protocols and essential oils studies of rare Ibero-lusitanian Apiaceae. CEF's Meeting 2010. Faculdade de Farmácia da UC. Pg. 34.

Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto J. (2010) Application of *in vitro* culture methods to the conservation of Ibero-Lusitanian endemic Apiaceae at the Botanic Garden of the University of Coimbra (Portugal). 4th Global Botanic Gardens Congress. Dublin, Ireland. Pg. 139.

Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Canhoto J, Salgueiro L. (2010) Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Thapsia minor* Hoffmanns. & Link, an endemic Iberian-Lusitanian Apiaceae. The 2nd International Symposium on Medicinal Plants. Their Cultivation and Aspects of Uses. Petra - Jordan. Pg. 151.

Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L, Canhoto JM. (2011) Essential oils assessment of rare Apiaceae in Portugal: *Daucus carota* subsp. *halophilus* and *Distichoselinum tenuifolium*. CEF's Meeting 2011. 27 Setembro. Faculdade de Farmácia da UC. Pg. 25.

Tavares AC, Loureiro J, Figueiredo E, Lopes L, Salgueiro L, Canhoto JM. (2011) *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss., a Portuguese endemic Apiaceae: characterization and distinction of two subspecies. XXXVI Jornadas Portuguesas de Genética. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Pg. 55.

Tavares AC, Loureiro J, Oliveira H, Salgueiro L, Canhoto JM. (2011) Somatic embryogenesis quantification and *in vitro* ploidy stability of *Daucus carota* subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas, the Portuguese endemic carrot. XI Simpósio da Associação Ibero-Macaronésia de Jardins Botânicos. Jardim Botânico do Faial, Açores. Pgs. 20-21.

Gonçalves MJ, Tavares AC, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro L. (2011) Composition and biological activity of the essential oil of *Thapsia minor*. "Traditional Medicines and Globalization - the future of ancient systems of Medicine". Kolkata - Tailândia. Pg. 128.

Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto JM. (2011) *In vitro* conservation of *Seseli montanum* L. subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Láinz, an Iberian serpentine endemism of Trás-os-Montes (Portugal). 7th International Conference on Serpentine Ecology, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Pg. 135.

Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto JM, Paiva J. (2012) New Iberian endemic Apiaceae at the Botanical Garden of the University of Coimbra. Sixth Eurogarden-european Botanic Gardens Congress. Chios, Greece. Pg. 64.

01 de junho 2007 a 31 agosto 2012

RESUMO

As ameaças crescentes à perda de biodiversidade impõem medidas que invertam essa tendência. A fitodiversidade é a base da vida na Terra e indispensável ao funcionamento dos ecossistemas pelo que a sua conservação é urgente, particularmente a de espécies raras e em maior risco, como as endémicas, de habitats e características muito peculiares. O conhecimento de propriedades intrínsecas a estes *taxa* promove a sua valorização e interesse e o recurso a técnicas de micropropagação *in vitro* permite a sua preservação pela utilização e aplicação sustentáveis.

Neste contexto, propusemo-nos estudar as Apiaceae ibéricas endémicas com representação em Portugal, identificando catorze *taxa* pertencentes a onze géneros (*Angelica*, *Bunium*, *Conopodium*, *Daucus*, *Distichoselinum*, *Eryngium*, *Ferula*, *Ferulago*, *Laserpitium*, *Seseli*, *Thapsia*), 13 endemismos de Portugal e Espanha e um endemismo exclusivamente português, *Daucus carota* subsp. *halophilus*. Este *taxon* e *Angelica pachycarpa*, *Distichoselinum tenuifolium* e *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* têm uma área geográfica de distribuição mais restrita. Priorizando a colheita sustentada das espécies mais ameaçadas, pelo estudo de Floras, exemplares de Herbário e outra informação disponível, procedeu-se à localização, identificação, conservação e valorização de treze dos *taxa*, estando apenas *Bunium macuca* subsp. *macuca* por localizar. Para isso, foi feito o reconhecimento das localidades e representação em Portugal, em mais de 150 saídas de campo de norte a sul e os respetivos exemplares voucher depositados no Herbário COI. A avaliação do ciclo de vida e fenologia é determinante para a colheita sustentada, tendo-se recolhido 11 *taxa* para o banco de sementes, dos quais seis foram novidade e integrados pela primeira vez no banco de sementes do Jardim Botânico de Coimbra, Banco de Germoplasma de Braga e do *Millenium Seed Bank*, em Kew. A reserva no Jardim Botânico foi implementada para a conservação *ex situ* (sementes e coleções vivas) e *in vitro* e *in situ* das plantas, com recurso à micropropagação dos quatro *taxa* prioritários e respetiva aclimatização em condições naturais.

Para a caracterização morfológica dos *taxa*, e dada a grande complexidade taxonómica da família, recorreu-se a metodologias complementares, como a morfometria, microscopia ótica e de *scanning*, citometria de fluxo e caracterização de óleos essenciais, para distinguir *Daucus carota* subsp. *maximus* das outras três subespécies nativas de

Portugal (*D. carota* subsp. *carota*; *D. carota* subsp. *halophilus*; *D. carota* subsp. *gummifer*). Estudos similares permitiram distinguir duas subespécies de *Eryngium duriaei*, nomeadamente, *Eryngium duriaei* subsp. *duriaei* e *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum*.

Nos quatro *taxa* mais vulneráveis estabeleceram-se protocolos de micropropagação com vista à multiplicação em larga escala. Foram testados diferentes tipos de explantes (ápices caulinares, segmentos foliares, pecíolos e raízes) e diferentes técnicas de micropropagação: proliferação de meristemas, organogénese e embriogénese somática. Para todos os *taxa* foi possível a regeneração por proliferação de meristemas e por embriogénese somática bem como a respetiva aclimação de plantas. Para alguns dos *taxa* foi possível verificar que a cultura *in vitro* não induziu variabilidade ao nível do cariótipo.

Para além dos ensaios de micropropagação, estabeleceu-se também um protocolo de indução floral *in vitro* em *Daucus carota* subsp. *halophilus* tendo-se otimizado as condições de indução de floração e caracterizado este processo de morfogénese quer em termos das condições de cultura quer do desenvolvimento floral por microscopia ótica e eletrónica de varrimento. Os resultados mostraram que o IAA e a BA são importantes na evocação floral. A análise do pólen mostrou que embora este fosse formado *in vitro* não foi possível conseguir a sua germinação quer em meio sintético quer em polinizações artificiais.

Outro aspeto importante do trabalho centrou-se na caracterização dos óleos essenciais de alguns *taxa* de forma a conseguir a sua valorização e uma mais fácil aceitação em termos de conservação. Este tipo de análises foi realizado em *Daucus carota* subsp. *halophilus*, *Distichoselinum tenuifolium*, *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* e *Eryngium duriaei*, (duas subespécies: *Eryngium duriaei* subsp. *duriaei* e *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum*) e ainda *Thapsia minor*. A composição química dos óleos foi determinada por cromatografia gás-líquido de alta resolução e cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa. Para a maioria dos óleos foram conseguidas percentagens de identificação superiores a 90%. Os óleos foram obtidos de plantas em diferentes estágios de desenvolvimento, com o objetivo de identificar a fase de maior rendimento em óleo essencial ou que produz óleos de composição particular. Foi feita a avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais com vista à validação científica de usos populares e eventual avaliação do seu potencial industrial. Os óleos essenciais que apresentaram maior atividade antifúngica foram os de *Daucus carota* subsp. *halophilus*,

ricos em elemicina, particularmente contra dermatófitos e *Cryptococcus neoformans*. Os óleos essenciais de *Distichoselinum tenuifolium* e de *Thapsia minor* também revelaram ter propriedades antifúngicas, sendo o mirceno e o acetato de geranilo, respetivamente, o constituinte químico maioritário do óleo.

Os óleos essenciais mostraram ainda poder ser utilizados como importantes auxiliares de diagnóstico quimiotaxonómico na avaliação, certificação e clarificação taxonómica de dois *taxa*, *Daucus* e *Eryngium*, comprovando-se a asarona como marcador para *Daucus carota* subsp. *maximus* e α -neocalitropseno, o constituinte químico marcador exclusivo de *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum*.

Palavras-chave: biodiversidade, citometria, cultura *in vitro*, floração, óleos essenciais, quimiotaxonomia.

ABSTRACT

The increasing threats to biodiversity loss require measures to reverse this trend. The phytodiversity is the basis of life on Earth and vital to the functioning of ecosystems, so their conservation is urgently needed, particularly for rare species and those at higher risks, such as endemics. The knowledge of the intrinsic properties of these *taxa* promotes their interest and utility and the use of *in vitro* micropropagation techniques enables its preservation for sustainable use and application.

In this context, it was decided to study the Iberian endemic Apiaceae with representation in Portugal, identifying fourteen *taxa* belonging to eleven genera (*Angelica*, *Bunium*, *Conopodium*, *Daucus*, *Distichoselinum*, *Eryngium*, *Ferula*, *Ferulago*, *Laserpitium*, *Seseli*, *Thapsia*), 13 endemic *taxa* from Portugal and Spain and one endemism restricted to Portugal, *Daucus carota* subsp. *halophilus*. This *taxon* and *Angelica pachycarpa*, *Distichoselinum tenuifolium* and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* have a more restricted distribution. Prioritizing sustainable harvesting of the most endangered species, through the study of Floras, herbarium specimens and other available information, we have proceeded to the location, identification, conservation, and enhancement of thirteen of the *taxa*, being *Bunium macuca* subsp. *macuca* the only *taxon* left to trace. For that, we have made the recognition of locations and representation in Portugal, in more than 150 field trips from north to south and the respective voucher specimens were deposited in the COI Herbarium. The evaluation of the life cycle and phenology is crucial for a sustainable harvesting. Based on this knowledge 11 *taxa* were collected for the seed bank, from which six were new and integrated for the first time in the seed bank of the Botanical Garden of Coimbra. Samples were also sent to the Portuguese Bank of Germoplasm (Braga) and to the Millennium Seed Bank (Kew). An *ex-situ* collection was also implemented at the Botanic Garden of the University of Coimbra for plants obtained from seeds and from *in vitro* culture of the four priority *taxa*.

For the morphological characterization of the *taxa*, and given the great taxonomic complexity of the family, complementary methodologies such as morphology, optical and scanning microscopy, flow cytometry and essential oils characterization were used to distinguish the endemism *Daucus carota* subsp. *maximus* from the other three subspecies

native of Portugal (*D. carota* subsp. *carota*, *D. carota* subsp. *halophilus*; *D. carota* subsp. *gummifer*). Similar studies were carried out in *Eryngium duriaei*, to distinguish between *Eryngium duriaei* subsp. *duriaei* and *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum*.

For the most vulnerable species protocols of micropropagation were established for large scale propagation. Different types of explants (shoot tip, leaf segments, petioles and roots) were tested as well as different techniques of micropropagation: shoot proliferation, somatic embryogenesis and organogenesis. In the conditions tested propagation was achieved both by shoot proliferation and by somatic embryogenesis and plants have been successfully acclimatized. Flow cytometry analysis showed that at least for some of the *taxa* analysed no modifications in the karyotype were induced *in vitro*.

In addition to the micropropagation assays, a protocol for floral induction *in vitro* in *Daucus carota* subsp. *halophilus* was established and the conditions for flower induction optimized. Transition from vegetative to reproductive development was analysed by histological and SEM studies. The results showed that the IAA and BA are important in floral evocation. *In vitro* flowers produced morphologically normal pollen grains but germination *in vitro* or in the pistil was not achieved.

The essential oils of some *taxa*, namely *Daucus carota* subsp. *halophilus*, *Distichoselinum tenuifolium*, *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* and *Eryngium duriaei* (two subspecies: *Eryngium duriaei* subsp. *duriaei* and *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum*) and still *Thapsia minor* were characterized and some of their biological activities evaluated trying to make these *taxa* more interesting for conservation purposes. The chemical composition of the oils was determined by high resolution gas-liquid chromatography and gas-liquid chromatography coupled to mass spectrometry. For most of the oils percentages of identification higher than 90% were obtained. The oils were studied in plants with different stages of development, with the goal of identifying the stage of the greater production of essential oil or oils of particular composition. An evaluation of the antifungal activity of essential oils was made for the scientific validation of popular uses and eventual evaluation of its industrial potential. Essential oils that showed higher antifungal activity were those of *Daucus carota* subsp. *halophilus*, with high levels of elemicine and larger capacity against dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. *Distichoselinum tenuifolium* and *Thapsia minor* also revealed antifungal

properties, being myrcen and geranyl acetate the major chemical compound of the oil, respectively.

The analysis of the essential oils also showed to be an interesting tool for chemotaxonomic diagnostic in the assessment, certification and taxonomic clarification of two taxa, *Daucus* and *Eryngium*, confirming asarone as a marker for *Daucus carota* subsp. *maximus* and α -neocallitropsene, as a chemical component unique of *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum*.

Key-words: biodiversity, chemotaxonomy, cytometry, essential oils, flowering, *in vitro* culture.

ÍNDICE

RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xxi
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Enquadramento do tema da tese.....	3
1.2. Estratégias e métodos de conservação.....	8
1.2.1. Conservação <i>ex situ</i>	10
1.2.1.1. Técnicas de propagação <i>in vitro</i>	11
1.2.1.2. Conservação a longo prazo.....	14
1.2.2. Conservação <i>in situ</i>	15
1.3. Apiaceae - breve descrição e importância.....	17
1.3.1. Endemismos ibéricos representados em Portugal.....	19
1.4. As plantas aromáticas como fonte de metabolitos ativos.....	23
1.4.1. Os óleos essenciais.....	24
1.4.1.1. Obtenção e controlo de qualidade.....	27
1.4.1.2. Caracterização química.....	28
1.4.2. Atividades biológicas.....	30
1.5. Objetivos.....	32
CAPÍTULO 2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1. Identificação e localização dos endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas.....	37
2.1.1. Análise de caracteres taxonómicos.....	39
2.1.2. Microscopia ótica e microscopia eletrónica de varrimento.....	39
2.1.3. Citometria de fluxo.....	40
2.1.4. <i>Daucus carota</i> L.: análise das subespécies nativas em Portugal.....	41
2.1.4.1. Material vegetal - identificação e localização geográfica.....	41
2.1.4.2. Análise morfométrica dos frutos.....	42
2.1.4.3. Teor em DNA e nível de ploidia.....	44
2.1.5. Estudo de <i>Eryngium duriaei</i> J. Gay ex Boiss.....	44
2.1.5.1. Material vegetal – identificação e localização geográfica.....	44
2.1.5.2. Análise morfológica das plantas.....	45
2.1.5.3. Teor em DNA e nível de ploidia.....	46
2.1.5.4. Cultura de embriões zigóticos para análise de cariótipo.....	46
2.2. Ensaio de cultura <i>in vitro</i>	47
2.2.1. Material vegetal.....	47
2.2.2. Germinação de sementes, tipos de explantes e cultura de segmentos nodais.....	47
2.2.3. <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	49
2.2.3.1. Proliferação de meristemas.....	49
2.2.3.2. Enraizamento.....	49
2.2.3.3. Embriogénese somática.....	49
2.2.3.4. Estudo da variabilidade <i>in vitro</i> - citometria de fluxo.....	51
2.2.3.5. Floração <i>in vitro</i>	51
2.2.3.5.1. Estudos de pólen.....	52

2.2.3.5.2.	Ensaio de polinização	53
2.2.3.5.3.	Estudos histológicos e de SEM.....	54
2.2.3.6.	Análise estatística.....	55
2.2.4.	<i>Distichoselinum tenuifolium</i>	56
2.2.4.1.	Proliferação de meristemas.....	56
2.2.4.2.	Enraizamento.....	56
2.2.4.3.	Embriogénese somática.....	56
2.2.4.4.	Organogénese.....	57
2.2.5.	<i>Angelica pachycarpa</i>	57
2.2.5.1.	Proliferação de meristemas.....	57
2.2.5.2.	Enraizamento.....	57
2.2.5.3.	Embriogénese somática.....	58
2.2.6.	<i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	58
2.2.6.1.	Proliferação de meristemas.....	58
2.2.6.2.	Enraizamento.....	59
2.2.6.3.	Embriogénese somática.....	59
2.2.7.	<i>Eryngium duriaei</i>	60
2.2.7.1.	Proliferação de meristemas.....	60
2.2.8.	Cultura <i>ex situ</i>	61
2.2.9.	Cultura <i>in situ</i>	61
2.3.	Extração, caracterização e bioatividade dos óleos essenciais.....	62
2.3.1.	Material vegetal e isolamento dos óleos essenciais.....	62
2.3.2.	Observação de estruturas secretoras.....	63
2.3.3.	Análise dos óleos essenciais.....	63
2.3.4.	Atividade antifúngica.....	65
CAPÍTULO 3. RESULTADOS		67
3.1.	Taxonomia, fenologia e distribuição geográfica dos endemismos Ibéricos das Apiaceae Portuguesas.....	69
3.1.1.	Descrições, caracterização e localização de habitats.....	69
3.1.2.	Conservação de sementes <i>ex situ</i>	77
3.1.3.	Análise de caracteres taxonómicos.....	78
3.1.3.1.	Avaliação morfológica e do teor em DNA das subespécies de <i>Daucus carota</i> L.....	79
3.1.3.1.1.	Morfologia.....	79
3.1.3.1.2.	Avaliação do teor em DNA.....	82
3.1.3.2.	<i>Eryngium duriaei</i> J. Gay ex Boiss: avaliação morfológica e do nível de ploidia.....	83
3.1.3.2.1.	Morfologia.....	83
3.1.3.2.2.	Avaliação do teor em DNA.....	84
3.2.	Cultura <i>in vitro</i> – Micropropagação.....	86
3.2.1.	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	86
3.2.1.1.	Proliferação de meristemas.....	86
3.2.1.2.	Enraizamento e aclimação <i>ex situ</i> e <i>in situ</i>	90
3.2.1.3.	Embriogénese somática.....	92
3.2.1.4.	Manutenção de calos embriogénicos e quantificação da embriogénese.....	95
3.2.1.5.	Variabilidade <i>in vitro</i> - Citometria de fluxo.....	96

3.2.1.6.	Floração <i>in vitro</i> de <i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	97
3.2.1.6.1.	Indução da floração	97
3.2.1.6.2.	Efeitos de diferentes PGRs na floração	100
3.2.1.6.3.	Caracterização das flores formadas <i>in vitro</i>	105
3.2.1.6.4.	Análise do pólen	109
3.2.1.6.5.	Estudos histológicos	110
3.2.2.	<i>Distichoselinum tenuifolium</i>	115
3.2.2.1.	Proliferação de meristemas	115
3.2.2.2.	Embriogénese somática	116
3.2.2.3.	Organogénese	118
3.2.2.4.	Enraizamento e aclimação <i>ex situ</i>	120
3.2.3.	<i>Angelica pachycarpa</i>	121
3.2.3.1.	Proliferação de meristemas	121
3.2.3.2.	Enraizamento e aclimação	122
3.2.3.3.	Embriogénese somática	122
3.2.3.4.	Aclimação <i>ex situ</i> e <i>in situ</i>	124
3.2.4.	<i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	126
3.2.4.1.	Proliferação de meristemas	127
3.2.4.2.	Enraizamento e aclimação <i>ex situ</i>	128
3.2.4.3.	Embriogénese somática	129
3.2.5.	<i>Eryngium duriaei</i>	132
3.2.5.1.	Proliferação de meristemas	132
3.2.6.	Conservação <i>in vitro</i> , <i>ex situ</i> e <i>in situ</i> – avaliação final	133
3.3.	Caracterização e avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais	135
3.3.1.	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	135
3.3.1.1.	Composição química	135
3.3.1.2.	Atividade antifúngica	138
3.3.2.	<i>Distichoselinum tenuifolium</i>	139
3.3.2.1.	Composição química	139
3.3.2.2.	Atividade antifúngica	141
3.3.3.	<i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	142
3.3.3.1.	Composição química	142
3.3.3.2.	Atividade antifúngica	143
3.3.4.	<i>Thapsia minor</i>	145
3.3.4.1.	Composição química	145
3.3.4.2.	Atividade antifúngica	146
3.3.5.	Óleos essenciais e quimiotaxonomia	147
3.3.5.1.	<i>Daucus carota</i> L.	147
3.3.5.2.	<i>Eryngium duriaei</i> J. Gay ex Boiss.	151
CAPÍTULO 4. DISCUSSÃO		155
4.1.	Endemismos Ibéricos das Apiaceae Portuguesas: uma reavaliação para fins de conservação	157
4.1.1.	Taxonomia, fenologia, distribuição geográfica e critérios de conservação	161
4.1.1.1.	Quimiotaxonomia das quatro subspécies de <i>Daucus carota</i> L. nativas em Portugal	166

4.1.1.2.	Quimiotaxonomia das duas subspécies de <i>Eryngium duriaei</i> J. Gay ex Boiss. em Portugal	169
4.2.	Cultura <i>in vitro</i> – Micropropagação	172
4.2.1.	Proliferação de meristemas e organogénese.....	173
4.2.2.	Enraizamento	175
4.2.3.	Embriogénese somática.....	177
4.2.4.	Estabilidade do teor de DNA <i>in vitro</i> e nas plantas micropropagadas.....	182
4.2.5.	Floração <i>in vitro</i>	183
4.2.6.	Avaliação geral da resposta <i>in vitro</i>	186
4.2.7.	Aclimação e conservação <i>ex situ</i> e <i>in situ</i>	187
4.3.	Caracterização e atividade antifúngica dos óleos essenciais	189
4.3.1.	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	190
4.3.2.	<i>Distichoselinum tenuifolium</i>	193
4.3.3.	<i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	194
4.3.4.	<i>Thapsia minor</i>	195
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS		197
CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		203
Anexos		261

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Categorias IUCN, para avaliação de espécies segundo o grau de ameaça: Perigo crítico (CR), Em perigo (EN), Vulnerável (VU), Perto da ameaça (NT), Pouco preocupante (LC), Informação Insuficiente (DD) e Não Avaliado (NE) (retirado de: Bilz <i>et al.</i> , 2011).	6
Figura 2: Rede Natura 2000 (retirado de http://www.icnf.pt/ICNPortal).....	7
Figura 3: Localização das áreas de estudo das populações das quatro subespécies nativas de <i>Daucus carota</i> em Portugal Continental:.....	41
Figura 4: Áreas de estudo das populações de <i>Eryngium duriaei</i> utilizadas neste trabalho. PNG (Parque Nacional do Gerês); PNSE (Parque Natural da Serra da Estrela) e duas localidades do Açor (Serra do Açor: Colcurinho (A) e Margarça (B) (mapa de Portugal adaptado de http://www.google.com/imgres).....	45
Figura 5: Etapas da micropropagação de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> por embriogénese somática.	50
Figura 6: Etapas da micropropagação de <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i> por embriogénese somática utilizando 0,1 mg/L de 2,4-D.....	60
Figura 7: Endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas. a) <i>Ferulago capillaris</i> (Link ex Spreng.) Cout. (leito seco do Rio Homem-Serra do Gerês-Mi); b) <i>Conopodium majus</i> (Gouan) Loret subsp. <i>marizianum</i> (Samp.) López-Udías & Mateo (Montemuro-DL) A.C. Tavares, 46(COI); c) <i>Laserpitium eliasii</i> subsp. <i>thalictrifolium</i> (Samp.) P. Monts. (leito seco do Rio Homem-Serra do Gerês-Mi); d) <i>Seseli montanum</i> L. subsp. <i>peixotoanum</i> (Samp.) M. Lainz (Samil, Bragança-TM); e) <i>Thapsia minor</i> Hoffmanns. & Link. Queimadela (DL); f) <i>Eryngium duriaei</i> J. Gay ex Boiss. subsp. <i>duriaei</i> (Cântaro Raso, Serra da Estrela-BA); g) <i>Angelica major</i> Lag., (Senhora da Pedra, Serra da Estrela-BA); h) <i>Angelica pachycarpa</i> Lange. (Ilha Berlenga-E); i) <i>Ferula communis</i> subsp. <i>catalaunica</i> (Pau ex C. Vicioso) (Óbidos-BL); j) <i>Conopodium subcarneum</i> (Boiss. & Reut.) Boiss. (Aldeia da Pena, S. Pedro do Sul, Serra da Arada-BA); l) <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> (Brot.) A. Pujadas (Cabo S. Vicente-Ag); m) <i>Eryngium galioides</i> Lam. (Nave do Barão, Loulé-Ag); n) <i>Distichoselinum tenuifolium</i> (Lag.) García Martín & Silvestre. (Moncarapacho, Olhão-Ag).	70
Figura 8: Aspectos dos frutos das diferentes subespécies de <i>Daucus carota</i> . a) <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> ; b) <i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i> ; c) <i>Daucus carota</i> subsp. <i>maximus</i> ; d) <i>Daucus carota</i> subsp. <i>gummifer</i> . Escala: quadrícula do papel de fundo das fotografias = 1 mm.	79
Figura 9: Análise de componentes principais (PCA) dos frutos das subespécies de <i>Daucus carota</i> nativas em Portugal. 81	
Figura 10: Detalhes dos espinhos dos aquénios. a) <i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i> . b) <i>D. carota</i> subsp. <i>gummifer</i> . c) <i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i> . d) <i>D. carota</i> subsp. <i>maximus</i> . <i>si</i> - espinho simple, <i>os</i> - espinho unifurcado, <i>ss</i> - espinho estrelado; <i>ts</i> - espinho bifurcado.	82
Figura 11: <i>Eryngium duriaei</i> . a) PNSE, Cântaro Raso (acima de 1.700m). b) AÇOR, Colcurinho (abaixo de 1.700 m). 84	

Figura 12: Histograma de fluorescência obtido após análise simultânea de núcleos, isolados a partir de folhas de *Eryngium duriaei* de um indivíduo da Mata da Margaraça e de outro da Serra da Estrela..... 85

Figura 13: Análise citológica de *Eryngium duriaei*. a) c-metáfase com 16 cromossomas, planta da Mata da Margaraça (abaixo de 1.700m). b) Como em a), mas de uma planta da Serra da Estrela (acima de 1.700m). Os cromossomas estão amplificados 840x. 86

Figura 14: Aspectos morfológicos da proliferação *in vitro* de rebentos de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. a) Localidade de *Daucus carota* subsp. *halophilus* para recolha de sementes. b) Sementes germinadas após 4 semanas. A caixa indica o explante - ápice caulinar - cultivado na primeira inoculação. c) Rebentos obtidos em meio com 2 mg/L BA após 4 semanas de cultura do ápice caulinar. d) Aspetto geral de vários rebentos obtidos após o primeiro ciclo de proliferação. A seta indica o explante utilizado na segunda inoculação. e) Rebentos obtidos no segundo ciclo de proliferação. Comparação entre os rebentos obtidos em meios contendo concentrações diferentes de BA. f) e g) Organogénese: formação de rebentos em calos produzidos na base dos rebentos cultivados em meio contendo 2 mg/L BA. As setas apontam para rebentos adventícios. h) Flores rudimentares (setas) desenvolvidas a partir de rebentos produzidos *in vitro*. i) Flores completas (setas) produzidas em rebentos foliares em desenvolvimento. j) Seção transversal de um pedúnculo floral produzido *in vitro*. A caixa indica uma cavidade secretora. p) Floema, t) Tricomas e x) Xilema. k) Detalhe da cavidade secretora em j. 89

Figura 15: Enraizamento e aclimação de plântulas de *Daucus carota* subsp. *halophilus* obtidas *in vitro*. a) Plântulas antes de serem transferidas para meio de enraizamento. b) Plântula enraizada *in vitro* sem anomalias morfológicas nas raízes (setas). c) Processo de aclimação. d) Plantas no Jardim Botânico de Coimbra, oito meses após o início da cultura. e) Detalhe de uma planta crescendo *ex situ* mostrando a raiz principal carnuda (seta). f) Planta em floração. g, h) Plantas produzidas *in vitro* em diferentes fases do ciclo de vida em habitat natural (Cabo S. Vicente); g) Após plantação e h) Um ano mais tarde, com flores e frutos..... 91

Figura 16: Indução de embriogénese somática e desenvolvimento de plântulas em *Daucus carota* subsp. *halophilus*. a) Calos com origem em segmentos foliares após 1 mês da cultura. b) Embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento, formados em segmentos foliares. c) calos embriogénicos mostrando vários embriões somáticos germinados precocemente (setas). d) Embrião somático cotiledonar (seta) após 2 meses de cultura no meio de indução. e) Plântulas resultantes da germinação de embriões somáticos. f) Grande número de embriões somáticos obtidos a partir de um explante único. g) Plântulas antes da fase de aclimação. h) Plantas de *Daucus carota* subsp. *halophilus* nos viveiros do Jardim Botânico, obtidas por embriogénese somática. 94

Figura 17: Embriogénese somática de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. Aspectos da cultura de segmentos peciolares. a) Calos embriogénicos. b) Plantas em caixa de Petri provenientes de um só tubo de ensaio. c) Evolução dos embriões somáticos em plantas. d) Plantas prontas para o envasamento. 96

Figura 18: Teor em DNA das plantas de *Daucus carota* subsp. *halophilus* regeneradas *in vitro*..... 97

Figura 19: Floração *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. a) Plantas silvestres usadas para o isolamento de segmentos nodais (seta). b) Formação de calo e rebentos foliares. c) Formação das primeiras inflorescências (seta), que completam o desenvolvimento com o aparecimento de frutos (setas em d e e). e) Várias umbelas presentes. 98

Figura 20: Ciclo de floração <i>in vitro</i> de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> . a) Isolamento da parte basal de um rebento (seta). b) Inoculação do <i>stump</i> , meristemas axilares e parte terminal da inflorescência. c) Diferentes rebentos em floração.	99
Figura 21: Estados de desenvolvimento das inflorescências durante a floração <i>in vitro</i> de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> . Fase 1- umbela fechada (a). Fase 2 - umbela com pétalas verdes. (b) Fase 3 - umbela com pétalas brancas. Fase 4 - flores abertas (d) (comparar com Fig. 31c).....	100
Figura 22: Efeitos dos PGRs na indução de floração <i>in vitro</i> de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> . Os resultados representam a média com erro padrão de três réplicas.	101
Figura 23: Efeito dos PGRs na evolução morfológica das umbelas de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	102
Figura 24: Floração <i>in vitro</i> de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> : desenvolvimento comparativo após quatro semanas em diferentes meios de cultura.....	102
Figura 25: Efeito isolado dos PGRs na indução da floração <i>in vitro</i> de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> . A cultura inicial e final foi feita em meios diferentes. Os resultados representam a média com erro padrão de três réplicas.....	103
Figura 26: Efeito isolado dos PGRs na evolução morfológica das umbelas <i>in vitro</i> de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> . A cultura inicial e final foi feita em meios diferentes.	104
Figura 27: Floração em <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> . a) Umbela formada <i>in vitro</i> e outra em condições naturais. b) Flor formada <i>in vitro</i> , mais ampliada.	105
Figura 28: Zona meristemática apical de rebentos caulinares de <i>D. carota</i> induzidos <i>in vitro</i> . a) Zona do meristema apical do caule (círculo). Figuras b-d) Zonas apicais com primórdios foliares (setas) em diferentes fases de desenvolvimento.	106
Figura 29: Evocação floral e desenvolvimento das inflorescências.	107
Figura 30: Formação das flores <i>in vitro</i> . a) Aspeto de um meristema inflorescencial (mi) onde são visíveis vários meristemas florais (mf) em formação. b) Flores em diferenciação, sendo notórios os diferentes órgãos florais em formação: c – carpelos, a- anteras e p – pétalas. c) e d) Fases mais adiantadas da diferenciação floral onde os órgãos florais estão já diferenciados: c – carpelos, a - anteras e p – pétalas.	108
Figura 31: Flores formadas <i>in vitro</i> observadas à lupa. Aspeto geral das flores, em diferentes fases. a) Fase 2 - umbela com pétalas verdes. b) Fase 3 - umbela com pétalas brancas. c) Fase 4 - flores abertas (comparar com Fig. 21d).	108
Figura 32: Carpelos de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> formados <i>in vitro</i> (a) e <i>in vivo</i> (b). Notar os dois óvulos no carpelo formado <i>in vitro</i> (a) e um embrião das sementes de plantas silvestres em c).....	109
Figura 33: Pólen de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> . Pólen de flores produzidas <i>in vitro</i> mostrando três núcleos após tratamento com DAPI (a) e em carmim acético (b). c) Pólen de flores de flores silvestres em carmim acético.....	110

Figura 34: Secções longitudinais em explantes (*stumps*) cultivados para a indução de floração (tempo 0). a) Meristema axilar (max) no início do desenvolvimento e uma folha (fl) que tem na axila o meristema referido (X 200). b) Meristema axilar (max) bastante mais desenvolvido que na figura anterior, sendo visível parte da folha (fl) (X 200). c) Meristema adventício (mad) em formação (X 200). d) Meristema adventício (mad) mais desenvolvido que na figura anterior sendo notória a ligação do meristema em formação com os tecidos subjacentes por feixes vasculares (fv). Um segundo meristema adventício (mad2) em desenvolvimento é parcialmente visível no lado direito da figura (X 200). 111

Figura 35: Secções longitudinais da zona meristemática do explante após 4-7 dias de cultura em meios de indução floral. a) Desenvolvimento do meristema apical (SAM) sendo visível a formação de um meristema axilar (max). fl indica a folha do explante inicial. Notar a grande vacuolização das células meristemáticas (X 200). b) Detalhe de um SAM em desenvolvimento onde mais uma vez se destaca a vacuolização de grande parte das células. fl – folha. É também notória a diferença nos planos de divisão celular entre a camada L1 e as restantes (X 200). c) Zona meristemática em que o meristema apresenta maiores dimensões comparativamente ao observado na figura b e onde se observa uma zona de transição (indicada pelas setas) entre o meristema (SAM) e o resto do explante (X 200). d) Secção onde são visíveis dois meristemas formados por células com citoplasma denso (x50). e) Detalhe de um meristema com células com citoplasma denso e núcleos volumosos. Notar o padrão mais aleatório de divisões na camada L1 (x500). 113

Figura 36: Diferenciação floral após 11-15 dias de cultura em meios de indução de floração. a) Zona apical de um rebento onde é visível o meristema inflorescencial (mi) e dois meristemas florais laterais (mf1 e mf2) (X 200). b) Detalhe de um meristema inflorescencial (X 500). c) Secção onde são visíveis dois meristemas florais laterais (mf1 e mf2) (X 500). d) Secção de uma flor onde se pode observar o tecido esporogénico (es) numa antera em desenvolvimento (X 500). 114

Figura 37: Proliferação de rebentos caulinares em *Distichoselinum tenuifolium*. a) Planta em habitat natural, Moncarapacho, Algarve, na fase de recolha de sementes. b) Tipos de explantes assinalados: segmentos foliares e ápice caulinar (seta). c) Ápice caulinar *in vitro*. d) Formação de plântulas. e) Corte e preparação do *stump* (base do explante) para a segunda inoculação. 116

Figura 38: Aspectos da embriogénese somática em *Distichoselinum tenuifolium*, após 3 meses de cultura em 2,4-D. a) Embriões somáticos em fase inicial de desenvolvimento. b) Embriões somáticos em estados mais avançados de desenvolvimento. c) Dois embriões no estado cotiledonar. d) Um embrião em fase de torpedo (t) e dois no estado cotiledonar (c). 117

Figura 39: Germinação, desenvolvimento e aclimação de plântulas de *Distichoselinum tenuifolium*, induzidas por embriogénese somática. a) Formação de calo com embriões somáticos em meio com 2,4-D. b) Desenvolvimento dos embriões somáticos em meio base MS. c) Plântulas prontas a envasar. c) Preparação do substrato dos vasos e limpeza das plântulas. b) Aclimação das plântulas no fitotrão, numa primeira fase cobertas com proteção, retirada (e) após uma semana. f) Trinta plantas envasadas para transferência para os viveiros. 118

Figura 40: Aspectos da organogénese em *Distichoselinum tenuifolium* em segmentos foliares cultivados em BA. Formação direta de rebentos na zona de corte, que se desenvolvem bem em altura, como em b). c) Pormenor ampliado de a). d) Vários rebentos formados do mesmo segmento foliar. E) Rebentos caulinares imediatamente antes da cultura para indução de enraizamento. 119

- Figura 41:** Aclimação de plantas de *Distichoselinum tenuifolium* formadas por organogênese. a) Plantas enraizadas *in vitro* prontas a envasar. b) Envasamento com proteção inicial, retirada em c), após uma semana. d) Planta após 2 anos de ser instalada no JBUC, com uma inflorescência em formação..... 120
- Figura 42:** Aclimação de plantas de *Distichoselinum tenuifolium* produzidas por embriogênese somática. a) Plantação no JBUC. b) Doze meses após plantação. c) Plantas desenvolvidas após 14 meses. d) Plantas em floração e início de frutificação, decorridos 16 meses nos viveiros do JBUC. 121
- Figura 43:** Micropropagação de *Angelica pachycarpa*. Multiplicação de meristemas (a a d) e embriogênese somática (e a j). a) Localização das plantas silvestres em habitat natural. b) Três tipos de explantes assinalados nas caixas: segmentos foliares, porções radiculares (seta) e ápice caulinar (seta). c) Produção de rebentos foliares a partir do ápice caulinar cultivado em BA. d) Enraizamento de uma dessas plântulas. e) Calo embriogénico formado em porções radiculares. f) Diferentes estágios de desenvolvimento de embriões somáticos. g) Embriões somáticos provenientes de uma só amostra/tubo de ensaio. h) Conversão de embriões somáticos em plântulas. i) Plantas envasadas após aclimação no fitotróo. f) Aclimação *ex situ*, nos viveiros do JBUC. 124
- Figura 44:** Aclimação *ex-situ* de plântulas de *Angelica pachycarpa* micropropagadas por embriogênese somática. a) Instalação e desenvolvimento das plantas em viveiro no final do 1º ano. b) Desenvolvimento das plantas no 2ºano. c) Produção de sementes. 125
- Figura 45:** Aclimação *in situ* de *Angelica pachycarpa*. a) Primeira fase - instalação e sinalização de 10 plantas na primeira semana de março 2009. b) Localização dos campos de ensaio em frente da localização das plantas nativas, na direção do farol. c) Segunda fase - dois meses depois da instalação (maio 2009), cinco plantas sobreviveram em boas condições. d) Terceira fase - no ano seguinte as gaivotas nidificaram e apoderaram-se dos canteiros, eliminando todas as plantas, instaladas junto às plantas nativas, já frutificadas, em d) e e). 126
- Figura 46:** Micropropagação de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* por proliferação de meristemas. a) Planta em habitat natural, nas rochas ultrabásicas. b) Planta em habitat natural, em maior ampliação. c) Indicação do ápice caulinar na plântula. d) Explante no início do 1º ciclo de 30 dias de cultura. e) Proliferação de rebentos foliares decorridos 30 dias, provenientes de meio com maior concentração à esquerda e com menor à direita. f) Corte do *stump*. g) Segunda inoculação. h) Produção de rebentos caulinares após a segunda inoculação. 128
- Figura 47:** Enraizamento e envasamento de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* micropropagado por proliferação de meristemas. a) Rebento enraizado. b) Plântula mantida em água para aclimação. c) Plântulas envasadas..... 129
- Figura 48:** Micropropagação de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* por embriogênese somática. a) Formação calo e indução de embriões somáticos. b) Germinação de embriões. c) Embriões provenientes de uma só amostra. d) Plântulas resultantes do desenvolvimento de embriões somáticos em meio base. e) Plântulas retiradas dos tubos de ensaio para preparação para o envasamento..... 131
- Figura 49:** Aclimação *ex situ* de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*. a) Plantas produzidas por embriogênese somática em aclimação no viveiro do JBUC. b) Plantação de Apiaceae raras na escola médica do JBUC - ações de sensibilização para a conservação da biodiversidade. c) Planta micropropagada por multiplicação de meristemas, aclimatizada na escola médica, com produção de flores e frutos, visíveis em (d)..... 132

Figura 50: Cultura *in vitro* de *Eryngium duriaei*. Plantas de *Eryngium duriaei* em habitat natural onde se colheram as sementes: a) Mata da Margarça. b) Serra da Estrela. c) Plântulas *in vitro* decorridos 30 dias. d) Proliferação de rebentos caulinares a partir da cultura, em meio base com 0,2 mg/L BA, do ápice caulinar das plântulas cultivadas *in vitro* (em c).
..... 133

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas: distribuição geográfica e critérios prioritários de conservação	38
Tabela 2: Locais e períodos de colheita das quatro de subespécies nativas de <i>Daucus carota</i> utilizadas nos estudos morfológicos, na análise do teor em DNA e na caracterização de óleos essenciais.	42
Tabela 3: Espécimes investigados para o estudo dos frutos de populações nativas das quatro subespécies de <i>Daucus carota</i>	43
Tabela 4: Populações de <i>Eryngium duriaei</i> : localidades e datas de colheita para estudos morfológicos, análise do teor em DNA e caracterização de óleos essenciais.....	45
Tabela 5: Dados da colheita de sementes para cultura <i>in vitro</i>	47
Tabela 6: Dados da colheita do material vegetal para estudo dos óleos essenciais.	62
Tabela 7: Locais onde foram detetados e recolhidos os diferentes <i>taxa</i>	71
Tabela 8: Sementes dos endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas e respetivos números do <i>Index Seminum</i> COI. 78	
Tabela 9: Análise morfométrica dos frutos das subespécies de <i>Daucus carota</i> nativas em Portugal.	80
Tabela 10: Estimativa do conteúdo de DNA nuclear das subespécies de <i>Daucus carota</i>	83
Tabela 11: Estimativa do conteúdo de DNA nuclear das populações de <i>Eryngium duriaei</i>	85
Tabela 12: Efeito da concentração de BA sobre a proliferação de rebentos caulinares em segmentos foliares de <i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i> , após 4 semanas de cultura.	87
Tabela 13: Proliferação de rebentos foliares em <i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i> num segundo ciclo de cultura.	88
Tabela 14: Enraizamento em meio base MS de rebentos caulinares de <i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i> produzidos <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de BA.	90
Tabela 15: Efeito da concentração de 2,4-D na indução de calo embriogénico em segmentos de raízes de <i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i> após 2,5 meses de cultura.	92
Tabela 16: Efeito da concentração de 2,4-D na indução de calo embriogénico em segmentos foliares de <i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i> após 2,5 meses de cultura.	92
Tabela 17: Efeito da concentração de ácido giberélico (GA ₃) na indução da floração <i>in vitro</i> de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	104

Tabela 18: Efeito da concentração da sacarose na indução da floração <i>in vitro</i> de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	105
Tabela 19: Efeito da concentração de BA na proliferação de rebentos em ápices caulinares de <i>Distichoselinum tenuifolium</i> , após 4 semanas de cultura.	115
Tabela 20: Proliferação de rebentos em ápices caulinares de <i>Distichoselinum tenuifolium</i> , num segundo ciclo de cultura.	116
Tabela 21: Efeito de 2,4-D na indução de embriogénese somática em segmentos foliares de <i>Distichoselinum tenuifolium</i>	117
Tabela 22: Efeito de BA na indução de rebentos caulinares em segmentos foliares de <i>Distichoselinum tenuifolium</i>	119
Tabela 23: Formação <i>in vitro</i> de rebentos caulinares após duas inoculações dos ápices caulinares de <i>Angelica pachycarpa</i>	122
Tabela 24: Indução de embriogénese somática em <i>Angelica pachycarpa</i> , em calos mantidos <i>in vitro</i> mais de um ano.	123
Tabela 25: Germinação de embriões somáticos em <i>Angelica pachycarpa</i> , após um mês de cultura.	123
Tabela 26: Efeito da concentração de BA sobre a proliferação de rebentos em ápices caulinares de <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i> , após 4 semanas de cultura.	127
Tabela 27: Efeito da concentração de BA sobre a proliferação de rebentos em ápices caulinares de <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i> , num segundo ciclo de proliferação.	128
Tabela 28: Embriogénese somática em segmentos foliares de <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i> , sob a ação de diferentes concentrações de 2,4-D.	130
Tabela 29: Estimativa de plântulas produzidas por embriogénese somática em segmentos foliares de <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i> , cultivados <i>in vitro</i> em 0,1 mg/L 2,4-D.	130
Tabela 30: Resultados dos protocolos otimizados para a micropropagação dos quatro endemismos mais vulneráveis das Apiaceae endémicas ibéricas, representadas em Portugal.	134
Tabela 31: Composição química dos óleos essenciais de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> no Algarve: Cabo de S. Vicente e Arrifana (amostras 1 e 3 – umbelas em antese; amostras 2 e 4 – umbelas com frutos maduros).	136
Tabela 32: Atividade antifúngica (CMI e CML) dos óleos de <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> contra estirpes de leveduras, dermatófitos e <i>Aspergillus</i> (amostra 1 – umbelas em antese; amostra 2 – umbelas com frutos maduros).	138
Tabela 33: Composição dos óleos essenciais de <i>Distichoselinum tenuifolium</i> (amostras 1 e 3 - umbelas em antese; amostras 2 e 4 - umbelas com frutos maduros).	140

Tabela 34: Atividade antifúngica (CMI e CML) do óleo de <i>Distichoselinum tenuifolium</i> e do mirceno contra estirpes de leveduras, dermatófitos e <i>Aspergillus</i>	141
Tabela 35: Composição dos óleos essenciais de <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	142
Tabela 36: Atividade antifúngica (CMI e CML) do óleo de <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i> e de α -pineno e β -pineno contra estirpes de leveduras, dermatófitos e <i>Aspergillus</i>	144
Tabela 37: Composição dos óleos essenciais de <i>Thapsia minor</i> em Portugal.	145
Tabela 38: Atividade antifúngica (CMI e CML) do óleo de <i>Thapsia minor</i> e do acetato de geranilo contra leveduras, dermatófitos e estirpes de <i>Aspergillus</i>	146
Tabela 39: Composição dos óleos essenciais das quatro subspécies de <i>Daucus carota</i> L. em Portugal Continental.	149
Tabela 40: Composição do óleo essencial de populações de <i>Eryngium duriaei</i>	152
Tabela 41: Endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas: atualização de critérios de conservação prioritária.	165

LISTA DE ABREVIATURAS, DE SIGLAS E DE SÍMBOLOS

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

ALFA - Associação Lusitana de Fitossociologia.

APA - Agência Portuguesa do Ambiente.

BA - Benziladenina.

BGCI - *Botanic Gardens Conservation International* – Conservação Internacional de Jardins Botânicos.

CGL - Cromatografia gás-líquido.

CGL-EM - Cromatografia gás-líquido- Espectrometria de massa.

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

CMI - Concentração mínima inibitória.

CML - Concentração mínima letal.

CWR - *Crop Wild Relatives*.

DIC - Detetor de ionização de chama = FID – *flame ionization detector*.

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DNA - *Desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico - ADN).

DMSO - Dimetil sulfóxido.

EM - Espectrometria de massa.

g - grama(s).

GA - Giberelina.

GA₃ - Ácido giberélico.

GSPC - *Global Strategy for Plant Conservation*.

h - hora.

ha - hectare.

Herbários:

COA - Jardín Botánico de Córdoba.

COI - Instituto Botânico da Universidade de Coimbra.

LISE - Estação Agronómica Nacional - Oeiras.

LISI - Instituto Superior de Agronomia de Lisboa.

MA - Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC.

MGC - Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.

PO - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

IUCN - International Union for Conservation of Nature.

IA - Instituto do Ambiente.

IAA - Ácido 3-indol acético.

IBA - Ácido 3-indol butírico.

ICN - Instituto da Conservação da Natureza = **ICNB** – Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade. Atualmente Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas.

IP - Iodeto de propídio.

IR^a - Índices de retenção na coluna SPB-1.

IR^b - Índices de retenção na coluna SupelcoWax-10.

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*.

JBUC - Jardim Botânico da Universidade de Coimbra.

min. - minuto.

mg - miligrama(s).

MOPS - Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.

MS - Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962).

NUSs - *Neglected and underutilized pecies*- espécies negligenciadas e subutilizadas.

°C - Grau Celsius.

OEs - Óleos essenciais.

PGRs - *Plant growth regulators* = reguladores de crescimento vegetal.

Províncias ibéricas (Castroviejo *et al.*, 2003)

Portugal:

AAI - Alto Alentejo;

Ag - Algarve;

BA - Beira Alta;

BAI - Baixo Alentejo;

BB - Beira Baixa;

BL - Beira Litoral;

DL - Douro Litoral;

E - Estremadura;

Mi - Minho;

R - Ribatejo;

TM - Trás-os-Montes e Alto Douro.

PSRN - Plano Setorial da Rede Natura.

RBGK - *Royal Botanic Gardens of Kew*.

SAM - *Shoot apical meristem* - meristema apical do caule.

SCBD - Secretariat of the Convention on Biological Diversity.

UK - United Kingdom.

v - vestígios (referente ao óleo extraído).

vs - *versus* - relativamente a.

Nota: nesta lista foram incluídas as abreviaturas utilizadas com mais frequência. Em algumas situações optou-se por manter a designação em inglês ou por dificuldades de tradução ou por ser a designação mais comum na comunidade científica.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO



1.1. ENQUADRAMENTO DO TEMA DA TESE

Dizer-se que a vida na Terra depende das plantas pode ser considerado um lugar-comum, mas é de facto uma verdade incontornável. Na realidade, as plantas são a base dos ecossistemas terrestres onde são os produtores primários e geram os hidratos de carbono para as cadeias alimentares. Para além disso, libertam oxigénio, essencial para a sobrevivência, servem de abrigo a outros organismos, condicionam o clima e são responsáveis, em grande parte, pela estabilidade e composição dos solos (Bilz *et al.*, 2011).

As sociedades humanas e os seus antepassados mais longínquos sempre foram dependentes das plantas, não apenas no que à alimentação diz respeito, mas também para a construção de abrigos, obtenção de combustível, vestuário, fibras e para fins medicinais, ornamentais e culturais.

Atualmente é facto incontestável que a biodiversidade dos habitats naturais está ameaçada, o que é parcialmente devido a ações antropogénicas, daí resultando uma redução significativa no número de espécies e populações selvagens em muitos ecossistemas (Primack, 2001; Thomas *et al.*, 2004; Malcom *et al.*, 2006; Hawkins *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2010; Sharrock e Jones, 2011; Bilz *et al.*, 2011). A título de exemplo, pode referir-se que a redução calculada de 30% do coberto florestal na Europa foi consequência da expansão da agricultura e de outras atividades humanas (Sharrock e Jones, 2009).

Outro aspeto pertinente está relacionado com as alterações climáticas atuais, já consideradas por Davis e Shaw (2001) e Truiller *et al.* (2005) como um dos fatores que mais impacto poderá ter na extinção de muitas espécies a nível local, bem como na migração de espécies para áreas onde atualmente não são nativas (Bergmann *et al.*, 2010). Avaliações recentes de Pereira *et al.* (2010) sobre o impacto das mudanças globais na biodiversidade e nos ecossistemas, e o consequente reflexo no desenvolvimento socioeconómico global indicam, consistentemente, que a biodiversidade continuará a diminuir ao longo do presente século.

No entanto, a gama de alterações projetadas pode ser muito mais ampla do que a maioria dos estudos sugere, em parte, por causa de grandes incertezas nas próprias projeções (Pereira *et al.*, 2010).

Em Portugal Continental, os relatórios da Agência Portuguesa do Ambiente (APA, 2007; 2008) referem que se têm registado intensas alterações climáticas nos últimos anos; as ondas de calor e as inundações verificadas desde 2005 revelam que o país tem sido afetado por fenómenos meteorológicos extremos, podendo a redução de espécies vegetais e o risco de incêndio vir a ser consequência destas alterações. Segundo os estudos de Monteiro-Henriques e Espírito-Santo (2010), o cenário de alteração climática até 2080 prevê uma modificação das condições bioclimáticas, com aumento de temperaturas e verões mais secos, do sul para o norte do país, sendo importante implementar estratégias de ação, por exemplo, a interligação entre as boas práticas agrícolas e a biodiversidade (IA, 2005). Na previsão para a mesma data, 2080, Thuiller *et al.* (2008) referem que as alterações climáticas possam conduzir à perda de 27-42% de espécies vegetais, com potenciais extremos de 2,5-86% para a redução da diversidade florística.

Face a esta realidade, a conservação e a valorização da flora, e em consequência, dos ecossistemas, são dos maiores desafios que as sociedades modernas enfrentam. É obrigação dos governos, e da sociedade em geral, intervir através da promoção e aplicação do conhecimento científico interdisciplinar e da educação para a sustentabilidade (Tavares, 2010; 2011). Só assim se podem incentivar as boas práticas de cidadania, fundamentais para a preservação dos recursos, dos ecossistemas e do património genético natural. Perante as ameaças a que a natureza está sujeita, o futuro das próximas gerações depende muito daquilo que soubermos fazer na preservação da diversidade biológica. Cada espécie que se perde é irrecuperável, pois não pode ser substituída por outra e o seu potencial biológico, e muitas vezes económico, perde-se para sempre.

Neste contexto, deverá ser prioritária a conservação de espécies raras e/ou ameaçadas, como as endémicas, que estão restritas a habitats muito específicos, e de plantas silvestres relacionadas com as espécies cultivadas, vulgarmente designadas por CWR (*Crop Wild Relatives*). Estas plantas representam uma reserva genética importante, não apenas pelo seu valor intrínseco, mas também por poderem vir a ser utilizadas como reservatórios de genes de interesse para a agricultura e para outras aplicações industriais e de investigação científica (Frese e Nothangel, 2008; Hawkins *et al.*, 2008; Canhoto, 2010; Bilz *et al.*, 2011).

Nos últimos anos tem aumentado a pesquisa para a preservação do valioso património genético natural ameaçado (Almeida *et al.*, 2005) e a preocupação das

sociedades por estes problemas tem-se acentuado, criando condições favoráveis para a implementação de programas de investigação que minimizem o impacto do desenvolvimento económico e social nos ecossistemas (BGCI, 2000; *Secretariat of the Convention on Biological Diversity* 2002; 2010; Frese *et al.*, 2008; Maxted e Dulloo, 2008; Sharrock e Jones, 2009; 2011). De facto, nas últimas duas décadas, o constrangimento público em relação à perda de espécies e de muitos habitats conduziu ao aumento da pressão social para o desenvolvimento de procedimentos mais efetivos para a redução dos prejuízos ambientais e da extinção das espécies (Vitousek *et al.*, 1997; Dobson, 1998; Meyers *et al.*, 2000; Kjær *et al.*, 2004; Hawkins *et al.*, 2008). A sublinhar estas preocupações estão também as medidas adotadas pela Assembleia Geral das Nações Unidas ao declarar 2005-2014 como a "Década da Educação para o Desenvolvimento Sustentável" e 2011-2020, a "Década da Biodiversidade (*Living in Harmony with Nature*)", impulsionando a implementação e o desenvolvimento de programas de conservação.

Nos últimos 10-15 anos, a instituição *Botanic Gardens Conservation International* (BGCI, 2000) propôs um conjunto de Estratégias Globais para a Conservação de Plantas (*Secretariat of the Convention on Biological Diversity* 2002; 2010) e anunciou 16 metas de ação prioritária para os jardins botânicos de todo o mundo, promulgadas na Agenda Internacional para a Conservação de Plantas (Wyse Jackson e Sutherland, 2000; Wyse Jackson, 2004; *Global Strategy for Plant Conservation*, 2003). Para o efeito, o BGCI implementou uma base de dados das plantas cultivadas nos jardins botânicos como um instrumento facilitador e para monitorizar o progresso de conservação a nível global (Sharrock e Jones, 2009).

Foi também com o intuito de melhorar a conservação e a utilização sustentável dos recursos naturais que a IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) elaborou a Lista Vermelha de Plantas Ameaçadas, com a primeira versão a ser editada em 1963, sendo sucessivamente atualizada (IUCN, 2001; 2011). Nesta publicação anual é avaliado, numa escala global, o estado de conservação dos *taxa* e criado um critério de risco de extinção (Fig. 1).

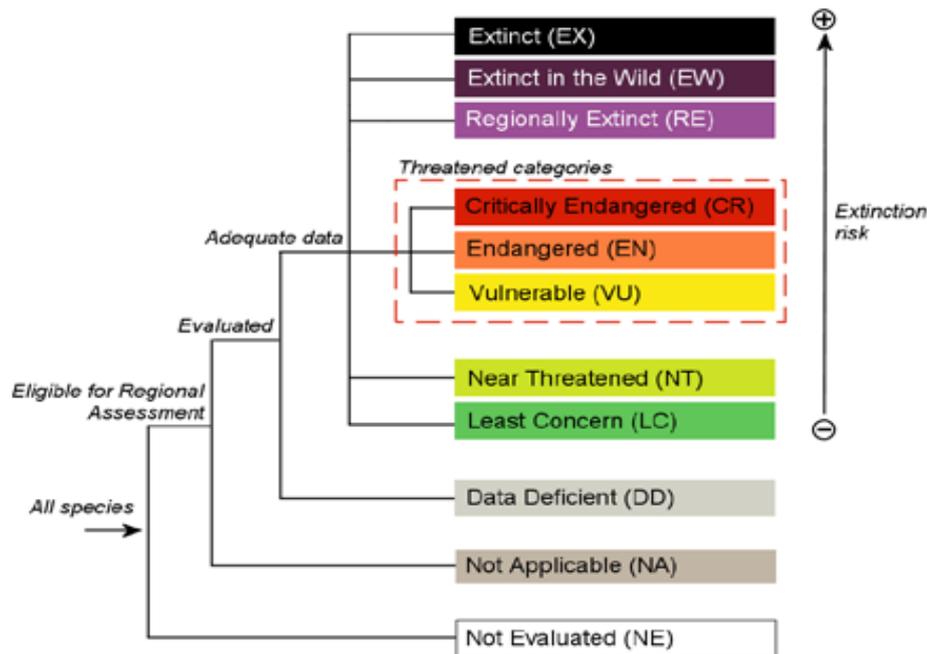


Figura 1: Categorias IUCN, para avaliação de espécies segundo o grau de ameaça: Perigo crítico (CR), Em perigo (EN), Vulnerável (VU), Perto da ameaça (NT), Pouco preocupante (LC), Informação Insuficiente (DD) e Não Avaliado (NE) (retirado de: Bilz *et al.*, 2011).

Cerca de metade das espécies vegetais do planeta são endemismos, estando presentes em apenas 6% da sua área terrestre, em pequenas populações e, muitas vezes, sobrevivendo em zonas restritas, sendo muito sensíveis a alterações nos seus habitats e por isso muito vulneráveis à extinção. Publicações recentes sobre a diversidade vegetal na Europa indicam a existência de 20.000-25.000 espécies de plantas vasculares, tendo sido identificadas 1.826 espécies na *Red List*, num total de 24 centros de diversidade vegetal, dos quais nove ocorrem na Península Ibérica (Bilz *et al.*, 2011; IUCN, 2011; Sharrock e Jones, 2011).

Em consonância com a resposta da União Europeia aos princípios da Convenção de Berna sobre a Vida Selvagem e os Habitats Naturais na Europa foi adotada em Portugal, em 1992, a Diretiva Habitats. Esta Diretiva refere-se à preservação dos habitats naturais da fauna e da flora selvagens e inclui as espécies endémicas com estatuto vulnerável ou em perigo, com distribuição localizada e com efetivo populacional baixo, para as quais o Plano Setorial da Rede Natura 2000 (PSRN, 2000) identifica a necessidade de conservação *ex situ* e/ou de incremento da população (Fig. 2).

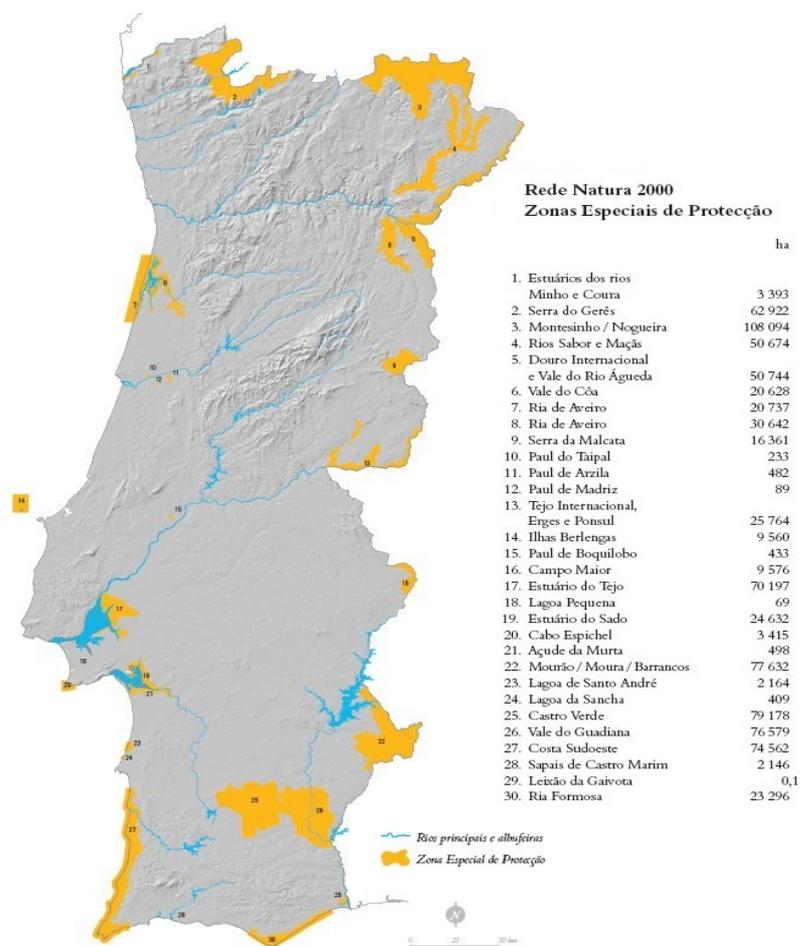


Figura 2: Rede Natura 2000 (retirado de <http://www.icnf.pt/ICNPortal>).

Em 2010 foi criada em Portugal a primeira lista de todas as plantas vasculares - autóctones, endémicas e introduzidas - de todo o território Português (ALFA, 2007-2010). O inventário indica um total de 3.995 plantas, 3.314 espécies no Continente, 1.006 no arquipélago dos Açores e 1.233 na Madeira, região que alberga o maior número de endemismos: 157 na Madeira, 78 nos Açores e 150 no Continente.

Portugal, enquanto parte da Península Ibérica, está integrado na região da bacia mediterrânea, um *hotspot* de biodiversidade a nível mundial. O conceito *hotspot* foi criado em 1988 pelo ecólogo inglês Norman Myers para resolver um dos maiores dilemas dos conservacionistas relativamente às áreas mais importantes para preservar a biodiversidade na Terra. Refere-se às regiões que contêm pelo menos 1.200 plantas vasculares endémicas e que perderam pelo menos 70% do seu habitat original (Hawkins *et al.*, 2008; CI, 2012). Em 2005 procedeu-se a uma atualização dos *hotspots* tendo sido identificadas 34 regiões,

Introdução

que abrigam mais de 50% das espécies vegetais endémicas e 42% dos vertebrados terrestres endémicos ao nível mundial. No entanto, somando a área de todos os *hotspots* temos apenas 2,3% de superfície terrestre (CI, 2012).

A Região do Mediterrâneo, um dos 34 *hotspots* da biodiversidade mundial (Hawkins *et al.*, 2008; CI, 2012), corresponde à área fitogeográfica mais rica da Europa (IUCN 2011), sendo a Grécia o país com a maior concentração de espécies vegetais nativas, por unidade de área. Só a Península Ibérica e as Ilhas Baleares contêm cerca de 7.500 espécies e subespécies, e a Península abriga o maior valor de endemismos da Europa com 63 espécies encontradas apenas em Portugal Continental e 51 somente na Espanha Continental (IUCN, 2011). De realçar que estes dados europeus relativamente a Portugal, embora recentes (IUCN, 2011), estão desajustados dos valores apurados pelas instituições portuguesas (ALFA, 2010), o que releva a necessidade urgente de articular e atualizar trabalho em rede, incluindo todas as instituições ligadas à conservação.

Portugal Continental está próximo da região do mediterrâneo, de elevado interesse devido ao grande número de espécies de plantas endémicas e ao grau de ameaça a que se encontram sujeitas por destruição do seu habitat (Myers *et al.*, 2000). As áreas protegidas foram consideradas relevantes para a conservação da biodiversidade, no entanto, não existe nenhum programa de monitorização que permita determinar a eficiência do sistema nacional de áreas protegidas e de outras medidas destinadas à conservação dos recursos biológicos (Proença *et al.*, 2009). Todas as ações que possam contribuir para a congregação de esforços para a conservação da biodiversidade serão de considerar.

1.2. ESTRATÉGIAS E MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO

Os recursos fitogenéticos constituem um conjunto de informação genética que deve ser preservado não só pelo significado da informação genómica, mas também porque podem contribuir para solucionar problemas ambientais e para a melhoria das estratégias globais, nomeadamente na agricultura, energia, indústria e saúde pública (Maxted *et al.*, 2006). Deste modo, é importante conservar a diversidade genética intra e interespecífica, para salvaguardar toda a riqueza do genoma de uma espécie.

Na verdade, o valor económico do objeto a preservar é um fator importante para a sua conservação, que será tanto mais efetiva, quanto mais forem persuadidas as entidades

políticas e de decisão governamental - é mais fácil convencer a conservar o que tem aplicação, o que é utilizável (Kareiva e Marvier, 2007), pelo que é fundamental a implementação de mais esforços e estratégias nesse sentido. Em conformidade, está na ordem do dia a designada “ciência dos serviços dos ecossistemas”, que defende um retorno (de serviços) pelos investimentos realizados na defesa do património natural. A comunidade científica precisa de disponibilizar o conhecimento e as ferramentas necessárias para prever e quantificar esse retorno, que tem de ser integrado na tomada de decisões por indivíduos, empresas e governos de uma forma explícita e sistemática. Sem esse progresso político, social e económico, o valor da natureza será considerado pouco mais do que uma ideia interessante (Daily *et al.*, 2009).

Entretanto, a maioria das espécies, em particular as que não são utilizadas para produção de alimentos ou na indústria, estão mal caracterizadas nos aspetos genéticos e moleculares, o que é uma limitação para o desenvolvimento de estratégias úteis de conservação de plantas e para a determinação das relações genéticas entre indivíduos e populações.

No âmbito da conservação de plantas silvestres, a utilização direta de germoplasma inclui ações como a reintrodução ou reforço de populações em habitats existentes, onde as mesmas tenham sofrido decréscimos acentuados, por fatores antropogénicos relacionados com florestações, intensificação agrícola, abandono rural, urbanização e turismo (Domingos *et al.*, 2009).

Hoje, as espécies ameaçadas, as endémicas e as de valor económico confirmado são consideradas prioritárias para a conservação da biodiversidade, proporcionando simultaneamente a sua utilização sustentável para o bem-estar da Humanidade. Um exemplo de sucesso de conservação e de utilização sustentada em Portugal é a cultura do sobreiro (*Quercus suber* L.) (CIB, 2010), espécie confinada à zona mediterrânica ocidental, Itália, Sul de França, Península Ibérica, Marrocos e Argélia.

Os métodos para assegurar a conservação de plantas são diversos e cada um deles tem as suas próprias vantagens e limitações. A Biotecnologia revela-se muito vantajosa na pesquisa fundamental, na conservação e na produção comercial e industrial de excelência. A Biotecnologia Vegetal refere-se à manipulação das plantas para obtenção de novas características ou à sua utilização para a obtenção de produtos ou a realização de determinadas funções, como sejam: a propagação clonal em massa de valiosos génotipos, a

preservação de germoplasma, ou a biotransformação e produção *in vitro* de metabolitos secundários de importância medicinal (Bajaj, 1994; Ekiert, 2000; Alcaraz-Melendez *et al.*, 2004; Echenique *et al.*, 2004; Agharwal *et al.*, 2005; Ahuja *et al.*, 2005; Pellegrineschi, 2005; Maxted *et al.*, 2006; Canhoto, 2010). São metodologias vantajosas em programas de utilização sustentável, proporcionando não só a conservação *in vitro* e *ex situ*, mas também *in situ*, pela reintrodução das espécies em habitats naturais (Bacchetta *et al.*, 2008).

Para a conservação *in situ* e reserva de genes de espécies CWRs é necessário criar equipas e redes de trabalho em áreas protegidas europeias, que reflitam uma grande diversidade ecogeográfica de forma a englobar o maior número possível de plantas. Perante a conjuntura atual de interdependência global das nações é urgente uma abordagem coordenada para a conservação europeia de espécies CWR, nomeadamente, pelo crescente problema da insegurança alimentar, que poderá agravar-se no futuro, em resultado das alterações climáticas e de outras ameaças (Draper *et al.*, 2004; Canhoto, 2010; Bilz *et al.*, 2011).

1.2.1. Conservação *ex situ*

Os métodos biotecnológicos são cada vez mais importantes para a conservação de plantas cultivadas e espécies raras e ameaçadas de extinção, sendo a conservação *ex situ* uma das estratégias que pode ser utilizada. Atualmente, 42% das espécies europeias ameaçadas estão incluídas em programas de conservação *ex situ* (Pence, 1999; Hawkes *et al.*, 2000; Gonçalves e Romano, 2005; Bacchetta *et al.*, 2008; Pritchard e Harrop, 2010; Sharrock e Jones, 2011). Este tipo de intervenção pode consistir no estabelecimento de coleções vivas ou na conservação de sementes, pólen ou tecidos vegetativos (Hawkes *et al.*, 2000; Jaramillo e Baena, 2002).

O primeiro objetivo dos métodos de conservação *ex situ* é assegurar a sobrevivência dos recursos genéticos vegetais que de outro modo desapareceriam (Bacchetta *et al.*, 2008). O planeamento da colheita é uma das fases mais importantes da conservação *ex situ*, em que o propósito é conseguir a maior quantidade de diversidade genética num número limitado de amostras (Fay, 2003; Way, 2003). O plano de colheita deve ser delineado para cada espécie e definirá o calendário de colheita, tendo por base a sustentabilidade, não pondo as populações nativas em risco. A priorização das populações e a definição do

tamanho e tipo de amostragem são fundamentais no caso de espécies raras ou ameaçadas (Way, 2003), pelo que estes parâmetros são definidos no plano de colheita, podendo ainda ser reavaliados e ajustados localmente, de modo a minimizar o impacto nas populações. Todas as colheitas devem ser efetuadas sob autorização das autoridades competentes e exemplares *voucher* devem ser depositados em coleções de Herbário.

Três instrumentos biotecnológicos têm sido utilizados, com sucesso, em vários programas de conservação de plantas: (1) aplicação de técnicas da propagação *in vitro* (Almeida *et al.*, 2005; Gonçalves e Romano, 2005; Kristensen *et al.*, 2005; Sarasan *et al.*, 2006; Karuppusamy e Pullaiah, 2007; Liao *et al.*, 2008; Canhoto, 2010); (2) uso de marcadores moleculares para avaliar o grau de variabilidade entre as populações (Gaudeul *et al.*, 2002; Sergio e Gianni, 2005; Canhoto, 2010) e (3) técnicas de conservação a longo prazo, tais como encapsulamento e criopreservação (Engelmann, 2004; Bacchetta *et al.*, 2008; Canhoto, 2010).

1.2.1.1. Técnicas de propagação *in vitro*

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* pode definir-se como a tecnologia para a cultura de células, tecidos ou órgãos isolados de uma planta, utilizando meios artificiais em condições assépticas. As secções ou porções que se separam da planta designam-se explantes e a planta dadora, planta-mãe.

A micropropagação é o termo geral que descreve o conjunto de técnicas utilizadas para a clonagem de plantas *in vitro* (Lynch, 1999). A clonagem pode conseguir-se por uma de três vias. O procedimento mais simples consiste na proliferação de meristemas que já existem no explante original (ápice caulinar ou segmentos nodais) (Tavares *et al.*, 1996). Uma segunda metodologia consiste na indução, *de novo*, de meristemas caulinares a partir dos quais se desenvolve um rebento caulinar que necessita depois de ser enraizado para se obter uma planta. Este processo é vulgarmente conhecido como organogénese (Tang, 2000). Finalmente, a clonagem pode também ser conseguida pela formação de embriões somáticos morfológicamente similares aos embriões zigóticos, uma técnica conhecida como embriogénese somática (Reinert, 1958; Stewart *et al.*, 1958; Engelman, 2004; George e Debergh, 2008).

As técnicas de cultura *in vitro* têm dado uma contribuição notável para a conservação *ex situ* de plantas e são particularmente interessantes por permitirem a propagação controlada, em maior escala e num espaço reduzido, de indivíduos das espécies que estão ameaçadas. A otimização tecnológica tem possibilitado a seleção de clones e a maior disponibilidade e “domesticação” de plantas. Estas são situações relevantes para fins agroindustriais, contribuindo para a redução das colheitas, preservando os habitats naturais, ao mesmo tempo que permite a obtenção de plantas, e dos seus metabolitos, em qualquer altura do ano (George e Debergh, 2008; Liao *et al.*, 2008; Bacchetta *et al.*, 2009).

Para além disso, podem assegurar a proliferação de um genótipo particular por métodos de clonagem, mas também permitem manter a diversidade genética se forem utilizados como explantes embriões zigóticos ou órgãos de plântulas obtidas por germinação de sementes. Também no caso da conservação de espécies que produzem sementes recalcitrantes a cultura *in vitro* tem particular importância, pois não se colocam problemas de perdas de viabilidade, como acontece no caso da conservação de sementes (Bacchetta *et al.*, 2008; Canhoto, 2010).

No entanto, deve ser enfatizado que os métodos de clonagem *in vitro* não são isentos de problemas, tais como a possibilidade de alterações genéticas (variação somaclonal) no material propagado (Wilkinson *et al.*, 2003) e a abordagem estática subjacente a estes métodos (Kjær *et al.*, 2004). Pode ocorrer variabilidade nas plantas propagadas *in vitro*, que pode ser avaliada recorrendo a marcadores moleculares e outros diagnósticos moleculares fundamentais, ferramentas importantes para caracterizar a diversidade vegetal a nível genómico, para monitorizar o genoma, ou para obter informação sobre o DNA dos explantes utilizados *in vitro* e o das plantas produzidas por micropropagação (Loureiro *et al.*, 2005; 2007b).

Neste contexto, produtos do metabolismo secundário, como os óleos essenciais (OEs), podem também ser utilizados como marcadores biológicos (Nogueira *et al.*, 2008), e constituir igualmente ferramentas auxiliares em estudos quimiotaxonómicos, instrumentos importantes para uma correta caracterização taxonómica.

Todas estas ferramentas são instrumentos laboratoriais importantes para a identificação dos *taxa*, permitindo a certificação da espécie, passo essencial para qualquer trabalho científico, que assume maior relevância em estratégias de conservação da

biodiversidade, com espécies endêmicas, de características edafoclimáticas muito particulares e que são restritas a habitats muito limitados (Qiu *et al.*, 2004).

A variabilidade induzida nas plantas produzidas pela cultura *in vitro* não é, necessariamente, um fator negativo; ao constituir fator de maior diversidade genética nas plantas micropropagadas aumentará as possibilidades de uma melhor adaptação a um leque mais amplo e variável de condições naturais.

É importante reconhecer que a integração efetiva da biotecnologia nos programas de conservação requer uma cooperação multi e interdisciplinar clara (Bennson, 1999).

Um exemplo de sucesso na aplicação das técnicas de propagação *in vitro* à conservação de plantas é o trabalho desenvolvido nos jardins botânicos (Clemente *et al.*, 2012; Crespi *et al.*, 2012) como acontece em *Kew*, Reino Unido, nos *Royal Botanic Gardens*, em que a unidade de micropropagação mantém mais de 3.000 *taxa* procedentes de todo o mundo (RBGK, 2012), a maioria das quais são espécies ameaçadas. Também no *Kings Park & Botanic Garden* (Perth, Austrália), especializado na conservação da flora ameaçada, foram desenvolvidas técnicas para a micropropagação de mais de 200 espécies de 33 famílias de plantas australianas (Sarasan *et al.*, 2006). No entanto, este esforço global é ainda muito limitado pois os dados mostram que cerca de 40% das espécies ameaçadas preservadas em jardins botânicos se encontram apenas num só jardim, o de *Kew* (Sharrock e Jones, 2011).

O grande número de publicações sobre os estudos de micropropagação na família das Apiaceae (Umbelliferae) reflete a importância desta família, caracterizada por um grande número de *taxa*, em que é notória a percentagem de espécies raras e produtoras de compostos bioativos (Ekiert, 2000).

A micropropagação de espécies desta família tem sido utilizada desde longa data. Na realidade, *Daucus carota* foi a espécie pioneira utilizada no processo de embriogénese somática (Reinert, 1958; Stewart *et al.*, 1958) e até hoje se mantém o interesse na micropapagação deste *taxon* (Imani *et al.*, 2001; Eeva *et al.*, 2003; Pant *et al.*, 2005; Kikuchi *et al.*, 2006; Manandhar, 2007; Karuppusamy e Pullaiah, 2007; Pant e Manandhar, 2007; Kielkowska e Adamus, 2010), bem como de outras Apiaceae, pertencentes a géneros tão diversificados como *Thapsia* (Jager *et al.*, 1993; Makunga, 2003; 2005; Nokwanda *et al.*, 2005), *Ferula* (Iranshhi *et al.*, 2006), *Eryngium* (Ignacimuthu *et al.*, 1999; Martin, 2004; Khoshbakht *et al.*, 2007), *Angelica* (Tsay e Huang, 1998) e *Bunium* (Grewal, 1996).

A cultura *in vitro* tem evoluído bastante nos últimos anos, permitindo o desenvolvimento de técnicas de micropropagação em que o ciclo de floração das espécies é controlado *in vitro*, sendo geralmente mais curto, relativamente ao tempo necessário para se iniciar a floração em condições naturais (Franklin *et al.*, 2011). Esta situação pode ser muito vantajosa, nomeadamente no estudo dos fatores ambientais, químicos e fisiológicos que intervêm no processo da floração, de grande interesse botânico, mas ainda pouco compreendido noutras espécies para além das espécies modelo (Franklin *et al.*, 2011; Yadav e Singh, 2011).

O estabelecimento de ciclos de floração *in vitro* tem ocorrido a partir de processos de embriogénese somática ou de organogénese, e é induzido pela ação de diferentes reguladores de crescimento (PGRs), nomeadamente as citocininas e as auxinas (Vu *et al.*, 2006; Zhang, 2007; Yadav e Singh, 2011). É também conhecido o efeito promotor da sacarose e das giberelinas na taxa de indução de floração *in vitro* de diferentes espécies (Vu *et al.*, 2006). Por esta via, é possível a aplicação de protocolos eficientes para o estudo da fisiologia da floração bem como para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes a este tipo de morfogénese (Lin *et al.*, 2005; Samuoliene *et al.*, 2008; van Staden *et al.*, 2008; Franklin *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011).

1.2.1.2. Conservação a longo prazo

Os bancos de sementes constituem uma das formas mais eficazes de conservação *ex situ*, dado que permitem preservar grande quantidade de material vegetal a longo prazo e num espaço reduzido (Smith *et al.*, 2003; Way, 2003; Wilkinson *et al.*, 2003). A desidratação das sementes (redução do conteúdo hídrico para níveis mínimos de atividade metabólica sem perda de viabilidade) e a temperatura de armazenamento são os fatores determinantes da longevidade das sementes nos respetivos bancos (Ellis e Roberts, 1980; Pritchard e Dickie, 2003). A adoção de metodologias adequadas em todas as fases do processamento, da colheita ao armazenamento, é fundamental para garantir a variabilidade genética, a viabilidade e a longevidade das sementes (ENSCONET, 2009 a; 2009 b).

Nas espécies ameaçadas, a aplicação de critérios ecogeográficos (Maxted *et al.*, 1995) no planeamento da colheita de sementes é particularmente importante na maximização da diversidade genética do material recolhido, de modo a garantir o sucesso

de futuras ações de repovoamento ou reforço populacional. Os bancos de sementes constituem uma reserva do património genético que pode ser utilizada para fins educativos e científicos, em ações de conservação para o reforço de populações, tais como a reintrodução em áreas onde as espécies ocorreram no passado (Draper *et al.*, 2004).

A tolerância à desidratação e a longevidade das sementes variam com o grupo taxonómico e o ecossistema e, de um modo geral, a maioria das sementes das espécies mediterrânicas permanece viável durante décadas e, possivelmente, séculos, nas condições de armazenamento dos bancos de sementes (Pérez-García *et al.*, 2008).

Contudo, a conservação de sementes colhidas nas populações naturais não é aplicável a todas as espécies, pois as sementes de algumas espécies são intolerantes à dessecação e perdem rapidamente viabilidade, sendo por isso designadas recalcitrantes (Delgado, 2006).

1.2.2. Conservação *in situ*

As ações de conservação *ex situ* deverão ter subjacente a necessidade de preservação do património genético de uma espécie e, como fim último, a implementação de uma ação de conservação *in situ* (Heywood e Dullo, 2005), que deve ser prioritária nos programas de gestão dos recursos genéticos vegetais (Dobson, 1998; Jarvis *et al.*, 2000; Graudal *et al.*, 2001; Heywood e Dullo, 2005). No entanto, quando a aplicação destes programas se revela mais difícil, a conservação *ex situ* (fora do habitat natural) é um recurso complementar e, por vezes, indispensável (Maxted *et al.*, 1997; Ekiert, 2000; Echenique *et al.*, 2004; Canhoto *et al.*, 2010).

A erosão genética, frequentemente resultante da fragmentação do habitat, é um dos principais problemas das populações de espécies ameaçadas (Aguilar *et al.*, 2008). Esta ocorre devido ao aumento da deriva genética e *inbreeding* e à diminuição do fluxo genético e pode resultar na perda de alelos específicos ou de combinações de alelos nas populações (Young *et al.*, 1996; Sork *et al.*, 1999; Lowe *et al.*, 2005).

A introdução de novos genótipos numa população alvo de ações de conservação e o cruzamento destes com os genótipos da população original poderá igualmente conduzir à erosão genética e ao fenómeno designado por *outbreeding depression* (Templeton, 1986).

Introdução

Assim, a caracterização genética das populações-alvo e dos genótipos dadores é essencial à prossecução de uma ação de reforço populacional.

Um dos aspetos descurados na maioria destas ações, embora justificado por limitações de tempo e financeiras, é a monitorização do seu sucesso. Contudo, esta é imprescindível não só para assegurar que o objetivo de conservação foi atingido bem como para tirar ilações para o futuro (Lowe *et al.*, 2005).

As medidas de conservação *in situ* devem ser acompanhadas por uma adequada preservação *ex situ* em Jardins Botânicos ou instituições similares, para assegurar que todas as espécies prioritárias e ameaçadas estejam a ser ativamente conservadas. Na verdade, os Jardins Botânicos e unidades de investigação associadas são instituições particularmente qualificadas para a preservação de germoplasma, quer seja em bancos de sementes ou em bancos de outro tipo de material vegetal, preservado a baixas temperaturas ou sob a forma de coleções de culturas *in vitro*. Estes bancos podem ter um carácter mais geral ou restringirem-se a espécies particulares, como sejam espécies de interesse agrícola, espécies silvestres e de interesse ecológico ou plantas ameaçadas ou em perigo de extinção (Benson, 1999; Panis *et al.*, 2001; Bacchetta *et al.*, 2008; Corvelo, 2010; Bilz *et al.*, 2011).

A cultura de espécies raras, de plantas medicinais e aromáticas foi sempre valorizada no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (JBUC), desde a época da sua fundação pelo Marquês de Pombal em 1772, até hoje, em que é prioritária a sua preservação (Tavares *et al.*, 2010c). Na verdade, o Jardim Botânico da Universidade de Coimbra, membro do BGCI, está envolvido em ações de conservação e em 2007 estavam conservados no banco de sementes do JBUC e inscritos no *Index Seminum* (catálogo das sementes e esporos recolhidos anualmente para as coleções do jardim) cerca de uma centena de espécies, subespécies e variedades endémicas da Península Ibérica, sendo onze endemismos exclusivamente portugueses (Almeida *et al.*, 2007).

Portugal faz parte de uma região muito rica em endemismos (Parker, 1981; Giménez *et al.*, 2004; Bilz *et al.*, 2011), bem representados na família das Apiaceae, plantas aromáticas produtoras de óleos essenciais, de reconhecidas potencialidades medicinais.

1.3. APIACEAE - BREVE DESCRIÇÃO E IMPORTÂNCIA

As apiáceas constituem uma família botânica numerosa, muito diversa, representada por cerca de 455 géneros e 3.800 espécies distribuídas por amplas regiões subtropicais e temperadas (Pimenov e Leonov, 1993; Castroviejo *et al.*, 2003; Tosun *et al.*, 2006; Garcia e Solis, 2007; Aguiar, 2012). Para o género *Daucus* L. estão identificadas 20 espécies em todo o mundo (Lain, 1981), das quais sete estão descritas para a Península Ibérica (Castrovejo *et al.*, 2003).

Na natureza, estas plantas estão bastante expandidas na área mediterrânea: adaptadas ao ambiente fresco do sotobosque (*Anthriscus nemorosa*), ou a zonas de estepe e pradarias frias (*Ferula communis*), ou campos cultivados (*Ridolfia segetum*); algumas são rupícolas (*Athamanta sicula*), ou halófilas, de zonas bem próximas do mar (*Crithmum maritimum* e *Daucus carota* subsp. *halophilus*). Este último é um *taxon* muito interessante por ser um parente silvestre da cenoura (Frese e Nothangel, 2008), e por ser endémico e exclusivo de 3 províncias portuguesas, Algarve, Baixo Alentejo e Estremadura (Pujadas, 2002; 2003a; 2003b; Castroviejo *et al.*, 2003)

Na sua maioria, esta família é constituída por espécies herbáceas e algumas com hábito arbustivo. Apenas uma espécie arbórea, *Heteromorpha arborescens* (Spreng.) Cham. & Schlttdl ocorre na África do Sul.

O caule das plantas herbáceas é articulado em nós e entrenós e suporta folhas, geralmente pecioladas, alternas, na sua maioria divididas.

Uma das características a salientar é a morfologia das inflorescências, tipicamente umbeladas (o que justifica a designação anteriormente aceite - Umbelliferae), simples ou compostas (uma umbela com várias umbélulas em cada extremo).

As brácteas encontram-se na base da umbela formando um involúcro, o mesmo sucedendo com as umbélulas, formando um involucelo. A inflorescência também pode adquirir a forma de capítulo, pelo encurtamento do pedúnculo da umbela (e. g. *Eryngium*).

As flores são na sua maioria de cor branca, actinomórficas e com nectários; as periféricas podem ser unissexuadas ou estéreis, podendo desenvolver, desproporcionadamente, 1 ou 2 pétalas. A corola, dialipétala, é formada por 5 pétalas, em alguns casos bilobadas. O androceu é constituído por um verticilo de 5 estames; o ovário, ínfero, bilocular, é constituído por 2 carpelos apresentando dois estiletos livres,

divergentes, que na sua parte basal estão mais ou menos engrossados formando uma estrutura almofadada (estilopódio), que persiste no fruto.

O fruto é um diaquénio, constituído por 2 mericarpos, sustentados por um carpóforo, com uma morfologia própria para cada espécie e que se utiliza, inclusivamente, como caracter chave de identificação. Também é designado por esquizocarpo por ser um fruto seco indeiscente que se divide na maturação em diversos mericarpos - parte de um fruto, separada naturalmente no sentido longitudinal e contendo uma única semente. Os mericarpos são frequentemente ornados com espinhos, pêlos, asas, etc. (Aguiar, 2012). As sementes apresentam um embrião envolvido por endosperma abundante.

Muitas espécies são economicamente importantes, sendo usadas como condimentos, ornamentais, aromáticas e medicinais (Tosun *et al.*, 2006). Como exemplos mais conhecidos temos o anis (*Pimpinella anisum*), o aneto (*Anethum graveolens*), o cominho (*Cuminum cyminum*), a alcarávia (*Carum carvi*), o coentro (*Coriandrum sativum*), o funcho (*Foeniculum piperitum*), a salsa (*Petroselinum crispum*) e o aipo (*Apium graveolens*). Outras espécies são cultivadas como legumes, como a cenoura (*Daucus carota*) e a cherívia (*Pastinaca sativa*). Outras, contudo, são conhecidas como potentes venenos, como a cicuta (*Conium maculatum*), a planta que ficou conhecida na História por ter sido usada no envenenamento de Sócrates, filósofo ateniense, ou a cicuta-menor (*Cicuta virosa*) (Mariz, 1895; Pereira Coutinho, 1939; Sampaio, 1946, 1988; Tutin *et al.*, 1968, 1981; Castroviejo *et al.*, 2003; Aguiar, 2012; Furnari *et al.*, 2012).

O estudo das Apiaceae tem demonstrado resultados relevantes, não só pelo seu valor teórico fundamental, como pela sua aplicabilidade prática, estando inscritas em diversas farmacopeias cerca de uma dúzia de *taxa* e/ou os seus óleos essenciais (Eikert, 2000). Por esta razão, diversos *taxa* são amplamente utilizados na medicina popular, o que põe em perigo as populações espontâneas.

Na verdade, desde os tempos antigos (Dioscórides), numerosas apiáceas são usadas na medicina popular como fontes de especiarias, drogas e medicamentos. Hoje em dia, mais de 100 espécies cultivadas das Apiaceae estão registadas para vários usos, principalmente como plantas medicinais (41%), particularmente devido aos seus óleos essenciais (Ekiert, 2000; Giménez *et al.*, 2004; Edris, 2007; Khoshbakht *et al.*, 2007; Maxted e Dulloo, 2008; Anwar *et al.*, 2009) usados como agentes antimicrobianos (Oroojalian *et al.*, 2010; Popovic *et al.*, 2010; Siljegović *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*,

2012a; 2012b). Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, constituídos maioritariamente por terpenos de baixo peso molecular, de importante valor adaptativo para a planta, a que o Homem recorre para diversas utilizações. Muitos produtos naturais provenientes das Apiaceae foram também descritos como tendo ação antisséptica, expetorante, diurética, vasodilatadora, carminativa ou espasmolítica (Ekiert, 2000; Nalawade *et al.*, 2003; Adams *et al.*, 2009).

Na realidade, a importância económica das plantas desta família provém, particularmente, dos seus óleos essenciais. O interesse pelo seu consumo na atualidade é testemunhado pelas 45.000 a 50.000 toneladas produzidas e transacionadas anualmente, a que recorrem indústrias como a alimentar e de bebidas, bem como coadjuvantes corretivos de sabor e odor em medicamentos destinados à administração oral, ou como aromatizantes em medicamentos para aplicação sobre a pele e mucosas. A indústria farmacêutica recorre também a alguns constituintes de óleos essenciais como matérias-primas para a semissíntese de outros compostos (Proença-da-Cunha, 2005).

1.3.1. Endemismos ibéricos representados em Portugal

A Península Ibérica, com cerca de 600.000 km², está separada da maior parte da Europa pela cadeia montanhosa dos Pireneus, limitada pelo Oceano Atlântico (N, W e SW) e pelo Mar Mediterrâneo (S e E). A península é caracterizada por uma flora muito rica em plantas vasculares (Lobo *et al.*, 2001; IUCN, 2011), que engloba cerca de 8.000 espécies e subespécies de plantas vasculares nativas e naturalizadas, representando um dos 34 *hotspots* de biodiversidade mundial (CI, 2012), como já foi referido. Inclui ainda mais de 1.200 espécies e subespécies endémicas de plantas vasculares, o que representa cerca de 15 % da flora total da Península Ibérica (Parker, 1981; Giménez *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007; Bilz *et al.*, 2011).

A família das Apiaceae é muito diversa e a Flora Ibérica descreve 83 géneros (Castroviejo *et al.*, 2003), sendo 107 espécies representadas em Portugal Continental (Aguiar, 2012). Esta Flora, uma das mais recentes e conceituadas na Europa (Bergmann *et al.*, 2010), engloba as regiões geográficas de Espanha Continental, ilhas Baleares e Portugal Continental. Considera 62 *taxa* endémicos para as Apiaceae, dos quais 48 são

Introdução

endemismos exclusivos de Espanha, 13 comuns aos dois países e 14 endémicos de Portugal Continental (Castroviejo *et al.*, 2003).

Os endemismos desta família em Portugal estão representados ainda por 12 endemismos insulares, podendo citar-se como exemplo o género *Melanoselinum* Hoffman, um dos cinco *taxa* de Apiaceae endémicos do arquipélago da Madeira (Aguiar *et al.*, 2004) e os endemismos *Daucus carota* subsp. *azoricus*, *Angelica lignences*, *Sanicula azoricaea* *Chaerophyllum azoricum*, de entre sete *taxa* Apiaceae endémicos do arquipélago dos Açores (ALFA, 2010; Corvelo, 2010).

As Apiaceae da Península Ibérica estão representadas em Portugal Continental por 14 *taxa* endémicos, a saber: *Angelica major* Lag., *Angelica pachycarpa* Lange, *Bunium macuca* Boiss. subsp. *macuca*, *Conopodium majus* (Gouan) Loret subsp. *marizianum* (Samp.) López Udias & Mateo, *Conopodium subcarneum* (Boiss. & Reut.) Boiss. & Reut., *Daucus carota* L. subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas, *Distichoselinum tenuifolium* (Lag.) García Martín & Silvestre, *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss., *Eryngium galioides* Lam., *Ferula communis* L. subsp. *catalaunica* (Pau ex C. Vicioso) Sánchez Cuxart & Berna, *Ferulago capillaris* (Link ex Spreng.) Cout., *Laserpitium eliasii* Sennen & Pau subsp. *thalictrifolium* (Samp.) P. Monts., *Seseli montanum* L. subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Laínz, *Thapsia minor* Hoffmanns. & Link. Um *taxon* é exclusivamente português (*Daucus carota* subsp. *halophilus*), enquanto 13 são comuns a Portugal e Espanha, sendo os 14 *taxa* objeto de estudo deste trabalho (Tabela 1, ver secção 2.1.).

Com base na Flora Ibérica, as cinco espécies endémicas mais vulneráveis em Portugal continental, com uma área de distribuição mais restrita e portanto com prioridade para a conservação são: *Angelica pachycarpa* (Estremadura-Ilhas Berlengas), *Daucus carota* subsp. *halophilus* (Algarve e Baixo Alentejo), *Bunium macuca* subsp. *macuca* (Alto Alentejo), *Distichoselinum tenuifolium* (Algarve) e *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Trás-os-Montes e Alto Douro) (Parker, 1981; Castroviejo *et al.*, 2003).

Dados recentes (Bilz *et al.*, 2011) mostram que mais de 50 *taxa* desta família consta do Apêndice 2 da Lista Vermelha das plantas vasculares de 27 estados membros da União Europeia. Sete dos onze géneros a que pertencem as plantas endémicas em estudo constam da mesma lista: *Seseli*, *Laserpitium*, *Ferula*, *Eryngium*, *Bunium*, *Angelica* e *Daucus*; *Eryngium galioides* vem referenciada como LC - pouco preocupante - e *Daucus*

halophilus, o *taxon* endêmico exclusivo de 3 províncias portuguesas (Pujadas, 2003a; 2003b), está indicado como DD - informação insuficiente (Bilz *et al.*, 2011).

Alguns dos géneros a que pertencem estas plantas endémicas são utilizados na alimentação, como a cenoura, e a maioria na medicina popular, para o tratamento de uma ampla gama de infeções, sendo *Angelica*, *Bunium*, *Daucus*, *Eryngium*, *Seseli* e *Thapsia* mais frequentemente utilizados (Castroviejo *et al.*, 2003).

Daucus carota subsp. *carota*, designada “laço da rainha Anne” na América do Norte, onde é considerada uma planta invasora, é uma forma selvagem de *D. carota* e será o ancestral da cenoura domesticada, a subespécie *sativus*, a única forma cultivada com importância a nível mundial (Rong *et al.*, 2010).

Nove subespécies de *D. carota* são descritos para a Península Ibérica (Castroviejo *et al.*, 2003), sendo cinco subespécies representadas em Portugal Continental, onde apenas quatro são nativas: *D. carota* L. subsp. *carota*; *D. carota* L. subsp. *maximus* (Desf.) Bal; *D. carota* L. subsp. *gummifer* Hook (Syme) e *D. carota* L. subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas.

Assim, para além da subespécie cultivada (subsp. *sativus*) e as nativas, subespécie *carota* e o já referido endemismo *D. carota* subsp. *halophilus*, existem em Portugal Continental outras duas subespécies nativas (subsp. *gummifer* e subsp. *maximus*), sendo muito importante conseguir a distinção clara entre os *taxa*. Esta não é uma tarefa fácil quando baseada apenas na análise das características morfológicas, que apresentam alguma complexidade, o que ocorre, geralmente, em todas as Apiaceae.

Na verdade, a caracterização molecular da diversidade de plantas é uma ferramenta importante para identificação dos *taxa*, fator também relevante ao nível industrial, pois tem um grande potencial para melhorar a eficiência da reprodução das plantas cultivadas (Bradeen *et al.*, 2002), estando atualmente em curso estudos que visam identificar polimorfismos da cenoura (Iorizzo *et al.*, 2011).

Conforme referimos, a morfologia da família Apiaceae é muito variada. No entanto, *Eryngium* é um género interessante, pois distingue-se de outras Apiaceae pelas suas inflorescências capitadas rodeadas por brácteas e pela presença de uma única bractéola por flor. Dados da dispersão e análises de vicariância indicaram que os candidatos mais prováveis para a sua origem são subgéneros do Mediterrâneo Ocidental: *Eryngium* subgen. *Eryngium* e *Eryngium* subgen. *Monocotyloidea* (Calvino *et al.*, 2008). O primeiro *taxon*

inclui todas as espécies do Velho Mundo (África, Europa e Ásia), enquanto o segundo inclui todas as espécies do Novo Mundo (Norte, Central e América do Sul e Austrália). No entanto, como salientado pelo Calviño *et al.* (2008; 2010) a interpretação da história evolutiva de *Eryngium* permanece extremamente difícil, uma vez que combina vários processos complexos, tais como radiações rápidas e evolução reticulada e dispersões de longa distância.

Vinte e seis espécies de *Eryngium* são referidas na Flora Europeia (Tutin *et al.*, 1968) e dezasseis estão descritas para a Península Ibérica (Castroviejo *et al.*, 2003), das quais sete são comuns aos dois países. A espécie *E. pandanifolium* só está referenciada em Portugal, onde estão presentes dois endemismos ibéricos: *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss. e *Eryngium galioides* Lam. (Castroviejo *et al.*, 2003; Nieto Feliner, 2003; Gimenez *et al.*, 2004).

Eryngium duriaei é um espécie herbácea, polinizada por insetos, caracterizada por ter $x = 8$, como número base de cromossomas mais comum, embora números mais baixos (e.g., $x = 5-7$) também tenham sido relatados (O'Leary *et al.*, 2004), bem como diferentes níveis de ploidia ao nível do género (Perthuy *et al.*, 2010). Várias espécies de *Eryngium* foram previamente estudadas quanto à química, diversidade e propriedades de seus óleos essenciais (Ayoub *et al.*, 2003; 2006; Pala-Paul *et al.*, 2005; 2010; Cavaleiro *et al.*, 2011; Darriet *et al.*, 2012).

Como outras Apiaceae, *Eryngium duriaei* é uma espécie aromática cujos óleos essenciais podem ter algumas aplicações práticas. No entanto, os dados disponíveis sobre a composição e atividade biológica de óleos essenciais de *E. duriaei* são escassos. Além disso, informações sobre as diferentes populações relatadas em Portugal são bastante limitadas e existem dúvidas sobre as relações ao nível taxonómico. De facto, Jansen (1998) e Nieto Feliner (2003) apontam algumas diferenças morfológicas entre as populações ibéricas de *Eryngium duriaei*.

Os metabolitos secundários como óleos essenciais, podem ser considerados como marcadores biológicos (Nogueira *et al.*, 2008; Sena Filho *et al.*, 2010), bem como a variação do genoma de DNA (Loureiro *et al.*, 2007a, b; Sunnucks, 2010) e a análise química, para certificar a identificação de espécies morfológicamente semelhantes (Pala-Paúl *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2011).

Esta questão é especialmente relevante para o estudo de espécies endémicas, restritas a populações de habitats muito limitados e particulares (Qiu *et al.*, 2004), onde estes marcadores químicos representam uma ferramenta poderosa e abrangente. Não só podem contribuir para controlar e manter o controlo de qualidade na extração dos metabolitos secundários, por exemplo, os óleos essenciais para utilização em aplicações medicinais, como podem ajudar na identificação taxonómica de espécimes de plantas.

1.4. AS PLANTAS AROMÁTICAS COMO FONTE DE METABOLITOS ATIVOS

As plantas representam uma fonte de importantes produtos bioativos para a Humanidade e o uso de produtos naturais com propriedades medicamentosas é tão antigo como a civilização humana. Por muito tempo, os vegetais, minerais e animais foram os únicos recursos para o alívio de enfermidades (Rates, 2001; Proença-da-Cunha, 2005; Proença-da-Cunha *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2009; Carretero Accame *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas a ciência tem vindo a validar práticas de medicina tradicional e a reforçar esse conhecimento, pela identificação dos compostos ativos e dos respetivos mecanismos de ação (Proença-da-Cunha, 2005; Simões *et al.*, 2009). Com o aparecimento crescente de novas ameaças à saúde pública e dada a toxicidade associada ao uso indiscriminado de fármacos sintéticos tem havido um aumento de interesse pela utilização de plantas e produtos derivados de plantas (Elless *et al.*, 2000; Machado, 2010). Os produtos naturais e seus derivados estão na base do desenvolvimento de mais de 50% dos fármacos atualmente disponíveis, contribuindo as plantas para 25% desse total (Phillipson, 1999; Newman *et al.*, 2003; Gurib-Fakin, 2006; Garcia e Solis, 2007).

Um grande número de plantas medicinais continua a ser investigado pelo seu potencial valor farmacológico. Apesar do incremento na cultura de plantas medicinais a indústria farmacêutica é, ainda, altamente dependente das populações selvagens enquanto matéria-prima para a extração de compostos com interesse medicinal. Muitas plantas medicinais estão hoje severamente ameaçadas devido à falta de práticas adequadas de cultivo, à destruição de habitats, bem como à recolha ilegal e indiscriminada de plantas. No entanto, apenas cerca de 10% das cerca de 400.000 espécies de plantas vasculares foram caracterizadas quimicamente, representando o reino vegetal, por isso, um imenso

reservatório de moléculas biológicas com potencial valor industrial (*Strategic Research Agenda 2025: - Part II, 2005*).

A vantagem das plantas enquanto fonte de produtos terapêuticos reside na sua capacidade de biossíntese de compostos potencialmente ativos em seres vivos, que pela complexa estrutura química são muitas vezes difíceis de sintetizar em laboratório. Na verdade, os metabolitos secundários representam a expressão das vantagens competitivas apuradas pela capacidade adaptativa de cada espécie ao seu ecossistema, durante a evolução (Kutchan, 2001; Proença-da-Cunha, 2005). Desprovidas de mobilidade para defesa e de sistema imunitário contra infecções virais, bacterianas ou fúngicas, as plantas desenvolveram uma complexidade de metabolitos secundários que funcionam como estratégias e armas químicas de resistência e combate, ao longo de mais de 300 milhões de anos de coevolução com estes microrganismos (Harborne, 1990; Wink, 2003; Simões *et al.*, 2009).

Na verdade, durante a evolução as plantas desenvolveram vias metabólicas para a síntese de uma grande diversidade de metabolitos secundários. Entre estes, os compostos de baixo peso molecular, voláteis, extraíveis por destilação e dotados de aroma, designam-se por óleos essenciais, sendo as plantas que os elaboram e acumulam as plantas aromáticas (Proença-da-Cunha, 2005). Estes produtos do metabolismo secundário podem ser encontrados em todos os órgãos das plantas aromáticas e são produzidos e acumulados em diferentes estruturas secretoras especializadas. Estas podem ser externas, tricomas glandulares e osmóforos, característicos das famílias Geraniaceae, Lamiaceae, Myrtaceae e Verbenaceae, ou estruturas internas, que ocorrem nas famílias Apiaceae, Pinaceae, Rutaceae e Zingiberaceae, como canais esquizogénicos ou lisigénicos, idioblastos e bolsas, ou ainda células modificadas de parênquima em Piperaceae (Proença-da-Cunha, 2005; Garcia e Solis, 2008).

1.4.1. Os óleos essenciais

Os metabolitos secundários das plantas incluem uma grande diversidade de classes químicas de compostos. Os óleos essenciais que são constituídos por uma enorme variedade de compostos químicos, não só desempenham um papel importante na planta como agentes protetores, induzidos em condições de stresses bióticos e abióticos, como

também apresentam efeitos positivos na saúde humana (Miguel, 2010; Zuzarte *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais são misturas muito complexas de compostos de baixo peso molecular, por vezes com mais de uma centena de moléculas diferentes. Muitas vezes são constituídos por um reduzido número de compostos maioritários, ainda que os componentes minoritários possam ser igualmente importantes, de tal modo que pequenas variações na composição podem alterar de forma acentuada o aroma e até mesmo as suas propriedades biológicas.

A maioria dos constituintes químicos que integram os óleos essenciais das gimnospérmicas e angiospérmicas são terpenos de baixo peso molecular. Os terpenos resultam da condensação da unidade pentacarbonada, 2-metilbutadieno ou isopreno, e por isso designados também por isoprenóides e constituem os principais constituintes dos óleos essenciais. Outro grupo importante de compostos são os fenilpropanóides que estão presentes nalgumas espécies da família das Apiaceae. Nos óleos essenciais predominam os dímeros e trímeros de isopreno, respetivamente, os monoterpenos de 10 carbonos e os sesquiterpenos com 15 carbonos.

Os óleos essenciais são substâncias voláteis, líquidas à temperatura ambiente, que se caracterizam pelo aroma intenso e penetrante. Mais de 17.500 espécies aromáticas são citadas, ainda que as plantas mais ricas em óleos essenciais pertençam a cerca de 30 famílias botânicas, destacando-se as Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae e Rutaceae (Garcia e Soils, 2007). No entanto, estima-se que cerca de metade dos géneros produtores de óleos essenciais ocorram em regiões com clima do tipo mediterrâneo, onde os óleos têm uma função relevante na regulação da evapotranspiração das plantas, saturando o ambiente exterior aos estomas (Ross e Sombrero, 1991). Para além disso, as secreções aumentam o brilho da superfície foliar regulando a temperatura pela reflexão de radiações. A relação temperatura, humidade do ar e o tipo de solo, especialmente no que respeita à disponibilidade de água assimilável pelas plantas, são os fatores edafoclimáticos que mais afetam a produção dos óleos essenciais.

Numa mesma planta os óleos essenciais podem encontrar-se em órgãos específicos ou ter uma distribuição mais ampla. Por exemplo, na roseira, encontram-se principalmente nas pétalas, enquanto em *Citrus aurantium* subsp. *aurantium* podem obter-se a partir do epicarpo, das folhas e das flores (Proença-da-Cunha, 2005; Garcia e Soils, 2007; Barra,

2009). As diferenças na composição de óleos essenciais em órgãos distintos da mesma planta são particularmente evidentes em espécies entomófilas, onde desempenham funções ecofisiológicas importantes, sendo a composição do óleo determinante na atração de polinizadores. Este facto pode ser explicado pela coexistência de diferentes tipos de estruturas secretoras que podem produzir e segregar compostos distintos, ter diferentes processos de secreção, não se desenvolverem simultaneamente ou por estarem distribuídas de forma heterogénea na planta. Nos períodos de intensa atividade metabólica, floração e frutificação, os óleos podem variar muito significativamente a sua composição, dependendo assim da fase ontogénica da planta (Proença-da-Cunha, 2005; Garcia e Soils, 2007).

É muito comum a variabilidade química das plantas aromáticas, considerando-se consequência de diversos fatores que influenciam a biossíntese de compostos voláteis e que fundamentam a existência, no mesmo *taxon*, de óleos essenciais com composições muito distintas (Sangwan *et al.*, 2001). Estes fatores são de natureza diversa, ambientais ou edáficos, extrínsecos à biologia vegetal, ou dependem da fisiologia das plantas ou do seu genoma (Salgueiro, 1994; Cavaleiro, 2001; Németh 2005; Proença-da-Cunha, 2005; Angioni *et al.*, 2006; Garcia e Solis, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Barra, 2009).

A ação de fatores genéticos na variabilidade química dos óleos ocorre numa população quando os indivíduos, da mesma espécie, produzem óleos essenciais de composição muito distinta, de tal modo que se distinguem as plantas pelo respetivo aroma. Esta diferente composição química dos óleos essenciais permite caracterizar estirpes genéticas que decorrem da expressão de vias metabólicas distintas como consequência de pequenas diferenças genéticas e que permite considerar *taxa* químicos infraespecíficos, variedades químicas ou quimiotipos (Proença-da-Cunha, 2005).

A presença de quimiotipos é frequente, particularmente nas famílias Apiaceae e Lamiaceae, podendo apresentar, uma mesma espécie, elevado polimorfismo químico (Salgueiro, 1994; Javidnia *et al.*, 2006; Palà-Paúl *et al.*, 2006; Rubiolio *et al.*, 2006; Oxkhan *et al.*, 2007; Petrovic *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2007a; 2007b; Seo *et al.*, 2007).

Tanto os óleos como as plantas que os contêm são designados fármacos aromáticos, quando possuem propriedades farmacológicas que justificam a sua inclusão nas farmacopeias. Os óleos essenciais constituem matéria-prima para a indústria farmacêutica, agroalimentar, perfumaria e cosmética. Utilizam-se em diversas situações, como por

exemplo no tratamento de certas perturbações digestivas, em problemas bronco-respiratórios ou enquanto antissépticos e cicatrizantes (Proença-da-Cunha, 2005; Garcia e Soils, 2007).

1.4.1.1. Obtenção e controlo de qualidade

Os processos extrativos que conduzem à obtenção dos óleos essenciais a partir de material vegetal são a destilação, com ou sem vapor de água, e a expressão ou extração mecânica (este último no caso dos frutos dos citrinos). Outros métodos de extração com solventes orgânicos, corpos gordos ou com CO₂, originam outros produtos aromáticos, que se utilizam principalmente em perfumaria e na alimentação, mas que pela diferente metodologia extrativa, não se denominam óleos essenciais (Proença-da-Cunha, 2005).

A destilação proporciona a extração dos compostos voláteis sem arrastamento de produtos fixos, utilizando água e ou o vapor de água para facilitar a libertação dos óleos essenciais das células ou das estruturas vegetais onde se acumulam. O vapor de água arrasta os compostos voláteis que, após condensação, vão constituir uma fase oleosa imiscível com a água, o óleo essencial (Proença-da-Cunha, 2005).

De acordo com o modo como a água e o vapor são utilizados distinguem-se diferentes técnicas de destilação: a destilação em água-hidrodestilação, a destilação em água com arrastamento de vapor e a destilação pelo vapor (Lawrence, 1995a).

A qualidade dos óleos pode variar consoante a técnica utilizada. Na destilação por arrastamento de vapor o material é apenas sujeito à ação do vapor de água, as degradações de constituintes dos óleos essenciais são reduzidas por não haver contacto direto com a água, sendo de qualidade superior os óleos que se obtêm por esta técnica (Proença-da-Cunha, 2005). A elevada temperatura do processo pode proporcionar a ocorrência de oxidações, hidrólises, polimerizações e a volatilização de alguns constituintes dos óleos.

Os óleos essenciais requerem um adequado e restrito controlo de qualidade, para que possam ser usados com eficácia e segurança

1.4.1.2. Caracterização química

O perfil químico de um óleo essencial pode, em muitos casos, ser considerado um marcador de identidade de um determinado *taxon*. A análise dos óleos essenciais fornece informações relevantes para os estudos de atividade biológica, e também, por vezes, para o esclarecimento da validação taxonómica de algumas espécies.

A caracterização química dos óleos essenciais é portanto imprescindível para a exploração do seu potencial de aplicabilidade e diferenças relevantes têm sido também observadas nos óleos de plantas colhidas na natureza.

Quanto à composição, os óleos essenciais diferem muito entre si, mas têm propriedades físico-químicas comuns. São constituídos por misturas de compostos voláteis, arrastáveis pelo vapor de água, que são normalmente pouco solúveis em água e solúveis em álcool absoluto, hexano, tetracloreto de carbono e outros solventes orgânicos (Proença-da-Cunha, 2005; Garcia e Soils, 2007).

A identificação e quantificação dos componentes de um óleo essencial realizam-se habitualmente por métodos cromatográficos. A seleção da metodologia analítica depende da finalidade técnico-científica da análise e do conhecimento previamente disponível sobre a composição do óleo (Joulain, 1998), devendo, sempre que necessário, garantir a identificação de cada um dos constituintes da mistura e possibilitar a respetiva quantificação.

Devido à complexidade destas misturas, quase todas as metodologias de análises envolvem duas etapas sequenciais, nomeadamente o fracionamento ou individualização de constituintes, geralmente por recurso a métodos cromatográficos, seguido de estudos analíticos, químicos ou espectroscópicos sobre frações ou sobre os compostos isolados. Em cada uma dessas etapas o recurso a um único método não é suficiente para viabilizar a melhor sequência de análise e garantir a máxima informação sobre a composição da amostra. É exigido que a identificação de cada composto seja fundamentada em resultado de, pelo menos, duas metodologias complementares, por exemplo, comportamento cromatográfico e dados espectroscópicos.

A cromatografia gás-líquido (CGL) ou cromatografia em fase gasosa é a metodologia de uso mais generalizado para a separação dos constituintes dos óleos essenciais. O uso de colunas capilares possibilita o fracionamento de misturas complexas

voláteis e na maior parte dos casos, a individualização da maioria dos seus componentes. Dadas as suas características, esta metodologia é separativa e também analítica porque permite a aquisição de informação qualitativa.

A CGL é hoje a mais eficiente modalidade cromatográfica para o fracionamento de misturas complexas voláteis (Marriot *et al.*, 2001) e fundamenta as metodologias derivadas, tais como as modalidades multidimensionais. O registo cromatográfico CGL permite obter informações importantes para a análise qualitativa de misturas complexas pela interpretação e comportamento de retenção dos compostos eluídos.

Teoricamente, a retenção de cada composto na mesma coluna e fase estacionária, expressa em tempo de retenção, é constante nas mesmas condições experimentais de fluxo de fase móvel e de temperatura. Contudo, como a reprodutibilidade prática nas mesmas condições não pode ser garantida em absoluto, não permite a identificação de misturas complexas por comparação apenas dos tempos de retenção. Esta limitação foi ultrapassada através da indexação dos valores dos parâmetros de retenção dos compostos da amostra aos de compostos de referência (previamente registados, determinados nas mesmas condições experimentais) cromatografados simultaneamente.

Na análise de OEs é usual a apreciação conjunta de índices de retenção relativos a duas fases estacionárias de distinta polaridade. Cada composto da amostra interage de forma diferente e tem um comportamento de retenção distinto consoante as fases estacionárias, o que torna evidentes as coeluições, não detetáveis com o uso de uma única fase estacionária, e confere mais rigor na identificação dos compostos.

A elevada resolução e os baixos fluxos de fase móvel gasosa, conferem à CGL grande versatilidade proporcionando a possibilidade de acoplar diferentes tipos de detetores, como o detetor universal de ionização de chama (DIC) e de espectrometria de massa (EM). O primeiro possibilita a deteção dos compostos eluídos e o segundo permite a aquisição de espectros de massa sobre o efluente cromatográfico. Assim, a CGL-EM é uma das técnicas mais utilizadas na análise destas misturas complexas, já que o varrimento, quase em contínuo sobre o efluente cromatográfico, permite adquirir um ou mais espectros sobre cada um dos valores resolvidos (Proença-da-Cunha, 2005).

1.4.2. Atividades biológicas

Muitos óleos essenciais e seus constituintes revelam bioatividades e têm por isso aplicação na saúde humana e animal, desde atividade antimicrobiana, antiespasmódica, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antioxidante, biocida e até anticancerígena (Edris, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Hemaiswarya *et al.*, 2008; Gutierrez *et al.*, 2009; Zuzarte *et al.*, 2011).

As moléculas bioativas existentes nas espécies vegetais ocorrem como metabolitos secundários, não contribuindo diretamente para o metabolismo básico das plantas, mas, como anteriormente referido, desempenham um papel fundamental na defesa das mesmas, contra herbívoros, doenças e pragas, auxiliando à sobrevivência das espécies (Cox, 1990).

A atividade antimicrobiana é um das mais estudadas e mais reportada para os óleos essenciais. Esta atividade está, geralmente, associada à presença de pequenas moléculas oxigenadas, capazes de estabelecer pontes de hidrogénio, exemplos do timol, do carvacrol, do eugenol, do linalol, do geraniol, ou do geranial. Geralmente atuam por modificações da membrana externa dos microrganismos e por inibição de enzimas da cadeia respiratória, comprometendo o equilíbrio energético da célula (Proença-da-Cunha, 2005).

A eficácia na inibição do desenvolvimento de bactérias Gram⁻ e Gram⁺, de leveduras e de fungos filamentosos, incluindo por vezes estirpes usualmente resistentes aos antibióticos convencionais, tem motivado o interesse para a avaliação e caracterização de atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre diversos microrganismos (Proença-da-Cunha, 2005; Machado, 2010). Os dermatófitos são classificados como espécies geofílicas, zoofílicas e antropofílicas de acordo com seu habitat principal, e espécies do género *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* são responsáveis por infeções comuns da pele, geralmente chamadas dermatofitoses ou micoses. Em 2008, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) aprovou um método de referência (M38-A) como um teste de suscetibilidade antifúngica de fungos filamentosos e outros foram posteriormente disponibilizados e têm sido aplicados para avaliar a capacidade antifúngica, pela avaliação da concentração mínima inibitórias (CMI) e da concentração mínima letal (CML) (Zuzarte *et al.*, 2011).

Resultados sobre a atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-helmíntica de óleos essenciais foram objeto de estudo e atualização recentes (Machado, 2010).

Vários trabalhos reportam importante atividade antimicrobiana nas famílias Apiaceae, Lamiaceae e Verbenaceae (Di Pasqua *et al.*, 2005). Também plantas como a canela, cravo, gerânio, limão, lima, laranja e alecrim apresentaram efeito inibitório significativo relativamente a bactérias Gram⁻ e Gram⁺ (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). A atividade antiviral dos componentes principais do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) (terpineno-4-ol, α -terpineno, β -terpineno, *p*-cimeno, terpinolene e α -terpineol) foi atribuída, principalmente, a terpinen-4-ol, o composto que se revelou mais ativo (Garozzo *et al.*, 2009).

Resultados sobre o efeito dos OEs em espécies de *Leishmania* demonstraram que *Cymbopogon citratus*, *Juniperus oxycedrus*, *Lavandula luisieri* e *Thymus capitellatus* possuem atividade anti-*Leishmania* com potencial aplicação ao tratamento da leishmaniose; também apresentaram significativa atividade anti-*Giardia* os OEs de *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon citratus* (Machado, 2010). Outros resultados sobre a atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* (Poaceae) e *Mentha piperita* (Lamiaceae), avaliados em quatro diferentes testes *in vitro*, demonstraram que o óleo essencial de *C. schoenanthus* pode ser um candidato interessante para o controlo de nemátodos (Katiki *et al.*, 2011).

A atividade antifúngica dos óleos essenciais tem sido demonstrada em diferentes famílias botânicas (Bansod e Rai, 2008; Zuzarte *et al.*, 2009; Machado, 2010) e tem sido avaliada contra diferentes estirpes de fungos, como por exemplo: leveduras (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*), dermatófitos (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*) e *Aspergillus* spp. (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*).

Um estudo de uma Apiaceae, *Smyrniololus atrum*, utilizando estas estirpes de fungos, demonstrou ser particularmente ativo contra *Cryptococcus neoformans* e estirpes de dermatófitos (Marongiu *et al.*, 2012).

Muitas espécies, incluindo algumas muito usadas na medicina tradicional, nunca foram objeto de estudos fitoquímicos nem de avaliações de atividades biológicas, pelo que este tipo de estudos se revela de grande importância podendo contribuir para a

valorização destas espécies. Considerando que algumas espécies estão em vias de extinção, a perda dessa biodiversidade pode representar também o desaparecimento definitivo de alguns compostos com potencial atividade biológica.

1.5. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o estudo de *taxa* de Apiaceae característicos da flora portuguesa, em termos de conservação e de produção de óleos essenciais de possível interesse. Deste modo, estabeleceram-se protocolos de micropropagação para a clonagem dos *taxa* prioritários e foram caracterizados os óleos essenciais, tendo em alguns casos sido avaliado o seu potencial bioativo. As razões que levaram à escolha destes *taxa* decorreram, por um lado do seu estatuto endémico, mas tiveram também em conta o seu potencial económico no que diz respeito à produção de óleos essenciais. Para concretizar este objetivo mais lato foram prosseguidas três linhas de investigação principais, nomeadamente:

1. a identificação e estudo das Apiaceae endémicas da Península Ibérica, presentes em Portugal, em termos da sua distribuição;
2. o estabelecimento de protocolos de micropropagação, para a conservação *ex situ*, *in vitro* e *in situ*, em particular dos *taxa* mais raros;
3. e a caracterização e avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais.

Em cada linha de investigação estabeleceram-se objetivos mais específicos como se indica nas secções seguintes.

1 - Identificação das Apiaceae endémicas ibéricas em Portugal.

A análise da distribuição das espécies alvo baseou-se nos dados disponíveis nas diferentes Floras consultadas, na verificação de material de Herbário e de outra documentação científica, apoiada no estudo dos caracteres morfológicos e recorrendo a outras metodologias (bioquímicas) para o diagnóstico taxonómico. A avaliação da vulnerabilidade dos *taxa* e dos seus ciclos vegetativos foi fundamental para a calendarização das datas de colheita que foi criteriosa e sustentada, com prioridade para as sementes e plantas das espécies de distribuição geográfica mais restrita, a recolher nos

respetivos nichos ecológicos. Todo o material-testemunho foi preparado para depósito no Herbário COI, e as sementes recolhidas foram conservadas no Banco de Sementes do Jardim Botânico de Coimbra e enviadas para outras instituições congéneres (Banco Português de Germoplasma, Jardim Botânico da Universidade de Lisboa e *Millenium Seed Bank*).

2 - Propagação *in vitro* e conservação *ex situ*.

Para cada um de cinco *taxa* foram testados diferentes explantes e meios de cultura com vista ao estabelecimento de protocolos que permitissem a propagação *in vitro* dos *taxa* prioritários por algumas das técnicas de micropropagação normalmente usadas para este efeito. Devido ao facto de observações preliminares terem mostrado que durante o processo de cultura *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus* surgiam com frequência flores, foi também traçado como objetivo desenvolver um protocolo com vista à otimização das condições de floração *in vitro* neste *taxon*. Uma vez que o êxito da micropropagação depende da transferência com sucesso das plantas para condições de campo, um dos objetivos desta fase foi também determinar as condições para uma eficaz aclimatização das plantas produzidas *in vitro*. Finalmente, sempre que possível, fez-se a reintrodução das plantas micropropagadas nos habitats naturais com o objetivo de seguir o seu comportamento comparativamente às plantas nativas.

3 - Caracterização química e avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais.

Com o objetivo de valorizar as espécies alvo deste trabalho foram caracterizados os óleos essenciais de cinco *taxa* e determinada a atividade antifúngica contra leveduras, dermatófitos e *Aspergillus*. A identificação de compostos bioativos é vantajosa não apenas em termos de aplicabilidade prática, mas pode também revelar-se um importante auxiliar em programas de conservação. Para além disso, os óleos essenciais são reconhecidos marcadores podendo ser utilizados numa perspetiva quimiotaxonómica, com o conseqüente aumento da fiabilidade na caracterização dos *taxa*, tornando mais aceitável a conservação de espécies com potencial valor económico.

Introdução

As atividades de investigação foram desenvolvidas em dois Centros de Investigação da Universidade de Coimbra: Centro de Ecologia Funcional da Faculdade de Ciências e Tecnologia e Centro de Estudos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia.

CAPÍTULO 2. MATERIAL E MÉTODOS



2.1. IDENTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DOS ENDEMISMOS IBÉRICOS DAS APIACEAE PORTUGUESAS

Para a identificação e localização dos endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas foi indispensável proceder a uma caracterização clara e concisa dos 14 *taxa* referidos para Portugal, bem como uma revisão e confirmação da sua distribuição geográfica. Para isso, foi necessário consultar e estudar as Floras Portuguesas, Ibéricas e Europeia (Mariz, 1895; Pereira Coutinho, 1939; Tutin *et al.*, 1968; Amaral Franco, 1974; Sampaio, 1988; Castroviejo *et al.*, 2003) e várias publicações de taxonomia com referências às Apiaceae (Gomez-Campo *et al.*, 1987; Aguiar, 1996; Pinto-Gomes, 1998; Mateo e Udías, 2000; Aguiar, 2001; Lopes, 2001; Silveira, 2001; Pujadas Salva, 2002a; 2003a; 2003b; 2007; Rivaz-Martinez *et al.*, 2002; Honrado, 2003; Tauleigne Gomes *et al.*, 2004; Almeida, 2005; Pinto-Gomes e Paiva-Ferreira, 2005; Almeida, 2006; Ribeiro, 2006; Amado, 2007; Moreno, 2008; Pinto-Gomes *et al.*, 2008; Queiroga *et al.*, 2008; Silva-Pando, 2008; Almeida, 2009a; 2009b). Em paralelo foi realizado um estudo do material-tipo de Herbários portugueses e espanhóis (COA - Jardín Botánico de Córdoba; COI - Instituto Botânico da Universidade de Coimbra; LISE- Estação Agronómica Nacional – Oeiras; LISI - Instituto Superior de Agronomia de Lisboa; MA- Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC; MGC- Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga; PO - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto).

Reconhecidas as plantas e a sua localização geográfica procedeu-se à avaliação do estatuto de conservação para apurar um critério para o estudo dos *taxa* e a prioridade de ação nas saídas de campo (ver Tabela 1).

Para o reconhecimento da situação de conservação dos 14 *taxa* foram consultados os seguintes documentos oficiais: ALFA (2007-2010), BGCI (2010), Conselho da Europa (1977; 1983), Diretiva Habitats (1992; 1999; 2005), Euro-Med PlantBase (2006-2011), *European red list of vascular plants* (2011), ICN (1996; 2006a; 2006b; 2007) e ICNB (2007a; 2007b).

Para além disso analisaram-se as publicações de Gomez-Campo *et al.* (1987), Amado *et al.* (2007), Moreno (2008), Queiroga *et al.* (2008), Silva-Pando (2008), Corvelo (2010) e Bilz *et al.* (2011).

Com base nestas consultas e seguindo as descrições para os 14 *taxa* referidos na Flora Ibérica (Castroviejo *et al.*, 2003), a publicação de referência mais recente, estabeleceram-se os critérios para a recolha do material vegetal. Esses critérios foram o grau de abundância e a distribuição geográfica, tendo sido definidos três grupos de distinta prioridade para a conservação (Tabela 1): grupo 1 - *taxa* prioritários, presentes apenas numa província portuguesa ou exclusivamente em Portugal (5 *taxa*); grupo 2 - presentes em 2 a 4 províncias portuguesas (5 *taxa*); grupo 3 - presentes em 5 ou mais províncias portuguesas (4 *taxa*).

Tabela 1: Endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas: distribuição geográfica e critérios prioritários de conservação

<i>Taxa</i>	Províncias	Grupo
1. <i>Eryngium galioides</i>	Ag, AAl, BA, BAi, BB	3
2. <i>Eryngium duriaei</i>	BA, BL, Mi, TM	2
3. <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	Ag, Bal, E	1
4. <i>Bunium macuca</i> subsp. <i>macuca</i>	AAl	1
5. <i>Conopodium subcarneum</i>	BA, BL, TM	2
6. <i>Conopodium majus</i> subsp. <i>marizianum</i>	Aal, Ag, BA, BAi, BB, BL, DL, E, Mi, TM	3
7. <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	TM	1
8. <i>Angelica major</i>	BA, BB, Mi, TM	2
9. <i>Angelica pachycarpa</i>	E	1
10. <i>Ferula communis</i> subsp. <i>catalaunica</i>	AAl, Ag, BA, BAi, BB, BL, E, R, TM	3
11. <i>Ferulago capillaris</i>	BA, Mi, TM	2
12. <i>Distichoselinum tenuifolium</i>	Ag	1
13. <i>Laserpitium eliasii</i> subsp. <i>thalictrifolium</i>	Mi, TM	2
14. <i>Thapsia minor</i>	AAl, Ag, BA, BAi, BB, BL, DL, E, Mi, TM	3

Províncias ibéricas (Castroviejo et al., 2003) - Portugal: AAl - Alto Alentejo; Ag - Algarve; BA - Beira Alta; BAi - Baixo Alentejo; BB - Beira Baixa; BL - Beira Litoral; DL - Douro Litoral; E - Estremadura; Mi - Minho; R - Ribatejo; TM - Trás-os-Montes e Alto Douro.

De acordo com a Tabela 1, o grupo 1 é o prioritário e engloba os cinco *taxa* endémicos mais vulneráveis em Portugal continental, com uma área de distribuição mais restrita e, portanto, com prioridade para a conservação: *Angelica pachycarpa* (Estremadura-Ilhas Berlengas), *Daucus carota* subsp. *halophilus* (Algarve e Baixo Alentejo), *Bunium macuca* subsp. *macuca* (Alto Alentejo), *Distichoselinum tenuifolium* (Algarve) e *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Trás-os-Montes).

A planificação e a calendarização para a colheita criteriosa de plantas foi dependente da sua fenologia, referenciada nas descrições e em material de herbário dos diferentes *taxa*.

Para a realização das colheitas, em particular nas Reservas e Parques Naturais e Nacionais, foi solicitada autorização às instituições competentes, nomeadamente, ao ICNB, que emitiu as respetivas licenças mediante indicação dos elementos adicionais necessários e solicitados para o efeito. A recolha do material vegetal, que se restringiu à parte aérea da planta com umbelas e/ou sementes, foi sempre condicionada pela abundância e representatividade dos *taxa*, de modo a salvaguardar as populações nativas.

As plantas silvestres foram analisadas *in situ* e elaboradas as respetivas folhas de herbário, depositadas no Herbário COI (ver anexo I).

Decorrente da confirmação *in situ*, ou não, da localização e abundância das plantas foram atualizados e otimizados os critérios de conservação.

2.1.1. Análise de caracteres taxonómicos

Dada a complexidade morfológica das Apiaceae foi necessário consultar vários taxonomistas e coletores portugueses e espanhóis para a certificação de aspetos taxonómicos e de localização das plantas, referências essenciais para o trabalho de campo. Para além disso, sempre que surgiram dúvidas quanto à posição taxonómica das plantas, recorreu-se a metodologias complementares de diagnóstico (secção seguinte), como aconteceu nos casos de *Daucus carota* e de *Eryngium duriaei* duas espécies em que a caracterização taxonómica tem sido objeto de estudo (Bradeen *et al.*, 2002; Fidelis *et al.*, 2008).

2.1.2. Microscopia ótica e microscopia eletrónica de varrimento

Para a análise da morfometria, os frutos das quatro subespécies nativas de *Daucus carota* foram fotografados e analisados à lupa, com recurso ao sistema *ImageTool* (v.3.0 for Windows, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA) e num microscópio ótico *Motic BA 310*. O tamanho dos frutos foi determinado usando um micrómetro e uma ampliação de 100 vezes.

Para um estudo com maior detalhe, os frutos foram também avaliados por microscopia eletrónica de varrimento (SEM - *Scanning Eletron Microscopy*). Para isso as amostras foram apenas desidratadas naturalmente (calor moderado), colocadas num porta-objetos (*stub*) e revestidas com uma película de 30 nm de ouro-paládio num metalizador (Jeol JFC-1100 Ion Sputter -1220V, 6Ma, 8 min), em vácuo. Os frutos foram depois observados num microscópio eletrónico de varrimento (JEOL JSM-5400 a 10 kV).

2.1.3. Citometria de fluxo

Seguindo a metodologia descrita por Loureiro *et al.* (2007a; 2007b), o teor em DNA foi analisado no seguinte material vegetal:

- indivíduos de diferentes populações, das quatro subespécies nativas de *Daucus carota* (*D. carota* L. subsp. *carota*; *D. carota* L. subsp. *maximus* (Desf.) Bal; *D. carota* L. subsp. *gummifer* (Syme) Hook. e *D. carota* L. subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas);
- indivíduos de quatro populações de *Eryngium duriaei*, em diferentes altitudes (superior e inferior a 1.700m).

O material vegetal fresco, da amostra a estudar (0,5 cm² de tecido foliar), foi seccionado com uma lâmina afiada, juntamente com 0,5 cm² de tecido foliar fresco padrão, numa caixa de Petri contendo 1 ml de tampão WPB (0,5 mM C₇H₁₉N₃.4HCl, 30 mM de citrato de sódio.3H₂O, 20 mM de MOPS, 80 mM de KCl, 20 mM de NaCl, 0,5 % (p/v) de Triton X-100), com o pH ajustado a 7,0, para libertação e manutenção da integridade dos núcleos. Como padrão usou-se *Solanum lycopersicon* cv. 'Stupické' (padrão de referência interno - 2C = 1.96 pg; Doležel *et al.*, 1992) no caso de *Daucus carota*. Para *Eryngium duriaei* foi utilizado *Pisum sativum*, com um padrão de referência com 2C = 8,76 pg.

A suspensão nuclear foi passada através de um filtro de *nylon* de 50 mm para remover restos de tecido e fragmentos celulares de grandes dimensões. Em seguida, adicionou-se iodeto de propídio (50 mg/mL, PI, Fluka, Suíça) e RNase (50 mg/mL, Sigma, EUA). Após um período de incubação de 5 minutos, a intensidade relativa da fluorescência (FL) de pelo menos 1.300 núcleos G1 por pico foi analisada num citómetro de fluxo *CyFlow Partec* (*Partec GmbH., Münster, Alemanha*), utilizando o *software FloMax* (*Partec GmbH*). O pico G1 do padrão foi ajustado ao canal 200 e de seguida o sistema de amplificação foi ajustado para uma tensão constante ao longo da experiência. Os

histogramas resultantes foram avaliados e o tamanho de genoma de cada amostra foi determinado usando a seguinte fórmula: média FL do pico G1 amostra/média FL do pico padrão G1 x tamanho de genoma do padrão.

O tamanho do genoma foi analisado através do teste *one-way* ANOVA. As diferenças no tamanho médio do genoma entre populações de cada *taxon* foram avaliadas usando o teste de Tukey de variação múltipla (SigmaPlot 12.2, SyStat Software).

2.1.4. *Daucus carota* L.: análise das subespécies nativas em Portugal

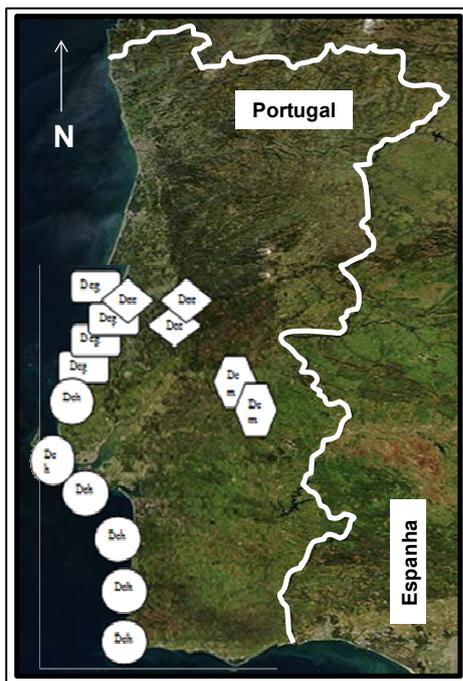
2.1.4.1. Material vegetal - identificação e localização geográfica

A colheita de exemplares das quatro subespécies nativas de *Daucus carota* foi realizada em populações naturais de Portugal Continental conforme indicado na Figura 3 e na Tabela 2, para estudos morfológicos e análise do teor de DNA.

As cinco províncias onde se realizaram as colheitas foram: Algarve - **Ag**; Alto Alentejo - **AAL**; Baixo Alentejo - **BAI**; Beira Litoral - **BL**; Estremadura - **E**.

Paralelamente foi realizada a caracterização dos óleos essenciais, em amostras do mesmo material vegetal, conforme descrito na secção 2.3.

As herborizações foram repetidas durante ciclos anuais diferentes, nas mesmas



localidades e nas mesmas populações.

Espécimes testemunhos foram preparados *in situ* para a determinação taxonómica e depositados no Herbário COI (anexo I).

Figura 3: Localização das áreas de estudo das populações das quatro subespécies nativas de *Daucus carota* em Portugal Continental:

Dch-*Daucus carota* subsp. *halophilus*; Dcg- *Daucus carota* subsp. *gummifer*; Dcc - *Daucus carota* subsp. *carota*; Dem - *Daucus carota* subsp. *maximus* (mapa de Portugal adaptado de www.google.com).

Tabela 2: Locais e períodos de colheita das quatro de subespécies nativas de *Daucus carota* utilizadas nos estudos morfológicos, na análise do teor em DNA e na caracterização de óleos essenciais.

<i>Daucus carota</i> (subespécies) /nº de populações	Localidades (14)	Calendário de colheita
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> /6	1. Cabo S. Vicente/Ag*	Maio/junho 2005, 2006; maio2008*; 2010.
	2. Arrifana/Ag*	
	3. Cabo Sardão/BAI*	
	4. Cabo Espichel/E	Junho/julho 2006, 2007; junho 2008; junho 2008; 2010.
	5. Cabo da Roca/E	
	6. Cabo Carvoeiro/E	
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>gummifer</i> / 4	7. Nazaré/BL*	Junho/julho 2005, 2007; junho 2008*; julho 2010*.
	8. Praia do Norte/BL*	
	9. Pedro de Moel/BL*	
	10. Figueira da Foz /BL	
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i> /3	11. Póvoa da Lomba/BL*	Junho 2008*/ julho 2010; junho/julho 2010*, 2011.
	12. Meãs do Campo/BL*	Julho 2005; julho2010* .
	10. Figueira da Foz/BL	
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>maximus</i> /2	13. Cartuxa/AAL*	Junho/julho 2006, 2007; junho2008*/julho 2010*.
	14. Montemor-o-Novo/AAL*	

*Localidades e datas de colheita das plantas para o estudo dos óleos essenciais.

2.1.4.2. Análise morfométrica dos frutos

A análise da morfometria dos frutos das quatro subespécies nativas de *Daucus carota* foi realizada num total de 33 plantas (subsp. *carota*, n = 10; subsp. *gummifer*, n = 10; subsp. *halophilus*, n = 9; subsp. *maximus*, n = 4) conforme se indica na Tabela 3 e no anexo II.

Tabela 3: Espécimes investigados para o estudo dos frutos de populações nativas das quatro subespécies de *Daucus carota*.

Taxa/Total de espécimes	Localidades / Voucher - Herbário COI	Total frutos analisados (Nº espécime/x3 frutos por espécime)
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i> /10	1-Vale das Pombas, Figueira da Foz, 2005, Tavares 16.	1/3
	2-Meãs do Campo, 2010, Tavares 139	1/3
	3-Póvoa da Lomba, 2011, Tavares s.n.	4/12
	2- Meãs do Campo, 2011, Tavares s.n	4/12
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>gummifer</i> /10	4-Praia do Norte, 2005, Tavares s.n. + 2006, Tavares 56.	1+1/6
	5-Nazaré, 2005, Tavares 12 + 2006, Tavares 44 + Tavares 57	3+1+1/15
	6-S. Pedro de Moel, 2005, Tavares s.n. + 2006, Tavares 55	1+1/6
	1-Vale das Pombas, Figueira da Foz, 2005, Tavares s.n.	1/3
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i> /9	7-S. Vicente, 2006, Tavares 43 + 2007, Tavares 64 + 2008, Tavares 91 + 2010, Tavares 124	1+1+1+2/15
	8-Cabo Sardão, 2006, Tavares 41	1/3
	9-Arrifana, 2007, Tavares 63	1/3
	10-Cabo da Roca, 2007, Tavares 68	1/3
	11-Espichel, 2007, Tavares 69	1/3
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>maximus</i> /4	12-Cartuxa, 2006, Tavares 52 + 2007, Tavares 73	1+2=9
	13-Montemor-o-Novo, 2010, Tavares 138	1/3
Total	13 Localidades e 33 espécimes voucher	99 frutos

Três frutos foram colhidos por planta e conforme a metodologia descrita na secção 2.1.2., procedeu-se à análise morfométrica com base nos seguintes carateres: comprimento, largura, comprimento dos espinhos, largura da base do espinho e número dos espinhos nas costas secundárias.

A análise estatística descritiva (média e desvio padrão da média) das variáveis quantitativas foi calculada para cada subespécie. O teste *one-way* ANOVA foi utilizado para avaliar as diferenças entre subespécies para as variáveis consideradas. As análises de variância foram realizadas utilizando os valores médios para cada amostra para evitar a pseudo-replicação. As duas variáveis, largura de fruto e largura das costas secundárias do fruto, foram transformadas com a função logaritmo para conseguir a normalidade e homocedasticidade. Todas as demais variáveis apresentam distribuição normal e

homocedástica. As análises multivariadas foram realizadas para investigar a organização estrutural das subespécies estudadas com base nos caracteres combinados dos frutos.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando os valores médios das amostras e de todas as variáveis.

Em complemento deste estudo foi analisado o detalhe dos frutos, particularmente ao nível da morfologia dos espinhos, em microscopia SEM.

2.1.4.3. Teor em DNA e nível de ploidia

Para a estimativa do nível de ploidia e conteúdo de DNA nuclear em plantas das diferentes populações foi utilizada a técnica de citometria de fluxo descrita na secção 2.1.3.

Folhas frescas de plantas foram recolhidas das populações silvestres das quatro subespécies nativas *Daucus carota*. O conteúdo em DNA foi estudado até 6 indivíduos por população (normalmente em 3 indivíduos/população) de cada uma das quatro subespécies da Tabela 2.

2.1.5. Estudo de *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss.

2.1.5.1. Material vegetal – identificação e localização geográfica

A colheita de exemplares *E. duriaei* foi realizada em populações silvestres de Portugal Continental, com base na fenologia e distribuição geográfica em diferentes províncias e altitudes (Fig. 4; Tabela 4) para estudos morfológicos e análise do teor em DNA. A população situada no Parque Natural da Serra da Estrela (PNSE) está acima de 1.700 m de altitude, e as outras três abaixo desta altitude (600-1.000).

Paralelamente foi realizada a caracterização dos óleos essenciais, em amostras do mesmo material vegetal, conforme descrito na secção 2.3.

As herborizações foram repetidas durante ciclos anuais diferentes, nas mesmas localidades e nas mesmas populações.

Espécimes testemunhos foram preparados *in situ* para a determinação taxonómica e depositados no Herbário COI (anexo I).

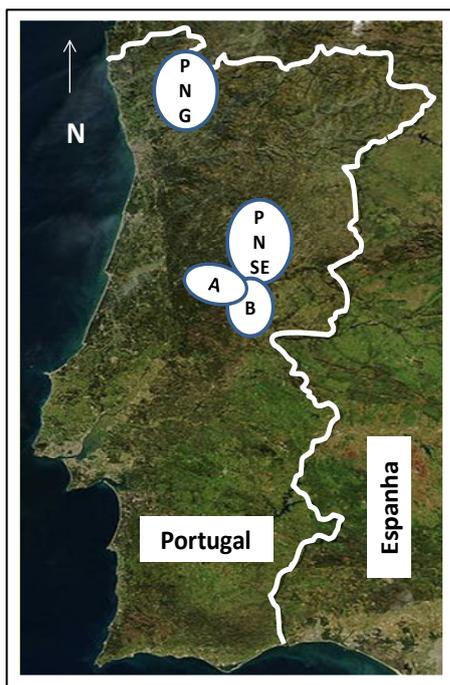


Figura 4: Áreas de estudo das populações de *Eryngium duriaei* utilizadas neste trabalho. PNG (Parque Nacional do Gerês); PNSE (Parque Natural da Serra da Estrela) e duas localidades do Açor (Serra do Açor: Colcurinho (A) e Margaraça (B) (mapa de Portugal adaptado de <http://www.google.com/imgres>).

Tabela 4: Populações de *Eryngium duriaei*: localidades e datas de colheita para estudos morfológicos, análise do teor em DNA e caracterização de óleos essenciais.

Localidades	Voucher – Herbário COI
Parque Natural Serra da Estrela, Cântaro Raso (> 1.700 m).	Beira Alta, Serra da Estrela, Cântaro Raso, 1700 m, 16.09.2008, <i>A.C. Tavares</i> , 112 (COI). Beira Alta, Serra da Estrela, Cântaro Raso, 1700 m, 11.07.2010.
Serra do Açor, Colcurinho (800-1.000 m).	Beira Litoral, Serra do Açor, entre Colcurinho e Senhora das Necessidades, 30.06.2005, <i>A.C. Tavares</i> , 8 (COI); 17.07.2006, <i>A.C. Tavares</i> , 54 (COI); 20.09.2008, <i>A.C. Tavares</i> , 113 (COI); 19.06.2010, <i>A.C. Tavares</i> , 136 (COI).
Serra do Açor, Mata da Margaraça (600-800 m).	Beira Litoral, Arganil, Mata da Margaraça, 08.10.2010, <i>A. C. Tavares</i> , 143 (COI).
Parque Nacional do Gerês, Mata da Albergaria (800-900 m).	Minho, Serra do Gerês, Mata da Albergaria, 26.07.2007, <i>A. C. Tavares</i> , 74 (COI). Minho, Serra do Gerês, Mata da Albergaria, leito seco do rio Homem, 04.10.2010.

2.1.5.2. Análise morfológica das plantas

Para avaliar a relevância taxonómica dos caracteres morfológicos das quatro populações portuguesas de *Eryngium duriaei* indicadas na tabela 4, foram analisadas as características que apresentavam maiores diferenças entre as plantas das referidas populações: altura das plantas, recorte foliar provido de recortes espinescentes ou não, consistência do limbo foliar membranáceo ou coriáceo, morfologia das folhas basais e das folhas caulinares e o tamanho e morfologia dos capítulos umbeliformes.

2.1.5.3. Teor em DNA e nível de ploidia

Para a estimativa do nível e conteúdo de DNA nuclear nas plantas das diferentes populações foi utilizada a técnica de citometria de fluxo descrita na secção 2.1.3.

O teor em DNA foi analisado até 5 indivíduos por população, em diferentes altitudes (acima e abaixo de 1.700 m), a partir de folhas frescas de plantas silvestres das quatro populações de *E. duriaei* (Fig. 4), conforme Tabela 4.

Foram apenas considerados os histogramas com picos simétricos e com um coeficiente de variação (CV) de pico da amostra G1 abaixo de 5%. Para confirmar a confiabilidade da estimativa de valores foi realizada a análise simultânea de ambas as populações de *E. duriaei*.

2.1.5.4. Cultura de embriões zigóticos para análise de cariótipo

No estudo sobre *Eryngium* para distinção das populações foram realizadas análises do cariótipo. Para isso, os embriões zigóticos foram removidos, em condições assépticas, de sementes previamente esterilizadas (ver secção 2.2.2) de duas populações de *Eryngium duriaei* (Serra da Estrela e Mata da Margaraça) (Fig. 4) e diretamente cultivados em meio base MS com metade da concentração.

Nesta análise do cariótipo, o número de cromossomas foi avaliado nos ápices radiculares de plântulas de *E. duriaei* germinadas *in vitro* e provenientes de duas populações (Serra da Estrela e Mata da Margaraça).

Os ápices radiculares (5 mm de comprimento) dos embriões germinados *in vitro* (20-30 dias após a germinação) foram cortados e tratados com colquicina 0,05 % (p/v) durante 2-2,5h, a 20°C, no escuro e depois fixados em etanol/ácido acético 3:1 (v/v), durante aproximadamente 4 h, à temperatura ambiente.

As zonas meristemáticas da raiz (1-2 mm do ápice) foram isoladas e coradas pela técnica de Feulgen (Darlington e La Cour, 1976), para a contagem de cromossomas. As amostras foram hidrolisadas em HCl 1N a 60° C, durante 6 minutos, transferidas para água destilada à temperatura ambiente durante 5 minutos, montadas em lâmina e coradas com reagente de Schiff durante 1-3 horas no escuro, num *squash* em ácido acético 45 % (v/v).

As preparações foram observadas num microscópio Nikon Eclipse E400 e as imagens registadas com uma câmara Nikon DS-U1 Visão Digital usando o *software* Lei-2U.

2.2. ENSAIOS DE CULTURA *IN VITRO*

2.2.1. Material vegetal

As sementes dos diferentes *taxa* foram recolhidas em habitat natural (Tabela 5) e mantidas à temperatura ambiente até ao início das experiências.

Tabela 5: Dados da colheita de sementes para cultura in vitro.

Taxa	Data e local de colheita das sementes /coordenadas GPS
1. <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	Junho. Cabo de São Vicente, Algarve. 37° 1' 30" N 8° 59' 40" W.
2. <i>Distichoselinum tenuifolium</i>	Agosto. Moncarapacho, Algarve. 37° 8' 41" N 7°7' 88 " W.
3. <i>Angelica pachycarpa</i>	Maiο. Ilha Berlenga. 39° 24' N 9° 30' W.
4. <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	Setembro a novembro. Alimonde-Carrazede e Samil-Bragança, Trás-os-Montes. 41° 48' N 06° 45' W.
5. <i>Eryngium duriaei</i>	Setembro. Mata da Margaraça e Serra da Estrela. 40° 19' 18.72" N e 7° 36' 46.68" W.

No caso de *Daucus carota* subsp. *halophilus* utilizaram-se também segmentos nodais (até 1,5 cm comprimento) de plantas silvestres colhidas no Cabo de São Vicente, no Algarve, durante o mês de abril.

Numa segunda fase, na indução de embriogénese somática, foram usadas, nas mesmas condições, sementes de plantas micropropagadas de *Angelica pachycarpa* e de *Distichoselinum tenuifolium* instaladas em viveiro no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra.

2.2.2. Germinação de sementes, tipos de explantes e cultura de segmentos nodais

A esterilização das sementes para ulterior isolamento e cultura de diferentes porções das plântulas (ápices caulinares, segmentos de raiz, de pecíolo e de folhas cotiledonares) e dos segmentos nodais seguiu um procedimento similar em todos os *taxa* testados. Assim, procedeu-se primeiro a um tratamento com etanol (90 % v/v) durante 1

min. seguido de transferência para uma solução de hipoclorito de cálcio a 7 % (p/v) contendo 2-3 gotas de *Tween-20*, durante 20 min. Após três lavagens em água bidestilada esterilizada, o material ficou em embebição durante a noite. De seguida procedeu-se a uma nova esterilização seguindo o mesmo procedimento com hipoclorito de cálcio e em condições assépticas, numa câmara de fluxo laminar.

Dependendo do tamanho, 3 a 10 sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com os macronutrientes reduzidos a metade da concentração e 3% de sacarose. O pH de todos os meios foi ajustado a 5,8 com KOH (0,1-1,0N) tendo-se em seguida adicionado 0,6 % de agar (Merck). Os meios foram autoclavados a 121°C (120 kPa) durante 20 min. No caso das culturas *in vitro* de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* o pH foi ajustado para valores de 6,0-6,2.

Após 30-45 dias de germinação *in vitro* das sementes, diferentes tipos de explantes, para estabelecimento das culturas em meios de crescimento *in vitro*, foram isolados a partir das plântulas, nomeadamente:

- 1 - ápices caulinares (até 0,5 cm);
- 2 - raiz (porções apicais 0,5-1 cm);
- 3 - folhas cotiledonares (limbo do primeiro par de folhas – segmentos foliares 0,5-1 cm);
- 4 - pecíolos do primeiro par de folhas (0,5-1 cm).

As culturas foram mantidas a 25°C, numa câmara de cultura sob um regime de iluminação diária (16h de luz) de 15-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, de radiação fotossinteticamente ativa, fornecida por lâmpadas de luz fria, fluorescente e branca.

Os explantes utilizados, os meios de cultura e os tipos de resposta morfológica verificados nos diferentes *taxa* foram diferentes. Nas secções seguintes são descritos os ensaios realizados com cada um dos *taxa* testados.

2.2.3. *Daucus carota* subsp. *halophilus*

2.2.3.1. Proliferação de meristemas

Os ápices caulinares das plântulas foram cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA (benziladenina) (0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2 mg/L) e 3% de sacarose. O meio base MS foi usado como controlo.

O número de rebentos caulinares, formados a partir dos explantes iniciais, foi registado após 4 semanas de cultura; o explante inicial (parte basal do rebento caulinar formado *in vitro* - *stump*) foi subcultivado por mais 4 semanas, nas mesmas condições de cultura, e feito novo registo desta segunda inoculação, também após 4 semanas.

Nas duas fases de cultura foi avaliado o número de rebentos caulinares em função da concentração de BA.

2.2.3.2. Enraizamento

Os rebentos isolados (2,0-3,0 cm) formados nas condições acima referidas foram induzidos a formar raiz em meio MS contendo 0,1 mg/L de IBA (ácido-3-indol butírico), ou no mesmo meio base (completo ou a ½ da concentração base) sem reguladores de crescimento.

O enraizamento foi avaliado após um mês e meio de cultura.

As plântulas enraizadas (comprimento da raiz de, pelo menos, 2 cm) foram retiradas dos tubos de ensaio, separadas e aclimatizadas num fitotrão (câmara de aclimação), em vasos contendo uma mistura 1:1 de terra de jardim e de areia, pelo menos 1,5 meses, antes de serem transferidas para condições de exterior, no Jardim Botânico ou no habitat natural.

2.2.3.3. Embriogénese somática

Segmentos de raiz, do primeiro par de folhas e pecíolos foram cultivados no mesmo meio base contendo 0,1; 0,5; 1 ou 2 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético). Após 2,5 meses de cultura ocorreu a formação de calo que foi repicado para o mesmo meio, onde

após 1,5 meses se formaram embriões somáticos. Para a conversão de embriões em plântulas, os embriões isolados no estado cotiledonar, ou grupos de embriões somáticos com pequenas porções de calos associados, foram transferidos para o meio base MS ou ½ meio MS base, durante 1,5 meses.

Algumas porções de calos embriogénicos foram de novo subcultivadas em meios de indução com 1mg/L de 2,4-D, para manutenção da capacidade embriogénica.

Dado o elevado número de embriões somáticos formados por explante e a ausência de sincronismo durante o seu desenvolvimento, tornou-se difícil quantificar o número de embriões somáticos produzidos.

Com o objetivo de quantificar o potencial embriogénico dos explantes procedeu-se a uma contagem do número de plantas obtidas por unidade de calo (g de peso fresco), seguindo as diferentes etapas, que se apresentam na Figura 5.

Assim, amostras de calos produzidos em porções peciulares em meio com 1 mg/L 2,4-D foram pesados decorridos 2,5 meses de cultura. O peso das amostras de calo e a respetiva média foram determinados em mg com ulterior conversão para g, sendo os resultados apresentados em número de plantas por g de calo. Os calos permaneceram neste meio durante 1,5 meses, sendo de seguida subcultivados em meio base MS, de forma a permitir o desenvolvimento dos embriões somáticos e a formação de plântulas, parâmetro registado após 3 meses de cultura.

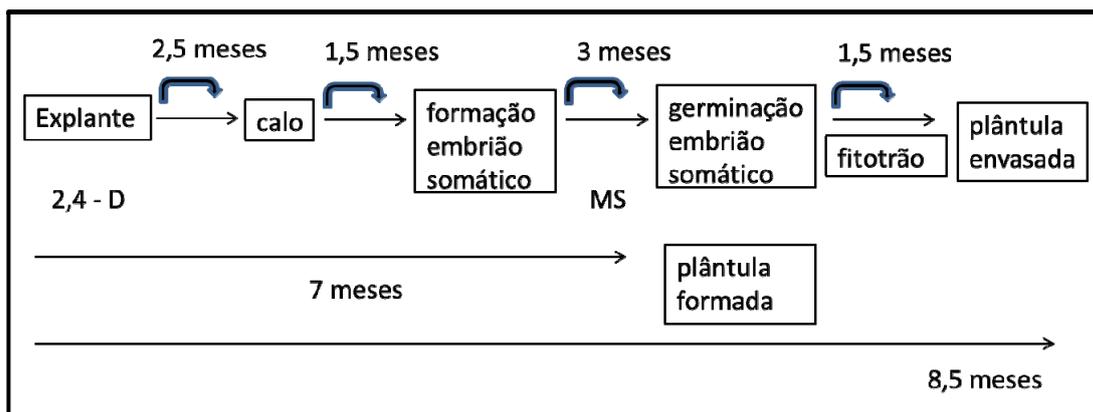


Figura 5: Etapas da micropropagação de *Daucus carota* subsp. *halophilus* por embriogénese somática.

As plântulas produzidas foram por fim deixadas nos tubos de ensaio, para prosseguir o alongamento da raiz durante 8 a 15 dias, sendo depois lavadas e deixadas apenas com água destilada.

As plântulas com um comprimento de, pelo menos de 10 cm, foram retiradas dos tubos de ensaio, separadas e aclimatizadas num fitotrão, em vasos contendo uma mistura 1:1 de terra de jardim e de areia, durante, pelo menos 1,5 meses, antes de serem transferidas para condições de exterior, no Jardim Botânico e/ou habitat natural.

2.2.3.4. Estudo da variabilidade *in vitro* - citometria de fluxo

As plantas obtidas *in vitro* foram analisadas por citometria de fluxo para detetar eventuais alterações na quantidade de DNA. As análises foram feitas em folhas de plantas obtidas por embriogénese somática após indução com 2,4-D e em folhas de plantas obtidas por proliferação de meristemas, induzida por BA, bem como nos diferentes explantes (segmentos das folhas cotiledonares e ápices caulinares, respetivamente). Como controlo a análise foi feita em folhas de plântulas resultantes da germinação *in vitro* de sementes de plantas silvestres de dois anos diferentes.

A metodologia de citometria de fluxo foi descrita na secção 2.1.3.

2.2.3.5. Floração *in vitro*

Os segmentos nodais das plantas silvestres foram esterilizados conforme procedimentos descritos na secção 2.2.2. e inoculados em meio base MS, suplementado com sacarose a 3% e com dois PGRs: 1,5 mg/L BA e 0,5 mg/L IAA (ácido-3-indol acético), considerado o meio de indução.

Posteriormente foram realizadas subculturas utilizando a porção basal dos explantes, a cada 30 dias, para estudar o efeito combinado e isolado de BA e IAA, nas mesmas concentrações e condições de cultura. Nestas mesmas experiências avaliámos também a evolução da morfologia das inflorescências, que se agruparam em 4 estádios: 1- umbela fechada; 2- umbela com pétalas visíveis verdes, mas ainda fechadas; 3- pétalas visíveis brancas, mas ainda fechadas; 4- umbela com flores abertas e os estames expostos) (ver secção 3.2.1.6.1.).

Numa fase ulterior, combinações de BA e IAA foram testadas na indução floral. Num primeiro ensaio (experiência 1) as culturas de material vegetal proveniente do meio

de indução foram subcultivadas no mesmo meio ou em meio base MS. Foram ainda testados o IAA e a BA isoladamente.

Num outro ensaio (experiência 2) avaliou-se o efeito isolado dos PGRs no processo da indução de floração. Assim, as culturas de material vegetal proveniente de meio MS foram repicadas para o mesmo meio e para meio com IAA; as amostras do meio BA foram repicadas para meio MS e meio IAA e as amostras do meio IAA para o mesmo meio e para meio com BA.

Em todos os ensaios, as concentrações de PGR, em conjunto ou isolados, foram as do meio de indução: 1,5 mg/L BA e 0,5 mg/L IAA. As culturas foram sempre analisadas ao fim de 4 semanas e os parâmetros usados para quantificar a resposta de indução floral foram o número de explantes com inflorescências e a percentagem dos quatro tipos morfológicos de inflorescências formados.

O mesmo processo de subcultura da porção basal dos explantes foi utilizado para o estudo do efeito na floração *in vitro* de outro PGR, o ácido giberélico (GA₃), nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mg/L e também de sacarose (6, 9 e 12%).

Num ensaio seguinte, as inflorescências em estados precoces de desenvolvimento foram transferidas para meio MS, de forma a tentar conseguir o seu desenvolvimento. Assim, após a indução *in vitro* da floração e o aparecimento dos primeiros botões florais, estes foram isolados e subcultivados em meio MS sem hormonas e mantidos até as flores completarem o desenvolvimento, fase em que se procedeu à observação e estudo da morfologia dos órgãos florais: flores, frutos, óvulos e anteras.

2.2.3.5.1. Estudos de pólen

Para caracterizar o pólen foram feitas observações após esmagamento das anteras em carmim acético e através de observação por microscopia de fluorescência usando o DAPI como fluorocromo. As observações de microscopia de fluorescência foram realizadas num microscópio.

Para avaliação do potencial germinativo dos grãos de pólen das flores formadas *in vitro* e das flores de plantas silvestres foram realizados ensaios de germinação, tendo sido previamente avaliada a viabilidade do pólen. Para tal, colheram-se flores de plantas formadas *in vitro* e de plantas silvestres, das quais se isolaram as anteras. As anteras foram

deixadas durante cerca de 24 h à temperatura ambiente, em caixas de Petri forradas com papel de alumínio, para abrirem e libertarem o pólen, o qual foi depois colocado a germinar. Utilizou-se um meio de germinação base constituído por H_3BO_3 (5mg/L), $CaClNO_3$ (15mg/L) e KNO_3 (10mg/L) (Jahier *et al.*, 1992), suplementado com sacarose. O pH foi ajustado a 5,8 e adicionou-se agar (0,8%). Foram preparados 7 meios distintos com 6 concentrações diferentes de sacarose (0, 3, 6, 9, 12 e 18 %). Depois de autoclavados, os meios foram distribuídos por caixas de Petri esterilizadas, numa câmara de fluxo laminar.

O pólen foi distribuído por 21 caixas de Petri, correspondentes aos 7 meios x 3 períodos de tempo, e decorridas 6, 12 e 24 h, foram retiradas aleatoriamente de cada caixa de Petri cinco amostras de material de dimensões semelhantes (0,25 cm²). As culturas foram periodicamente observadas à lupa para seguir a evolução do pólen.

2.2.3.5.2. Ensaio de polinização

Foram realizados testes de polinização manual *in vitro* e em umbelas de plantas silvestres.

Para isso, após a antese, as flores *in vitro* foram manipuladas em condições assépticas, numa câmara de fluxo laminar. Para a polinização artificial procedemos ao contato direto entre as flores no estágio 4, em que estavam abertas e com os estames expostos, e as flores no estágio 2, com pétalas enroladas e verdes. Pela análise anterior, realizada nas diferentes fases florais, observámos que no pólen proveniente de flores do estágio 2 se observavam os dois núcleos, germinativo e vegetativos (secção 3.2.1.6.4.). Estas foram previamente excisadas e mantidas numa caixa de Petri (9 cm de diâmetro) esterilizada.

Nas plantas silvestres os pistilos foram isolados de flores abertas e cultivados em caixas de Petri com agar a 1%. As anteras foram excisadas e mantidas numa caixa de Petri (9 cm de diâmetro) esterilizada e o pólen recolhido, após a antese das anteras; as flores abertas, foram sujeitas a polinização manual, em condições assépticas, numa câmara de fluxo laminar. A polinização foi concretizada em flores nas mesmas fases morfológicas adotadas para a polinização das flores produzidas *in vitro*.

Após a polinização manual e decorridos diferentes tempos - 0,5,1,2,4,8,15,20,24 h – os pistilos das flores produzidas *in vitro* e das flores silvestres, foram fixados em álcool a 70 % e deixados em conservação no frio até observação.

Para observação da germinação do tubo polínico os pistilos previamente fixados foram amolecidos numa solução 8N de hidróxido de sódio durante 1h. Após lavagem foram transferidos durante a noite para uma solução de azul de anilina 0,05% (p/v) preparada em 0,1 N de fosfato de potássio. Os pistilos foram de seguida colocados numa lâmina de microscópio com uma gota de glicerina, colocando-se uma lamela por cima e pressionando-se ligeiramente. As lâminas foram observadas num microscópio Nikon equipado com um sistema de epifluorescência, com filtro de excitação ultravioleta (transmissões de 330-380 nm) e um filtro de barreira de 420 nm, adotado da técnica utilizada por Martin (1971) em *Lycopersicon chilense*. As imagens foram captadas com uma máquina fotográfica Nikon Digital Sight DS-U1 e o software Act-2U.

2.2.3.5.3. Estudos histológicos e de SEM

Procedeu-se ao estudo da formação das flores *in vitro* em diferentes fases de cultura dos segmentos nodais. Para a realização de estudos histológicos, explantes cultivados em meio de indução floral durante 0, 4, 7, 11 e 15 dias foram fixados, durante 1,5 h, à temperatura ambiente, numa solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,8, contendo umas gotas de solução de cloreto de cálcio 0,01 M.

O material foi depois submetido a três lavagens de 15 min cada, no mesmo tampão, seguindo-se uma pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% (p/w) preparado no mesmo tampão, durante 2 h, à temperatura ambiente.

Após 3 lavagens de 15 min em água destilada, as amostras foram desidratadas numa série crescente de etanol (70, 80, 90, 95 e 100 %; v/v) e de seguida impregnadas usando três misturas sucessivas de etanol 100 % e resina (Spurr, 1969), nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2. As amostras permaneceram em cada mistura durante 2 horas e, por fim, em resina pura por uma noite. Após impregnação, os espécimes foram colocados em moldes de borracha com a resina, tendo permanecido numa estufa a 60°C, durante 24 horas, de

forma a polimerizar a resina. Nestes blocos foram realizados cortes semifinos (1-2 µm de espessura), utilizando um ultramicrotomo LKB Ultratome III equipado com facas de vidro.

Os cortes foram transferidos para uma gota de água destilada sobre uma lâmina de vidro e deixados a secar durante cerca de 24 horas a 60°C. Os cortes foram corados com uma solução de azul de toluidina (solução aquosa de azul toluidina 1 %, azur II 1 % e borato de sódio 1 % (Hall, 1978), durante 30 min, à temperatura ambiente e no escuro, tendo depois sido lavados duas vezes com água destilada e deixados a secar na estufa (60°C), antes de se proceder à sua observação. As observações foram efetuadas num microscópio ótico Nikon Eclipse E400, e as imagens captadas com uma máquina fotográfica Nikon Digital Sight DS-U1 e usando o software Act-2U.

Amostras de flores formadas *in vitro* após 4 semanas de cultura no meio de indução (1,5 mg/L e 0,5mg/L IAA) foram também processadas para SEM. O procedimento adotado para a análise por SEM foi o mesmo que descrito anteriormente até à desidratação em etanol a 100 %. Em seguida as amostras foram secas a 40°C num aparelho de secagem pelo método do ponto crítico num aparelho CPD 020 (Balzers), no qual o etanol é gradualmente substituído por CO₂. De seguida foram depositadas em porta-amostras, metalizadas e observadas ao microscópio, como descrito em 2.1.2, tendo sido captadas as imagens com interesse.

2.2.3.6. Análise estatística

Para cada tratamento um mínimo de 8 e um máximo de 25 explantes foram utilizados e as experiências foram realizadas três vezes. Para a análise estatística, os dados quantitativos expressos em percentagem foram inicialmente submetidos a transformação arcsen e as médias sujeitas a uma nova conversão e erro padrão para percentagens (Zar, 1996). A análise estatística foi realizada por ANOVA (Statistica 7) e as médias significativamente diferentes foram identificadas pelo teste de Tukey (P = 0,05).

2.2.4. *Distichoselinum tenuifolium*

2.2.4.1. Proliferação de meristemas

Ápices caulinares das plântulas obtidas por germinação de sementes foram cultivados em meio MS suplementado com 1 e 2 mg/L de BA e 3% de sacarose.

O número de rebentos formados a partir dos meristemas apicais foi registado após 4 semanas de cultura e o explante inicial (parte basal do rebento formado *in vitro* - *stump*) foi inoculado por mais 4 semanas, sob as mesmas condições de cultura, e feito novo registo desta segunda inoculação.

2.2.4.2. Enraizamento

Os rebentos isolados (2,0-3,0 cm) formados nas condições referidas foram induzidos a formar raiz em meio MS ou no mesmo meio base (completo ou ½ da concentração base) sem reguladores de crescimento.

O enraizamento foi avaliado após um mês e meio de cultura e as plântulas enraizadas (comprimento da raiz de pelo menos 2 cm) foram retiradas dos tubos de ensaio, separadas e transferidas para o fitotrã, em vasos contendo uma mistura 1:1 de terra de jardim e de areia, durante pelo menos 1,5 meses, antes de serem transferidas para condições de exterior, no Jardim Botânico.

2.2.4.3. Embriogénese somática

Porções (5 mm) do primeiro par de folhas das plântulas resultantes da germinação *in vitro* das sementes (segmentos foliares) de *D. tenuifolium* foram utilizadas para a indução de embriogénese somática, tendo sido cultivadas no mesmo meio base contendo 1 ou 2 mg/L de 2,4-D.

Os resultados foram registados após três meses de cultura.

Para a conversão de embriões em plântulas, os embriões isolados ou grupos de embriões somáticos com pequenas porções de calos, foram transferidos para o meio base MS ou ½ meio MS base, tendo sido avaliados após 3 meses.

Algumas porções de calos embriogênicos foram subdivididas e de novo cultivadas em meios de indução com 2,4-D, para manutenção de calos com capacidade embriogênica.

2.2.4.4. Organogênese

Segmentos foliares (5 mm) foram cultivados em meio MS suplementado com 1 ou 2 mg/L de BA e 3% de sacarose e foi registado o número de rebentos caulinares produzidos após 6 semanas de cultura.

2.2.5. *Angelica pachycarpa*

2.2.5.1. Proliferação de meristemas

Os ápices caulinares das plântulas (5 mm) foram cultivados em meio MS suplementado com 0,1, 1 e 2 mg/L M BA e 3% de sacarose. O meio base MS foi usado como controlo.

O número de rebentos formados a partir dos meristemas apicais foi registado após 4 semanas de cultura e o explante inicial (parte basal do rebento formado *in vitro* - *stump*) foi inoculado por mais 4 semanas, sob as mesmas condições de cultura, e feito novo registo desta segunda inoculação.

Novas repicagens nas mesmas condições de cultura permitiram multiplicar o número de rebentos foliares, registados em fotografias e tabelas.

2.2.5.2. Enraizamento

Os rebentos isolados (2,0-3,0 cm) formados nas condições referidas foram induzidos a formar raiz em meio MS contendo 0,1 mg/L indole-3-butírico (IBA).

O enraizamento foi avaliado após um mês e meio de cultura. As plântulas enraizadas (comprimento da raiz de pelo menos 2 cm) foram retiradas dos tubos de ensaio, separadas e transferidas para o fitotrão, em vasos contendo uma mistura 1:1 de terra de jardim e de areia, pelo menos durante 1,5 meses, antes de serem transferidas para condições de exterior, no Jardim Botânico.

2.2.5.3. Embriogénese somática

Segmentos foliares e de raiz (0,5-1,0 cm de comprimento) foram cultivados no meio base MS contendo 0,1 e 1 mg/L de 2,4-D.

Após 2,5 meses de cultura em meio com 2,4 D, ocorreu formação de calos e/ou de embriogénese somática. Repicagens mensais para meio de indução com 2,4-D, para manutenção das culturas.

Para a conversão de embriões em plântulas, os embriões somáticos ou grupos de embriões somáticos com pequenas porções de calos, foram transferidos durante 2 meses para o meio base MS ou ½ meio MS base, para prolongar a fase de crescimento dos embriões e conversão em plântulas para posterior envasamento.

Algumas porções de calos embriogénicos foram subdivididas e de novo cultivadas em meios de indução com 2,4-D, para manutenção da capacidade embriogénica.

As plântulas enraizadas (comprimento da raiz de pelo menos 2 cm) foram retiradas dos tubos de ensaio, separadas e transferidas para o fitotrão, em vasos contendo uma mistura 1:1 de terra de jardim e de areia, pelo menos durante 1,5 mês, antes de serem transferidas para condições de exterior, no Jardim Botânico e para o habitat natural, a ilha Berlenga.

2.2.6. *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*

2.2.6.1. Proliferação de meristemas

Os ápices caulinares das plântulas (5 mm) foram cultivados em meio MS suplementado com 0,1, 1 e 2 mg/L BA e 3% de sacarose. O meio base MS foi usado como controlo.

O número de rebentos formados a partir dos meristemas apicais foi registado após 4 semanas de cultura e o explante inicial (parte basal do rebento formado *in vitro* - *stump*) foi inoculado por mais 4 semanas, sob as mesmas condições de cultura, e feito novo registo desta segunda inoculação.

2.2.6.2. Enraizamento

Os rebentos isolados (2,0-3,0 cm) formados nas condições referidas foram induzidos a formar raiz em meio MS ou no mesmo meio base (completo ou ½ da concentração base) sem reguladores de crescimento.

Nas plântulas de *Seseli* o pH do meio de cultura foi ajustado para 6,2, valor acima do habitual 5,8, em que não se verificou resposta consistente.

Nas plântulas enraizadas (comprimento da raiz de pelo menos 2 cm) o enraizamento foi avaliado após um mês ou mês e meio de cultura.

As plântulas com um comprimento de, pelo menos de 6 cm, foram retiradas dos tubos de ensaio, separadas e aclimatizadas num fitotráo, em vasos contendo uma mistura 1:1 de terra de jardim e de areia, durante, pelo menos um mês e meio, antes de serem transferidas para condições de exterior, no Jardim Botânico.

2.2.6.3. Embriogénese somática

Segmentos foliares (0,5-1,0 cm de comprimento) foram cultivados no mesmo meio base contendo 0,1, 1 e 2 mg/L de 2,4-D. Decorridos 4 meses de cultura ocorreu a formação de calos, com repicagens mensais para o mesmo meio, tendo sido contabilizados no final deste período de cultura.

Os calos nodulares foram repicados para meios com igual composição de 2,4-D, tendo-se verificado a produção desfasada de embriões somáticos, consoante a concentração de 2,4-D; a avaliação da indução de embriões foi concretizada em todos os meios ao final de 4 meses de cultura em 2,4-D.

Para a conversão de embriões em plântulas, os embriões somáticos cotiledonares, com pequenas porções de calos, foram transferidos para o meio base MS.

Algumas porções de calos embriogénicos foram subdivididas e de novo cultivadas em meios com 2,4-D, para manutenção do potencial embriogénico dos calos.

Dada a diferente resposta *in vitro* das culturas em 2,4-D com diferentes concentrações, a quantificação do número de embriões e de plântulas foi feita apenas no meio com 0,1 mg/L 2,4-D, seguindo as diferentes etapas, que se apresentam na Figura 6.

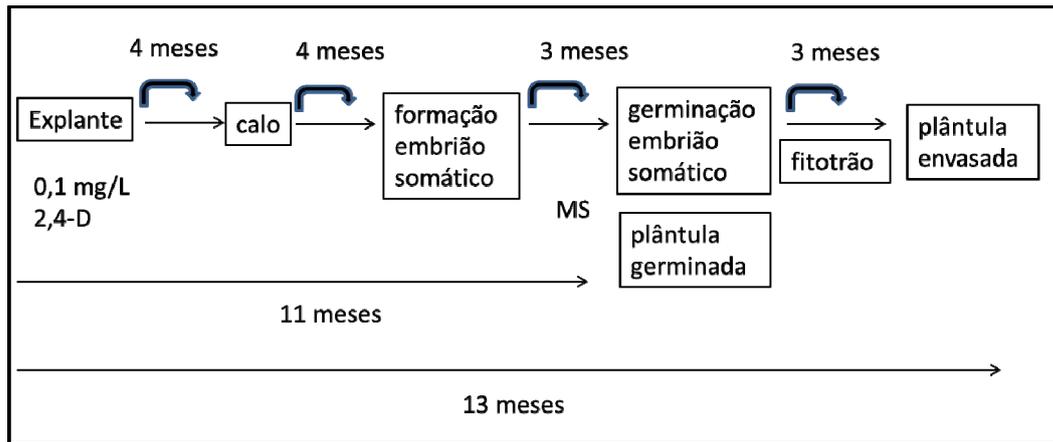


Figura 6: Etapas da micropropagação de *Seseli montanum subsp. peixotoanum* por embriogênese somática utilizando 0,1 mg/L de 2,4-D.

Assim, nas culturas com esta concentração (0,1 mg/L) avaliou-se o número de calos formados após 4 meses. De seguida, decorridos 4 meses no mesmo meio, determinou-se o número de embriões formados. Repicados para meios MS para germinação dos embriões e desenvolvimento em plântulas, contabilizou-se o número de plântulas formadas após 3 meses.

As plântulas foram por fim deixadas nos tubos de ensaio, para prosseguir o alongamento da raiz durante 8 a 15 dias, sendo depois lavadas e deixadas apenas com água destilada.

As plântulas com um comprimento de, pelo menos de 6 cm, foram retiradas dos tubos de ensaio, separadas e aclimatizadas num fitotrão, em vasos contendo uma mistura 1:1 de terra de jardim e de areia, durante, pelo menos mês e meio, antes de serem transferidas para condições de exterior, no Jardim Botânico.

2.2.7. *Eryngium duriaei*

2.2.7.1. Proliferação de meristemas

No caso de *Eryngium duriaei*, os ápices caulinares de plântulas com 30 dias, formadas *in vitro* a partir da germinação de embriões zigóticos (ver secção 2.1.5.4.), foram inoculados em meio base MS suplementado com 0,2 mg/L de BA para a multiplicação de rebentos caulinares, o que ocorreu após três meses de cultura neste meio.

À exceção de *Eryngium* foi ensaiada a organogénese nos *taxa* referidos, seguindo o protocolo de indução descrito para *Distichoselinum tenuifolium* (2.2.4.4.), não se tendo obtido resposta morfogenética em nenhum dos outros três *taxa*.

2.2.8. Cultura *ex situ*

Plantas dos *taxa* *Daucus*, *Angelica*, *Distichoselinum* e *Seseli* obtidas *in vitro* foram transferidas para aclimatização na câmara de cultura em vasos contendo uma mistura (1:1) de terra de jardim e areia (v/v). Numa primeira fase permaneceram em câmara climatizada (fitotrão) com proteção de cobertura plástica, retirada após uma semana. Após 2 a 4 meses nestas condições, foram transferidas para condições de exterior, sendo instaladas nos viveiros do Jardim Botânico ou na escola Médica do Jardim Botânico.

O número de plantas formadas foi contabilizado aquando do envasamento, na primeira fase de aclimação em estufa – fitotrão.

O número de plântulas a transferir para condições de exterior foi depois avaliado após 2 a 4 meses de cultura, dependendo da época do ano em que as plantas estavam em condições de aclimação no exterior.

2.2.9. Cultura *in situ*

As plantas resultantes da micropropagação de *Daucus carota* subsp. *halophilus* e de *Angelica pachycarpa* foram transferidas para o habitat natural, cabo de S. Vicente e ilha Berlenga, respetivamente.

Para avaliar a evolução do ciclo vegetativo e a produção de sementes, as plantas foram monitorizadas decorridos 3 meses e um ano, respetivamente, após a instalação *in situ*, nos mesmos locais de colheita das sementes em habitat natural.

2.3. EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E BIOATIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

2.3.1. Material vegetal e isolamento dos óleos essenciais

Foram estudados os óleos essenciais dos *taxa* *Daucus carota* subsp. *halophilus*, *Distichoselinum tenuifolium*, *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*, *Eryngium duriaei* e *Thapsia minor*, em plantas recolhidas de acordo com os dados da Tabela 6.

Após a colheita, o material vegetal foi seco ao ar e no escuro.

Os óleos foram caracterizados em termos químicos e em termos de atividade biológica, como será descrito nas secções seguintes.

Tabela 6: Dados da colheita do material vegetal para estudo dos óleos essenciais.

<i>Taxa</i>	Local de colheita	Tipo de material/época de colheita	Nº espécie voucher COI
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	Cabo de S. Vicente e Arrifana.	Floração: amostra 1 e amostra 3 - abril. Frutificação: amostra 2 e amostra 4 - junho.	Cabo S. Vicente COI00033066; Arrifana COI00033067.
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>gummifer</i>	Nazaré, Praia do Norte e S. Pedro de Moel.	Frutificação - julho.	Ver anexo I
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i>	Póvoa da Lomba e Meãs do Campo.	Frutificação - julho.	Ver anexo I
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>maximus</i>	Cartuxa e Montemor-o-Novo.	Frutificação - julho.	Ver anexo I
<i>Distichoselinum tenuifolium</i>	Moncarapacho (Faro) e Burgau (Lagos).	Floração: amostra 1- Moncarapacho e amostra 3- Burgau - julho. Frutificação: amostra 2- Moncarapacho e amostra 4- Burgau - agosto.	Moncarapacho COI00005906; Burgau COI00005905.
<i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	Trás-os-Montes, Bragança (Samil) e Alimonde.	Frutificação: amostra 1- Samil e amostra 2- Alimonde - setembro a novembro.	Alimonde- ACTavares 108 (COI); Samil- ACTavares 109 (COI)
<i>Eryngium duriaei</i>	Parque Nacional Gerês, Margaraça, Colcurinho, Serra da Estrela.	Parte aérea da planta, frutificada - setembro a novembro.	Ver anexo I
<i>Thapsia minor</i>	Douro Litoral (Queimadela) e Beira Litoral (Mucelão).	Parte aérea da planta, frutificada - amostra 1 – Queimadela e amostra 2 Mucelão - julho.	Ver anexo I

O material vegetal destinado à preparação de óleos essenciais foi submetido a uma secagem moderada, por acondicionamento em local arejado, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante cinco a sete dias, até atingir teor de humidade entre 10 e 15%. Foi cuidadosamente mondado a fim de eliminar matérias estranhas e, se justificável, rejeitar partes lenhosas ou separar sub-amostras de distintos órgãos da planta.

Os óleos essenciais foram isolados por hidrodestilação durante 3h utilizando um aparelho de tipo Clevenger, de acordo com o procedimento descrito na Farmacopeia Europeia (Council of Europe, 1997). Os óleos foram armazenados em frascos escurecidos, a 4° C, para os ensaios ulteriores.

2.3.2. Observação de estruturas secretoras

Para a observação da anatomia das estruturas secretoras, segmentos do pedicelo de flores de plântulas propagadas *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus* foram fixados numa solução aceto-alcool formalina (5:5:90 v/v), embebidos em parafina e as secções (10-12 mm) foram coradas pelo método da safranina verde luz, descrito por Cruz *et al.* (1990).

2.3.3. Análise dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram analisados pela combinação de técnicas de cromatografia gás-líquido de alta resolução (CGL) e de cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa (CGL-EM).

A CGL analítica foi realizada num cromatógrafo Hewlett Packard 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA USA), equipado com um só injetor e amostrador automático e dois detetores de ionização de chama (DIC). O sistema de injeção foi adaptado para injeção simultânea da amostra em duas colunas capilares, com fases estacionárias de diferentes polaridades. Foram usadas colunas de polidimetilsiloxano com 30 m x 0,20 mm e espessura de filme de 0,20 µm (Supelco SPB-1) e de polietilenoglicol com 30m x 0,20 mm e espessura de filme de 0,20 µm (SupelcoWax 10). Toda a operação do sistema bem como a aquisição e processamento de dados foram realizados por via remota com HP GC

ChemStation versão A.05.04. As condições analíticas usadas foram: temperatura do forno programada de 70 a 220°C, com incremento de 3°C.min⁻¹, seguido de 15 minutos em condições isotérmicas a 220°C; temperatura do injetor e detetores de 250°C; como fase móvel (gás transportador) foi usado hélio em fluxo de 30cm.s⁻¹; injeção em modo *split* com relação de repartição do fluxo de 1:40.

Para as análises por CGL-EM foram usados cromatógrafos Hewlett Packard 6890 ou Agilent associados a detetores seletivos de massa Hewlett Packard 5973 ou Agilent 5973N equipados, respetivamente, com coluna capilar de polidimetilsiloxano 30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25 µm (Hewlett Packard, HP1) e coluna capilar de polietilenoglicol com 30 m x 0,25 mm e espessura de filme 0,25 µm (Agilent, DB-Wax), e também operados por via remota por software Enhanced ChemStation, Hewlett Packard ou Agilent. As condições analíticas utilizadas foram: temperatura do forno programada de 70 a 220°C, com incrementos de 3°C.min⁻¹, seguidos de 15 minutos em condições isotérmicas a 220°C; temperatura do injetor 250°C; como fase móvel foi usado hélio em fluxo de 30 cm.s⁻¹; injeção em modo *split* com relação de repartição do fluxo de 1:40; temperatura das interfaces 250°C; temperatura das fontes de ionização 230°C; energia de ionização 70 eV; corrente de ionização 0,06 mA; varrimento de massas 35 - 350u.

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais resultou da análise combinada de pares de índices de retenção, calculados em fases estacionárias de polaridades distintas e comparados com os de compostos de referência e da interpretação ou comparação de espectros de massa.

Os índices de retenção foram calculados por interpolação linear relativamente aos tempos de retenção de *n*-alcanos (série homóloga) nas colunas SPB-1 e SPB-Wax.

Para o cálculo e processamento de toda a informação relativa a índices de retenção foram utilizadas as rotinas informáticas RetChron 3.15 (Cavaleiro, 2001). O processamento fundamenta-se na definição de todas as combinações de emparelhamento entre os índices de retenção dos picos cromatográficos resolvidos na coluna apolar e os índices de retenção dos picos cromatográficos resolvidos na coluna polar, com subsequente verificação de cada par por pesquisa automática numa base de índices de retenção de compostos de referência, determinados nas mesmas condições experimentais. Do processamento resulta a sinalização dos pares de índices de retenção compatíveis com os

dos compostos integrados na base de dados que, hipoteticamente, poderá indicar a respetiva presença na amostra em análise.

De forma similar, usando as rotinas HP GC ChemStation versão A.05.04, os espectros de massa adquiridos em CGL-EM foram confrontados com os espectros de referência incluídos na base de espectros do laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia de Coimbra e nas bases Wiley275/NIST. Sempre que necessário foram usadas outras fontes de informação da literatura científica e atlas de espectros (Adams, 1995; Joulain *et al.*, 1998).

As indicações de identidade resultantes da análise espectral foram integradas com as hipóteses de identidades determinadas pelos índices de retenção cromatográfica.

De acordo com esta metodologia a identificação de cada composto resultou da conjugação das informações específicas de comportamento de retenção cromatográfica sobre duas colunas com fases estacionárias de polaridade distinta e de padrão de fragmentação por impacto eletrónico a 70 eV revelado no espectro de massa.

A quantificação de cada composto foi determinada com base nas áreas dos picos cromatográficos obtidos por CGL com detetores de ionização de chama. Face aos objetivos do nosso trabalho foi determinada a concentração relativa, pelo método da normalização sem qualquer correção de resposta dos detetores de ionização de chama. Sempre que possível a quantificação foi efetuada a partir dos cromatogramas obtidos com fase estacionária de polidimetilsiloxano. Para os compostos que coeluem nessa fase estacionária a quantificação foi efetuada a partir dos cromatogramas obtidos com fase estacionária de polietilenoglicol.

2.3.4. Atividade antifúngica

A atividade antifúngica dos óleos essenciais e de alguns dos seus compostos principais foi avaliada pelo método das macrodiluições contra diferentes estirpes de fungos (de coleção e clínicas) responsáveis por candidíases, infeções respiratórias e dérmicas, de acordo com os protocolos da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) M27-A3 (CLSI, 2008a), M27-S3 (CLSI, 2008b) e M38-A2 (CLSI, 2008c) para leveduras e fungos filamentosos, respetivamente.

Foram determinadas a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima letal (CML), sendo estas as concentrações mínimas de óleo essencial que inibem o crescimento dos fungos ou lhes são letais, respetivamente.

As estirpes utilizadas foram as seguintes:

- 6 estirpes de leveduras (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*)
- 5 estirpes de dermatófitos (*Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*)
- 3 estirpes de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*).

As diversas diluições de cada óleo essencial, ou dos seus compostos principais, foram preparadas em DMSO (dimetil sulfóxido), de modo a obter concentrações finais de 0,08 a 20µL/mL. A concentração final de DMSO nunca excedeu 2 %. Culturas recentes de cada estirpe foram utilizadas para preparar a suspensão celular ajustada para $1-2 \times 10^3$ células/mL para leveduras e $1-2 \times 10^4$ células/mL para fungos filamentosos. A concentração de células foi confirmada pela contagem de viáveis em meio Sabouraud (*Sabouraud Dextrose Agar*). Os tubos de ensaio foram incubados aerobicamente a 35°C por 48 h/72 h (*Candida* spp. e *Aspergillus* spp./*Cryptococcus neoformans*) e a 30°C por 7 dias (dermatófitos). Terminado o tempo de incubação procedeu-se à leitura da CMI.

Para avaliar a CML, plaquearam-se em meio Sabouraud 20 µL de cada tubo em que não se registou crescimento (após a leitura da CMI). Foram depois incubadas por 48 h a 35°C (*Candida* spp. e *Aspergillus* spp.), 72 h para *Cryptococcus neoformans* e 7 dias a 30°C (dermatófitos). Além disso, dois antifúngicos de referência, anfotericina B (Fluka) e fluconazol (Pfizer) foram utilizados para controlar a sensibilidade dos microrganismos testados. Todos os testes foram realizados em meio RPMI. Para cada estirpe testada, as condições de crescimento e a esterilidade do meio foram testadas com tubos de controlo. A inocuidade do DMSO também foi verificada na maior concentração testada. Todas as experiências foram realizadas em triplicado e repetidas se os resultados diferiam.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS



3.1. TAXONOMIA, FENOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS ENDEMISMOS IBÉRICOS DAS APIACEAE PORTUGUESAS

3.1.1. Descrições, caracterização e localização de habitats

A Tabela 1 (secção de material e métodos) apresenta a listagem dos 14 *taxa* endémicos de Apiaceae ibéricas com ocorrência em Portugal Continental, dos quais foi possível identificar, localizar e recolher sementes e/ou plantas de 13 (Fig. 7). A espécie *Bunium macuca* subsp. *macuca* não foi localizada, apesar de muitas saídas de campo terem sido realizadas na região de Setúbal e na Serra da Arrábida, locais indicados na literatura como aqueles onde este *taxon* tinha sido referida (Tabela 7).

Com base na documentação consultada, apenas *Angelica pachycarpa* é considerada uma espécie rara e prioritária para conservação (Queiroga *et al.*, 2008), restrita à ilha Berlenga, pelo que o *taxon* foi incluído no grupo 1.

Como resultado das consultas de Floras, do estudo de exemplares de herbário e das análises de campo, apresenta-se uma descrição resumida dos *taxa* e respetivos habitats. Muitos dados baseiam-se, particularmente, na Flora Ibérica (Castroviejo *et al.*, 2003) e correspondem aos caracteres morfológicos fundamentais para a identificação dos *taxa*.

De acordo com a Flora Ibérica, está indicada em numeração romana a época (meses) de frutificação dos *taxa*. As províncias referentes à localização dos *taxa* estão indicadas pelas siglas correspondentes (ver abreviaturas); as províncias onde foram colhidos os *taxa* estão indicadas a **negrito**.

Os espécimes de herbário do material herborizado estão depositados no Herbário COI e discriminados no anexo I.

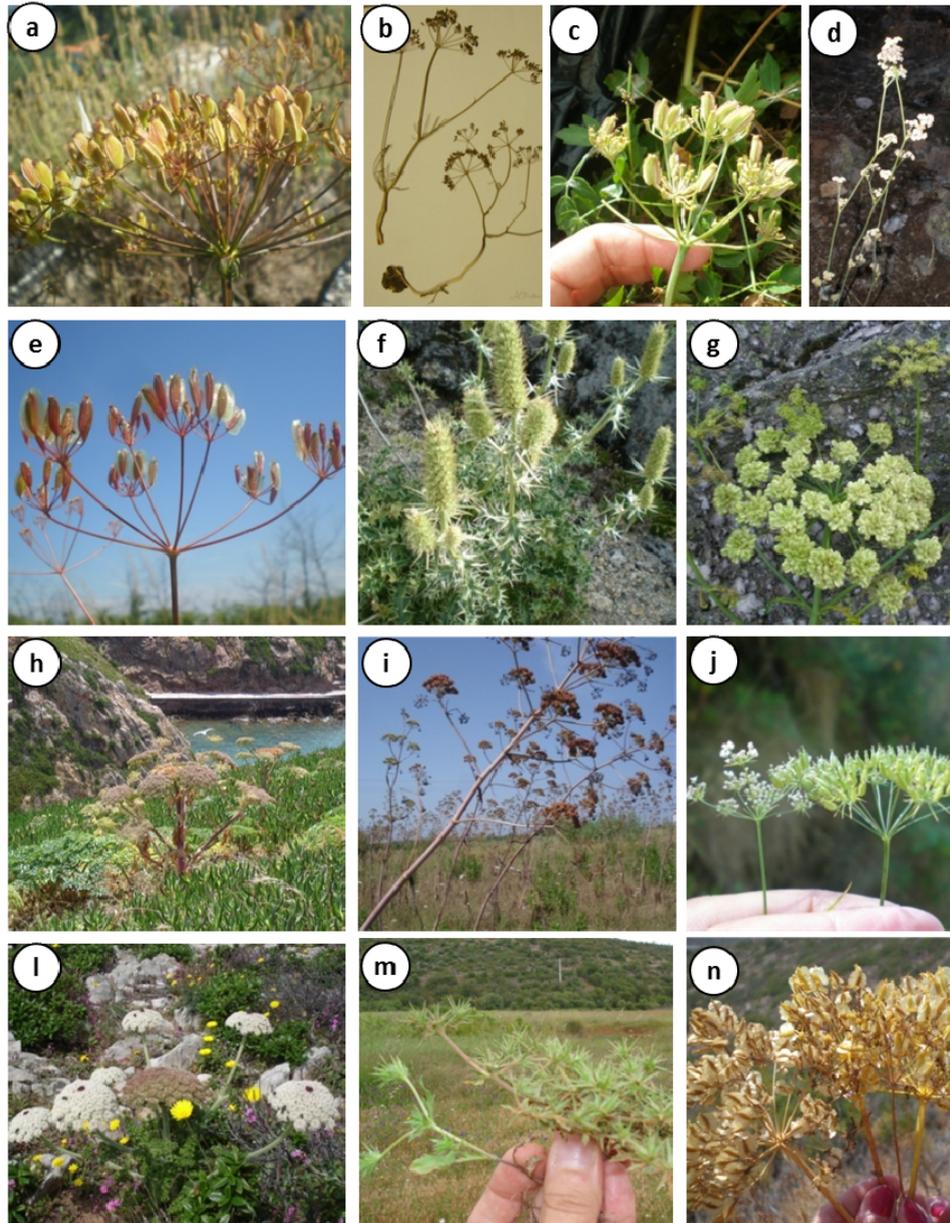


Figura 7: Endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas. a) *Ferulago capillaris* (Link ex Spreng.) Cout. (leito seco do Rio Homem-Serra do Gerês-Mi); b) *Conopodium majus* (Gouan) Loret subsp. *marizianum* (Samp.) López-Udías & Mateo (Montemuro-DL) A.C. Tavares, 46 (COI); c) *Laserpitium eliasii* subsp. *thalictrifolium* (Samp.) P. Monts. (leito seco do Rio Homem-Serra do Gerês-Mi); d) *Seseli montanum* L. subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Láinz (Samil, Bragança-TM); e) *Thapsia minor* Hoffmanns. & Link. Queimadela (DL); f) *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss. subsp. *duriaei* (Cântaro Raso, Serra da Estrela-BA); g) *Angelica major* Lag., (Senhora da Pedra, Serra da Estrela-BA); h) *Angelica pachycarpa* Lange. (Ilha Berlenga-E); i) *Ferula communis* subsp. *catalaunica* (Pau ex C. Vicioso) (Óbidos-BL); j) *Conopodium subcarneum* (Boiss. & Reut.) Boiss. (Aldeia da Pena, S. Pedro do Sul, Serra da Arada-BA); l) *Daucus carota* subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas (Cabo S. Vicente-Ag); m) *Eryngium galioides* Lam. (Nave do Barão, Loulé-Ag); n) *Distichoselinum tenuifolium* (Lag.) García Martín & Silvestre. (Moncarapacho, Olhão-Ag).

Tabela 7: Locais onde foram detetados e recolhidos os diferentes *taxa*.

<i>Taxa</i>	Províncias	Crítérios de prioridade de conservação*	Localidades	Nº de saídas de campo
1. <i>Eryngium galioides</i>	Ag AAI BA BAI BB (TM).	Grupo 3	Nave do Barão	1
2.1. <i>Eryngium duriaei</i> subsp. <i>duriaei</i>	BA BL Mi TM.	Grupo 2	Serra da Estrela	2
2.2. <i>Eryngium duriaei</i> subsp. <i>juresianum</i>	Mi BL DL.	Grupo 2	Serra da Freita Açor Gerês Mata da Margarça	1 4 2 1
3. <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	Costa SW, Ag BAI E.	Grupo 1	Cabo S. Vicente Arrifana Cabo Sardão Cabo Carvoeiro Cabo da Roca Cabo Espichel	10 5 5 4 3 3
4. <i>Bunium macuca</i> subsp. <i>macuca</i>	AAI.	Grupo 1	Não encontrada	12
5. <i>Conopodium subcarneum</i>	BA (BB) BL(E) TM.	Grupo 2	Serra da Arada Serra da Nogueira, Bragança	1 1
6. <i>Conopodium majus</i> subsp. <i>marizianum</i>	AAI Ag BA BAI BB BL DL E Mi (R) TM.	Grupo 3	Tabuaço Serra da Freita Lousã Montemuro	1 1 2 2
7. <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	TM.	Grupo 1	Alimonde Samil	5 5
8. <i>Angelica major</i>	BA BB Mi TM.	Grupo 2	Serra da Estrela	4
9. <i>Angelica pachycarpa</i>	Berlenga Islands-E.	Grupo 1	Berlenga	4
10. <i>Ferula communis</i> subsp. <i>catalaunica</i>	AAI Ag BA BAI BB BL E R TM.	Grupo 3	Guarda Évora Loulé Óbidos	2 2 1 2
11. <i>Ferulago capillaris</i>	BA Mi TM.	Grupo 2	Celorico da Beira Guarda Gerês	1 3 2
12. <i>Distichoselinum tenuifolium</i>	Ag.	Grupo 1	Moncarapacho Espargal Burgau	7 1 2
13. <i>Laserpitium eliasii</i> subsp. <i>thalictrifolium</i>	Mi TM (BA).	Grupo 2	Gerês Bragança	3 1
14. <i>Thapsia minor</i>	AAI Ag BA BAI BB BL DL E Mi TM.	Grupo 3	Mucelão Queimadela Piódão, Açor	1 3 1
TOTAL			36	121

*Prioridade de conservação: grupo 1 - presente apenas numa província portuguesa ou exclusivamente em Portugal; grupo 2 - presente em 2 a 4 províncias portuguesas; grupo 3 - presente em 5 ou mais províncias portuguesas.

1. *Eryngium galioides* Lam.

Erva anual, raramente bienal, com 2-30 cm de altura, procumbente. Folha basal 2-8 x 0,2-1 cm, oblongo-lanceolada a linear-lanceolada, dentada a inciso-serrilhada. Capítulos sésseis, 0,5-1 cm de diâmetro, subglobosa. Fruto elipsóide.

Lugares pantanosos ou sazonalmente encharcados, com frequência em substrato arenoso, limoso; 0-900 m. VI-IX. AAL **Ag** BA BAl BB (TM).

2. *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss.

Erva perene, (20-)30-150(-180) cm de altura, ereta. Folhas coreáceas a membranáceas, as basais 8-25(-45) x 2-5(-7) cm, linear-lanceoladas, oblongo-obovadas a espatuladas, com a margem denticulada-espinosas a pinatífido-espinescentes. Capítulos pedunculados (pedúnculo 3-5 cm de comprimento), o terminal com 3-8(-10) x 1,5-3 cm, cilíndrico-elipsóides a elipsóide. Frutos 3-4 x 2,5-3 mm.

Cascalheiras e pedregais siliciosos, clareiras de matagais (ou matas), menos frequentemente em carvalhais abertos. 30-1.700 m. VII-IX. **BA BL Mi** TM; também localizado em **DL**.

As diferentes populações estudadas deste *taxon* apresentam variações morfológicas, principalmente nas folhas basais, como ilustram as Figuras 11a e 11b, apresentadas na secção 3.1.3.2.1. Assim, duas subespécies são consideradas e podem ser distinguidas com a ajuda da seguinte chave, elaborada para o efeito:

1. Erva até 60(-80) cm de altura; capítulos até 3(-3,5) cm de comprimento, cilíndrico-elipsóide a elipsóide; brácteas até 3,5 cm de comprimento, fortemente cuspidatas; folhas coreáceas, as basais pecioladas, linear-lanceoladas a oblongo-obovadas, pinatífido-dentadas; as caulinares sésseis a ligeiramente pecioladas.....**subsp. *duriaei***. Erva até 100(-180) cm de altura; capítulos até 8(-10) cm de comprimento, oblongo-cilíndricos a cilíndrico-elipsóides; brácteas até 2,5 cm de comprimento, suavemente cuspidatas; folhas membranáceas, as basais quase sésseis, espatuladas, denticuladas para inciso-dentadas; as caulinares amplexicaules.....**subsp. *juresianum***.

Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss. subsp. *duriaei

Fissuras de rochas graníticas, em encostas. 1.700 m. VII-IX. **BA**.

***Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss. subsp. *juresianum* (M. Laínz) M. Laínz**

Bordas de florestas de carvalhos e encostas húmidas, principalmente em xisto. 700-1.000 m. VII-X. **BLMi** TM. Também localizado em **DL** (ver tabela da localização dos *taxa*).

3. *Daucus carota* L.

Erva bienal ou perene, (3 -)10-170(-200) cm de altura, glabra, procumbente hispida. Folhas basais (1)2-4(-5) penatissetas, a raramente divididas. Umbela côncava, plana ou convexa, com um número variável de raios, pedunculada, raramente subséssil. Flor central estéril e purpúrea presente ou ausente. Pétalas 0,5-3,5 mm, cordiformes a ovadas, brancas, raramente branco-amareladas, por vezes tingidas de púrpura, brancas ou amarelas em seco. Frutos (1,5)2-4 mm de comprimento, elipsóide a subgloboso, com os espinhos sobre as cristas secundárias mais largos ou mais curtos do que a largura do mericarpo.

Prados, florestas abertas, penhascos rochosos e costa, praias de areia e zonas ruderais; 0-1.800 m. III-IX. Todas as províncias.

Espécie extremamente polimórfica dividida em várias subespécies, das quais cinco são reconhecidas em Portugal: subsp. *carota*; subsp. *gummifer*; subsp. *halophilus*; subsp. *maximus* e subsp. *sativus*, sendo esta última cultivada - a cenoura.

Podem ser identificadas pela seguinte chave resumo dos caracteres essenciais e adaptada com base na Flora Ibérica:

1. Últimos segmentos das brácteas sublineares, os raios da umbela arqueado-convergentes na floração; cristas secundárias do mericarpo com espinhos finos, pouco dilatados na base.....**2**
- Últimos segmentos das brácteas ovados, lanceolados a linear-lanceolados; raios e umbelas arqueadas na altura da floração e não convergentes; cristas secundárias do mericarpo com espinhos grossos e dilatados na base.....**4**
2. Plantas cultivadas, com uma raiz principal carnuda, geralmente laranja ou amarela para púrpura, raramente esbranquiçada.....**subsp. *sativus*.**
- Plantas selvagens, com uma raiz principal cilíndrica, fibrosa, esbranquiçada.....**3**

3. Umbelas na antese com (1,5) 3-7 (-11) cm de diâmetro; brácteas 7-9, quase tão longas quanto os raios da umbela.....**subsp. carota.**
Umbelas na antese com 12-23 cm de diâmetro; brácteas 10-13, mais curtas do que os raios da umbela.....**subsp. maximus.**
4. Segmentos das brácteas linear-lanceolados a linear, ligeiramente mucronados; cristas secundárias do mericarpo com espinhos antorsos, grossos ou patentes.....**subsp. gummifer.**
Segmentos das brácteas ovadas a ovado-elípticas, pouco mucronados; cristas secundárias do mericarpo com espinhos patentes.....**subsp. halophilus.**

Daucus carota L. subsp. carota

Prados, florestas abertas. 0-1.800 m. IV-X. Todas as províncias.

Daucus carota L. subsp. gummifer (Syme) Hook.f. & G. Martens

Rochosos e penhascos da costa, solo arenoso. 0-50 m. IV-IX. (BA) **BL DL E.**

Daucus carota subsp. halophilus (Brot.) A. Pujadas

Rochas e falésias costeiras, praias e dunas fósseis. 10-50 m. IV-VI. **Ag BAI E.**

Daucus carota L. subsp. *maximus* (Desf.) Ball

Florestas abertas. 0-1.400 m. IV-VIII. **AAL Ag (BA).**

Daucus carota L. subsp. sativus (Hoffm.) Schübl. & G. Martens

Cultivada. 0-1.500 m. IV-VI.

4. *Bunium macuca* Boiss. subsp. *macuca*

Erva perene. Caule 5-35 cm de altura, fino, ramificado, com ramos em ângulo agudo. Folhas basais longas-pecioladas, deltóides, 2-3-penatissetas, segmentos lineares espatulados. Umbelas (1)2-6 cm de diâmetro, com 5-8(10) raios. Pétalas 0,8-1 mm, brancas ou ligeiramente rosadas. Frutos 2-3 mm comprimento.

Orlas da floresta e terrenos rochosos ou pedregosos. 500-1.700 m. V-VIII.

Conforme referido, as tentativas para encontrar este *taxon*, tanto em Setúbal, como noutras regiões da Estremadura e do Alto Alentejo foram infrutíferas.

5. *Conopodium subcarneum* (Boiss. & Reut.) Boiss.

Erva perene, (10-) 20-60 cm (-75) de altura, provida de tubérculo subterrâneo. Folhas basais pecioladas, 3-penatissetas, segmentos pinados, mucronadas, glabras. Pétalas 1-1,5 mm, geralmente marginalizadas ou não, brancas, rosadas. Frutos 2,8-4 de mm de comprimento.

Bosques, pastos, lugares rochosos e arenosos; 200-1.700 m.V-IX. **BA** (BB) BL (E) **TM.**

6. *Conopodium majus* (Gouan) Loret subsp. *marizianum* (Samp.) López-Udias & Mateo

Erva perene, 15-60 cm de altura, com um tubérculo subgloboso, 1,3-2,5 cm de diâmetro. Folhas basais longas-pecioladas, 2(-3) penatissetas, segmentos 3-6 lobulados, ovados a suborbicular. Umbelas 4-7 cm de diâmetro, com 6-14 raios, 2-4,5 cm de comprimento. Pétalas brancas, por vezes rosadas na antese. Pedúnculos 1,5-6 cm de comprimento, glabros. Frutos 3-5 mm de comprimento.

Bosques, lugares rochosos e arenosos, geralmente graníticos; 200-1.700 m. IV-VIII. AAL, Ag BA BAl BB **BL** E Mi (R) **TM.**

7. *Seseli montanum* L. subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Laínz

Erva perene, com um caule ± vertical, (10-)35-70(-80) cm de altura, ereto. Folhas basais pecioladas, 1,8-12 x 0,8-3 cm, 2-penatissetas, segmentos lineares, glabras ou papilosas; folhas caulinares progressivamente mais curtas e menos divididas. Umbelas terminais com raios 5-9, 3-10 mm de comprimento; raios das umbelas secundárias 0,5-1 (-1,5) mm de comprimento. Pétalas 1-1,4 mm, inteiras, geralmente brancas ou ligeiramente tingida de púrpura. Frutos 1,8-3,5(4,5) x 1,1-1,5 mm.

Bosques, solos ultrabásicos; 750 m. VIII-X. **TM.**

8. *Angelica major* Lag.

Erva, bienal, raramente perene, com 40-120 cm de altura. Folhas 20-55 x 30-75 cm, de um verde mate, mais claro na parte inferior; as basais sempre 3-penatissetas, ovadas, lobos laterais, sésseis, dentados ou crenato-mucronados. Pétalas brancas a amareladas. Frutos 4-9 x 5,5-6,5 milímetros.

Bosques, ladeiras pedregosas, mais ou menos recobertas por urzes; silícula. 650-1.700 m. VI-IX. **BA BB Mi TM.**

9. *Angelica pachycarpa* Lange

Erva perene, robusta, até 100 cm de altura. Folhas 18-45 x 18-45 cm, as basais sempre 3-penatisetas, de um verde-claro, lustroso, subcarnosas, glabras. Umbelas robustas, de pedúnculo curto, com 15-25 raios. Pétalas amareladas ou de um amarelo-esverdeado. Frutos 4,5-11 x 3,5-9 mm.

Alcantilados frente ao mar, sempre em zonas sob influência marítima; 0-50(90) m. V-VI. **E.**

10. *Ferula communis* L. subsp. *catalaunica* (Pau ex Vicioso) Sánchez-Cuxart & Berna

Erva, robusta perene, até (100)160-250 cm (330) de altura. Folhas 3-4(6) penatisetas, as basais até 100 cm, glabras; as caulinares progressivamente de menor tamanho., sempre lineares. Umbelas sésseis ou com um pedúnculo curto, 5-35 mm de comprimento, com (6)12-26(50) raios, (13)22-45(120) mm de comprimento. Frutos fortemente comprimidos dorsalmente, obovados a elípticos.

Bosques, pastagens, ao longo das estradas, por vezes em zonas cultivadas; 0-1.600 m. V-VII. **AAL Ag BA BI BB B E R TM.**

11. *Ferulago capillaris* (Link ex Spreng.) Cout.

Erva perene, até 60-160 cm de altura, ereta. Folhas basais até 60 x 35 cm, 4-6-penatisetas, segmentos lineares ou linear-lanceolados, mucronados; folhas superiores 2-4 penatisetas, gradualmente reduzidas à bainha. Umbelas terminais de cada ramo com flores hermafroditas, as laterais, quando presentes, com flores unissexuadas; umbela principal robusta, pedunculada. Pétalas amarelas. Fruto 19/10 x 5-9,5 mm.

Bosques degradados; silícula. (200)900-1.400 m. VII-IX. **BA Mi TM.**

12. *Distichoselinum tenuifolium* (Lag.) García-Martín & Silvestre

Erva perene, totalmente glabra, até 130 cm de altura. Folhas basais dísticas até 55 cm de comprimento, (4)5-penatisetas, ovaladas, espessas; lobos linear a linear-

lanceolados, mucronados. Folhas caulinares muito reduzidas, 3 penatissetas, as superiores reduzidas à bainha. Pétalas inteiras, inflexas, amarelas. Frutos 8-18x 2-4 mm (sem asas).

Bosques degradados, encostas rochosas, em calcários; 0-1.300 m. V-VIII. Ag.

13. *Laserpitium eliasii* Sennen & Pau subsp. *thalictrifolium* (Samp.) P. Mont

Erva, robusta, perene, 70-130 cm altura. Caules grossos e estriados. Folhas 40-80 cm, as basais de menor tamanho 3(-4) penatissetas, com divisão terminal de última ordem trilobada - quase trifoliada, de lóbulo central cuneado; as caulinares abundantes. Umbela principal com 12-20(-30) raios, (3-)4-6(-9) cm de comprimento. Pétalas brancas, frequentemente com manchas rosadas. Frutos (6-)7-8(-11) mm de comprimento.

Orlas de florestas de carvalhos, solos siliciosos; (400) 600-1.100(-1.500) m. VI-IX (BA) Mi TM.

14. *Thapsia minor* Hoffmanns. & Link

Erva perene, de 33-93 cm. Caules delgados, de 1,5-5,5(8) mm de diâmetro na base. Folhas basais com bainha de 4-11(18) mm de largura, pouco desenvolvida, limbo 8-16 x 7-15 cm, de contorno triangular, às vezes deltoide, (2)3-pinatisseto. Umbelas com 4-10 (12) raios, 4-9 cm de comprimento, sub-iguais ou desiguais. Pétalas obovadas, amarelas. Frutos 9-12 x 6-10 mm, elípticos; asas de (1,5)3-4 mm de largura, amareladas.

Pinhal, carvalhais, geralmente em solos ácidos; 200-1.300 m. IV-VII. AAL Ag BA BAI BB BL DL E Mi TM.

3.1.2. Conservação de sementes *ex situ*

A conservação *ex situ* de sementes foi realizada no banco de sementes do Jardim Botânico de Coimbra para 11 destes 13 *taxa*. O respetivo número de código no *Index Seminum* do JBUC é apresentado na Tabela 8, estando as sementes disponíveis para fins científicos *on-line*, no *website* do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (<http://www.uc.pt/jardimbotanico>).

Tabela 8: Sementes dos endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas e respetivos números do *Index Seminum* COI.

<i>Taxa</i>	Ano de inclusão no banco de sementes (*novos taxa para o <i>Index Seminum</i>)	Número de código do <i>Index Seminum</i>
1. <i>Eryngium galioides</i>	Não incluída.	-
2. <i>Eryngium duriaei</i>	Antes e depois de 2005.	1882 PT0COI
3. <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	2005*	1754 PT0COI
4. <i>Bunium macuca</i> subsp. <i>macuca</i>	Não localizada em Portugal.	-
5. <i>Conopodium subcarneum</i>	Não incluída.	-
6. <i>Conopodium majus</i> subsp. <i>marizianum</i>	Antes e depois de 2005.	1266 PT0COI
7. <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	2008*	2100 PT0COI
8. <i>Angelica major</i>	Antes e depois de 2005.	1252 PT0COI
9. <i>Angelica pachycarpa</i>	2006*	2059 PT0COI
10. <i>Ferula communis</i> subsp. <i>catalaunica</i>	Antes e depois de 2005.	1277 PT0COI
11. <i>Ferulago capillaris</i>	Antes e depois de 2005.	1756 PT0COI
12. <i>Distichoselinum tenuifolium</i>	2006*	2081 PT0COI
13. <i>Laserpitium eliasii</i> subsp. <i>thalictrifolium</i>	2010*	2121 PT0COI
14. <i>Thapsia minor</i>	2009*	2104 PT0COI

Para aumentar as possibilidades de conservação *ex situ*, amostras de sementes de alguns taxa foram enviados para o Jardim Botânico da Universidade de Lisboa e todos os taxa foram enviadas para o Banco Português de Germoplasma (Braga) e para o *Millenium Seed Bank* (Londres, UK).

3.1.3. Análise de carateres taxonómicos

Dada a grande complexidade da taxonomia da família das Apiaceae foi necessário realizar algumas análises que permitiram uma melhor caracterização de alguns taxa, em particular nas espécies *Daucus carota* L. e *Eryngium duriaei* L.

3.1.3.1. Avaliação morfológica e do teor em DNA das subespécies de *Daucus carota* L.

3.1.3.1.1. Morfologia

A Figura 8 mostra o aspeto geral dos frutos das diferentes subespécies.

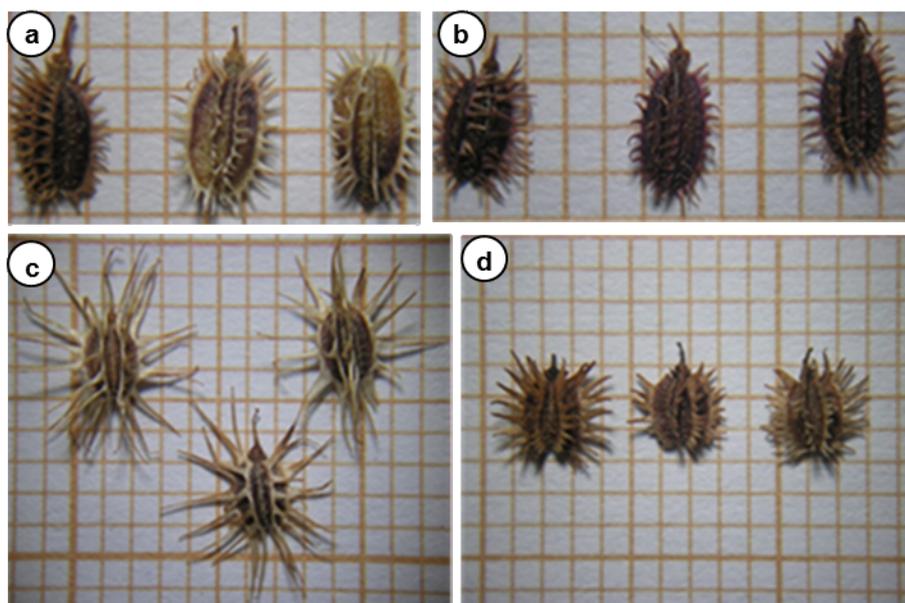


Figura 8: Aspetos dos frutos das diferentes subespécies de *Daucus carota*. a) *Daucus carota* subsp. *halophilus*; b) *Daucus carota* subsp. *carota*; c) *Daucus carota* subsp. *maximus*; d) *Daucus carota* subsp. *gummifer*. Escala: quadrícula do papel de fundo das fotografias = 1 mm.

A análise morfométrica dos frutos de *D. carota* permitiu separar a subsp. *maximus* das outras 3 subespécies com base no número de espinhos, uma vez que apresenta um número de espinhos nas costas secundárias do fruto significativamente menor (sete), em comparação com as outras três subespécies ($P < 0,05$). Diferenças significativas entre esta subespécie e as restantes foram também detetadas ao nível do comprimento do espinho (maior que o das outras três subespécies) e na morfologia dos ápices (sempre estrelados) do espinho (Tabela 9).

Tabela 9: Análise morfométrica dos frutos das subspeções de *Daucus carota* nativas em Portugal.

Taxon	Comprimento do fruto	Largura do fruto	Largura das costas secundárias	Comprimento do espinho	Largura do espinho na base	Nº de espinhos nas costas	Morfologia dos ápices dos espinhos			
							Estrelado	Unifurcado	Bifurcado	Simplex
<i>D. carota</i> subsp. <i>carota</i>	2,5 ± 0,38 ^b	1,5 ± 0,10 ^b	0,4 ± 0,08 ^b	0,9 ± 0,22 ^b	0,2 ± 0,04 ^b	11 ± 1,5 ^a	63,6 ± 25,2%	0,0 ± 0,0%	25,1 ± 24,2%	11,4 ± 14,7%
<i>D. carota</i> subsp. <i>gummifer</i>	2,3 ± 0,26 ^b	1,8 ± 0,20 ^a	0,4 ± 0,15 ^{ab}	0,8 ± 0,21 ^b	0,2 ± 0,04 ^b	11 ± 1,0 ^a	42,1 ± 31,9%	8,3 ± 10,0%	35,4 ± 23,1%	14,2 ± 18,6%
<i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	3,1 ± 0,57 ^a	1,8 ± 0,22 ^a	0,5 ± 0,10 ^a	0,9 ± 0,23 ^b	0,3 ± 0,06 ^a	11 ± 1,6 ^a	59,8 ± 30,0%	3,8 ± 6,1%	21,2 ± 18,2%	15,2 ± 19,0%
<i>D. carota</i> subsp. <i>maximus</i>	2,8 ± 0,22 ^{a, b}	1,7 ± 0,08 ^{a, b}	0,4 ± 0,12 ^{ab}	2,1 ± 0,36 ^a	0,3 ± 0,02 ^a	7 ± 0,5 ^b	100,0 ± 0,0%	0,0 ± 0,0%	0,0 ± 0,0%	0,0 ± 0,0%
Statistical test	F = 6,10, P = 0,002	F = 5,62, P = 0,004	F = 5,13, P = 0,003	F = 32,07, P < 0,001	F = 10,31, P < 0,001	F = 8,51, P < 0,001	-	-	-	-

Em cada coluna os valores assinalados por letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes.

Assim, com base nas características dos espinhos, foi elaborada uma chave, em que apenas a subsp. *maximus* pode ser separada das outras três subespécies:

1. Espinhos estrelados, comprimento $\geq 1,50$ milímetros.....***D. carota* subsp. *maximus***
2. Espinhos estrelados, com duas pontas, pontiagudos ou simples, comprimento $<1,50$ mm ou ausente.....***D. carota* subsp. *carota*, *D. carota* subsp. *gummifer*, *D. carota* subsp. *halophilus***

No que respeita às restantes três subespécies, foi observado um *continuum* entre as variáveis estudadas (Figura 9). Na verdade, a maioria dos espécimes avaliados apresentavam muitas variações dentro de cada planta e de cada população.

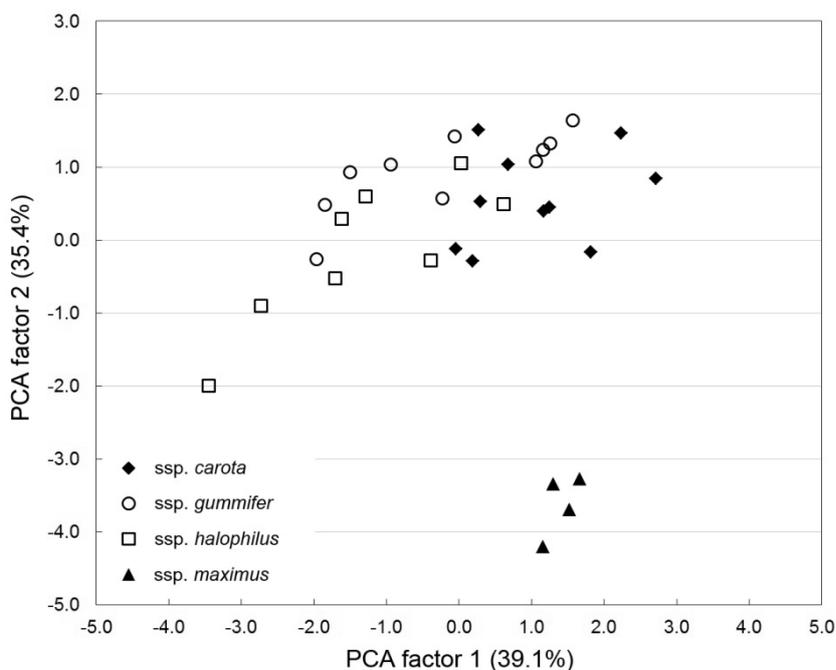


Figura 9: Análise de componentes principais (PCA) dos frutos das subespécies de *Daucus carota* nativas em Portugal.

A avaliação por observações e medições ao microscópio ótico dos espinhos dos frutos, revelou que espinhos dos frutos com ápice simples, estrelado ou bifurcado, observados em detalhe em microscopia SEM (Fig. 10), podem ser vistos em populações de localidades muito diferentes.

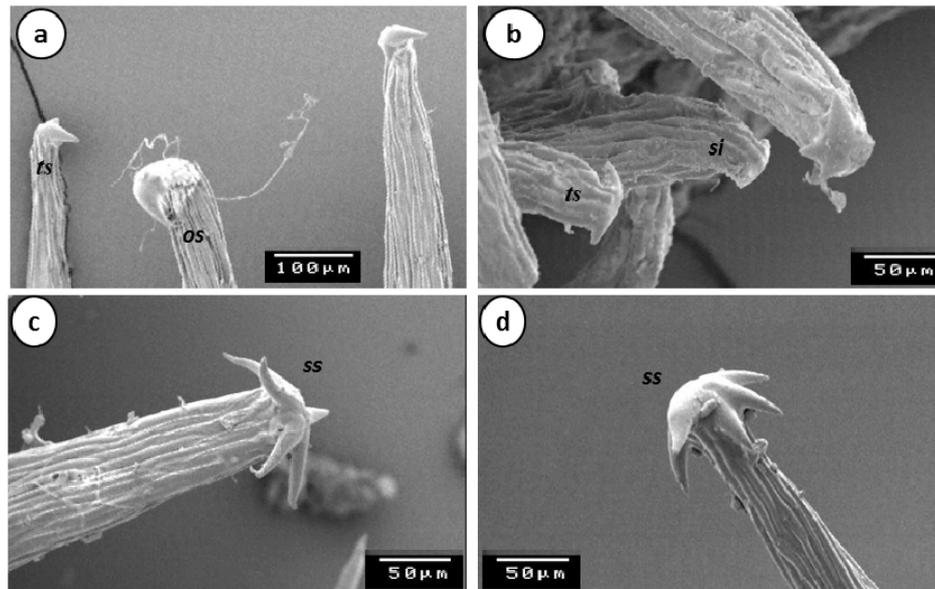


Figura 10: Detalhes dos espinhos dos aquênios. a) *Daucus carota* subsp. *carota*. b) *D. carota* subsp. *gummifer*. c) *D. carota* subsp. *halophilus*. d) *D. carota* subsp. *maximus*. *si* - espinho simple, *os* – espinho unifurcado, *ss* – espinho estrelado; *ts* – espinho bifurcado.

3.1.3.1.2. Avaliação do teor em DNA

O resultado do estudo das treze populações de *Daucus carota* para a análise do teor em DNA está representado na Tabela 10.

O conteúdo de DNA nuclear das 4 subespécies de *Daucus carota* foi estimado utilizando citometria de fluxo. De um modo geral, foi difícil obter histogramas de núcleos com pico G1 inferior a 3% (valor médio CV foi de 5,62%). Apesar disso, a variação do tamanho do genoma entre indivíduos da mesma população foi baixa (valores de CV de tamanho de genoma foram sempre inferiores a 3%). Diferenças significativas no tamanho do genoma foram detetadas entre as subespécies *maximus*, *halophilus* e *gummifer*, com a subespécie *maximus* a apresentar a maior quantidade de DNA ($2C = 1,26 \pm 0,04$ pg) e a subespécie *halophilus* o menor valor, com $2C = 1,21 \pm 0,04$ pg (Tabela 10).

Tabela 10: Estimativa do conteúdo de DNA nuclear das subespécies de *Daucus carota*.

Taxon	Conteúdo em DNA nuclear				No. pop.	No. ind.
	Média ± SD	Mn.	Máx.	1Cx (Mbp)		
<i>D. carota</i> subsp. <i>carota</i>	1,22 ± 0,02 ^{ab}	1,18	1,24	594	2	8
<i>D. carota</i> subsp. <i>gummifer</i>	1,22 ± 0,04 ^b	1,13	1,29	590	3	15
<i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	1,21 ± 0,04 ^b	1,12	1,33	593	6	22
<i>D. carota</i> subsp. <i>maximus</i>	1,26 ± 0,02 ^a	1,23	1,28	617	2	6

Os valores são dados como a média e o desvio padrão da média do conteúdo de DNA nuclear holoplóide (2C em pg) de indivíduos de cada população. O mínimo (Mn.) e o máximo (Máx.) dos valores obtidos para cada população, bem como o conteúdo de DNA nuclear monoplóide (1CX) em Mbp, e o número de populações analisados (No. pop.) e o número total de indivíduos analisados (No. ind.) são também indicados para cada população. Os resultados assinalados por letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$) de acordo com um teste de Tukey de comparação múltipla. ¹ 1 pg DNA = 978 Mbp.

3.1.3.2. *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss: avaliação morfológica e do nível de ploidia

3.1.3.2.1. Morfologia

Durante o trabalho de campo foi possível observar que as três populações localizadas a menor altitude (inferior a 1.700 m) apresentavam as mesmas características morfológicas entre si. No entanto, quando comparadas com as populações de altitudes mais elevadas (acima de 1.700 m - Serra da Estrela) foram nítidas as diferenças morfológicas. Na verdade, as plantas localizadas acima de 1.700 m eram ervas de (20-)30-60(-80) cm de altura, com folhas coreáceas, as basais pecioladas, linear-lanceoladas a oblongo-ovadas, pinatifido-dentadas; as caulinares sésseis a ligeiramente pecioladas. Capítulos cilíndrico-elipsóides a elipsóides até 3-(3,5) cm de comprimento.

Pelo contrário, em todas as outras três populações, as plantas eram ervas até 100(-180) cm de altura, com folhas membranáceas, as basais sub-sésseis espatuladas denticuladas a inciso-dentadas, as caulinares sésseis e amplexicaules. Capítulos oblongo-cilíndricos a cilíndrico-elipsóides até 8 cm de comprimento (Fig. 11).

Assim, a comparação entre indivíduos das quatro populações mostrou que as principais diferenças morfológicas ocorrem nas folhas. Além disso, as populações de maior altitude apresentam indivíduos de menor porte (30-60 cm), de cor acinzentada, enquanto

Resultados

nas outras três populações, os indivíduos são de cor verde, podendo atingir 100 cm de altura (Fig. 11).

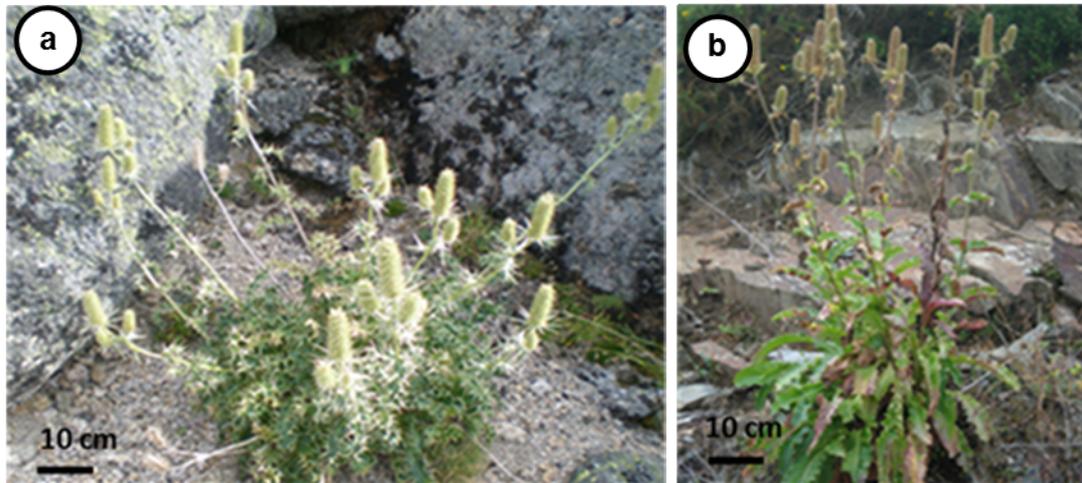


Figura 11: *Eryngium duriaei*. a) PNSE, Cântaro Raso (acima de 1.700m). b) AÇOR, Colcurinho (abaixo de 1.700 m).

3.1.3.2.2. Avaliação do teor em DNA

O teor em DNA das populações de *Eryngium duriaei* foi estimado utilizando citometria de fluxo (Tabela 11). A variação entre indivíduos da mesma população foi muito baixa e não significativa, mas diferenças significativas foram detetadas entre as populações de maior altitude apresentando um conteúdo de DNA nuclear significativamente maior do que as populações de menor altitude ($2C = 6,21 \pm 0,05$ pg/DNA vs $2C = 5,68 \pm 0,07$ pg/DNA). Esta diferença $\approx 9\%$ foi confirmada como sendo real, com dois picos distintos que foram também observados na análise simultânea de ambas as populações (Fig. 12).

Tabela 11: Estimativa do conteúdo de DNA nuclear das populações de *Eryngium duriaei*.

População	2C (pg)	Mn.	Máx.	1Cx (Mbp) ¹	n
Colcurinho	5,66 ^b ± 0,08	5,54	5,78	2,768	13
Gerês	5,73 ^b ± 0,05	5,67	5,79	2,802	4
Margaraça	5,68 ^b ± 0,05	5,63	5,79	2,778	8
Estrela	6,21 ^a ± 0,05	6,14	6,32	3,037	9

Os valores são dados como a média e o desvio padrão da média do conteúdo de DNA nuclear holoplóide (2C em pg) de indivíduos de cada população. O mínimo (Mn.) e o máximo (Máx.) dos valores obtidos para cada população, bem como o conteúdo de DNA nuclear monoplóide (1CX) em Mbp, e o número de indivíduos analisados (n) são também indicados para cada população. Os resultados assinalados por letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$) de acordo com um teste de Tukey de comparação múltipla. ¹ 1 pg DNA = 978 Mbp.

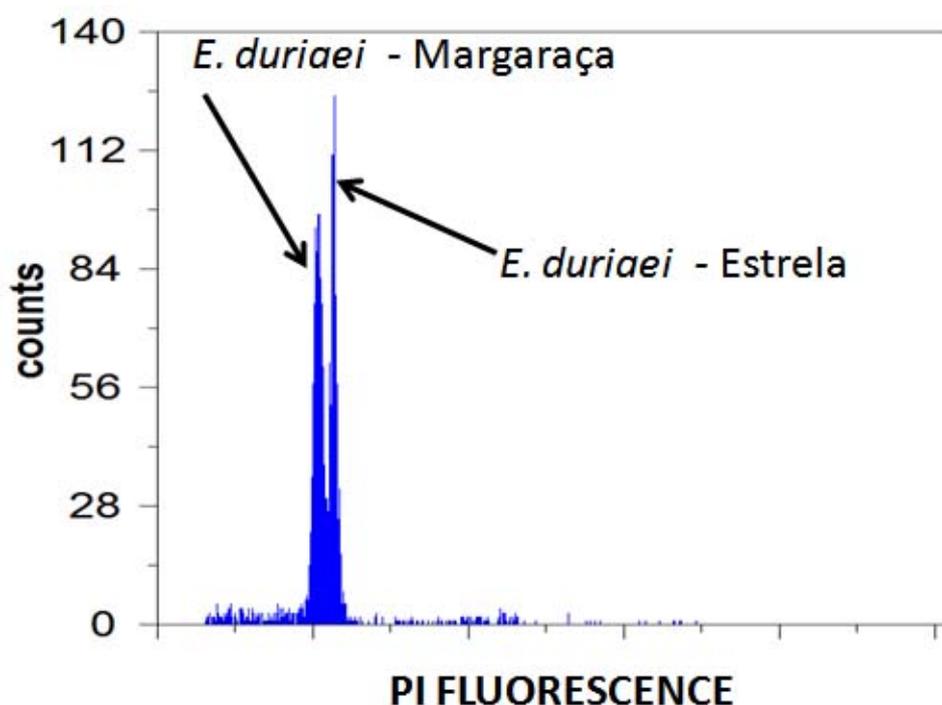


Figura 12: Histograma de fluorescência obtido após análise simultânea de núcleos, isolados a partir de folhas de *Eryngium duriaei* de um indivíduo da Mata da Margaraça e de outro da Serra da Estrela.

O nível de ploidia foi confirmado pela contagem de cromossomas em ápices de raízes de embriões germinados *in vitro*, obtidos a partir de populações da Serra da Estrela e de populações da Mata da Margaraça. Pela contagem de cromossomas, observou-se que todos os indivíduos analisados apresentaram o mesmo nível de ploidia, ou seja, $2n = 2x = 16$ cromossomas (Fig. 13).

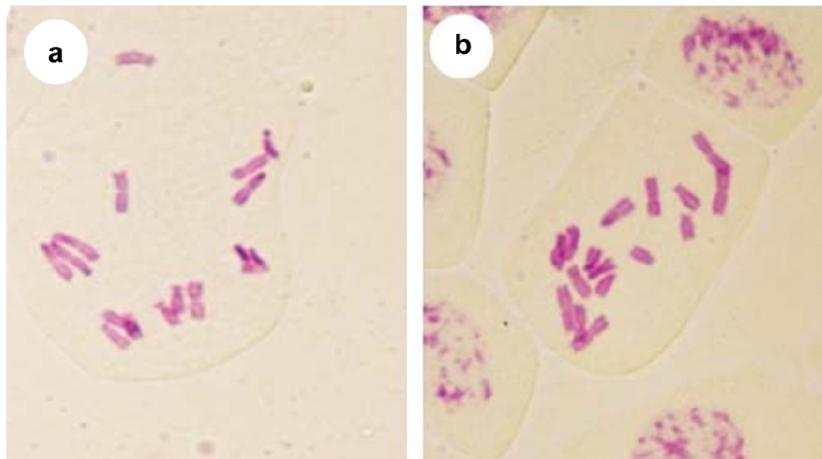


Figura 13: Análise cariológica de *Eryngium duriaei*. a) c-metáfase com 16 cromossomas, planta da Mata da Margarça (abaixo de 1.700m). b) Como em a), mas de uma planta da Serra da Estrela (acima de 1.700m). Os cromossomas estão amplificados 840x.

3.2. CULTURA *IN VITRO* – MICROPROPAGAÇÃO

A cultura *in vitro* foi desenvolvida prioritariamente para as espécies de distribuição geográfica mais restrita: *Daucus carota* subsp. *halophilus*, *Angelica pachycarpa*, *Distichoselinum tenuifolium* e *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*. Foi também iniciada a micropropagação de *Eryngium duriaei*.

Os resultados apresentados resultam da otimização das diferentes técnicas de cultura *in vitro* e da aclimatização a condições de exterior do material vegetal micropropagado, no Jardim Botânico de Coimbra e, para alguns casos, em habitat natural.

3.2.1. *Daucus carota* subsp. *halophilus*

3.2.1.1. Proliferação de meristemas

Após 4 semanas de cultura no meio de germinação, 50% das sementes colhidas em habitat natural (Fig. 14a) puderam germinar e os ápices caulinares foram usados como explante (Fig. 14b).

Os resultados da proliferação de rebentos caulinares pela multiplicação de meristemas indicam que a percentagem de proliferação (Fig. 14c) atingiu 100% em todos

os meios testados, a única exceção foi para o meio contendo 0,5 mg/L BA, que apresentou uma indução de cerca de 90% (Tabela 12).

Tabela 12: Efeito da concentração de BA sobre a proliferação de rebentos caulinares em segmentos foliares de *D. carota* subsp. *halophilus*, após 4 semanas de cultura.

BA (mg/L)	Nº de explantes cultivados	Indução (%)	Nº de rebentos/explante
Controlo	51	100 ^a	2,7 ± 0,03 ^d
0,1	51	100 ^a	3,3 ± 0,14 ^c
0,2	51	100 ^a	3,6 ± 0,04 ^{b,c}
0,5	70	90,1 ± 8,7 ^a	3,5 ± 0,12 ^c
1	75	100 ^a	3,9 ± 0,08 ^b
2	74	100 ^a	4,4 ± 0,14 ^a

Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas. Os valores nas colunas seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $P < 0,05$).

Os resultados também mostraram que o número de rebentos aumentou com a concentração de BA atingindo um máximo de 4,4 rebentos por explante para o meio contendo 2 mg/L (Tabela 12). No meio sem BA também ocorreu proliferação, mas com um menor número de rebentos caulinares (2,7 rebentos/explante).

Num segundo conjunto de experiências e após a remoção de todos os rebentos foliares, a base do explante (*stump*, Fig. 14d) foi inoculado novamente no mesmo meio de cultura para um novo ciclo de multiplicação de rebentos. Como o número de rebentos formados em meio MS foi muito menor que nos outros meios (2,7 rebentos/explante), este meio não foi testado na segunda fase de proliferação. Os dados desta experiência mostram que a indução variou entre 89-100% (Tabela 13), sem diferença estatística significativa nos valores médios encontrados ($P < 0,05$). O número de rebentos também foi maior (7,9 rebentos/explante) nos meios com 2 mg/L BA (Tabela 13 e Fig. 14e), e o mais reduzido (3,8 rebentos/explante) na concentração mais baixa de BA.

Tabela 13: Proliferação de rebentos foliares em *D. carota* subsp. *halophilus* num segundo ciclo de cultura.

BA (mg/L)	Nº de explantes cultivados	Indução (%)	Nº de rebentos/explante
0,1	51	100 ^a	3,8±0,15 ^c
0,2	51	96,1±4,0 ^a	4,6±0,36 ^c
0,5	70	100 ^a	6,1±0,39 ^b
1	75	90,7±5,3 ^a	6,0±0,16 ^b
2	74	89,2±7,0 ^a	7,9±0,4

Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas. Valores nas colunas seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes (Teste de Tukey, P < 0,05).

Em todas as concentrações de BA utilizadas observou-se que o número de rebentos formados foi maior no segundo ciclo da cultura do que no primeiro (Tabelas 12 e 13). Embora o comprimento dos rebentos não tivesse sido registado, observou-se que o comprimento da parte aérea foi, em geral, maior para as concentrações maiores de BA (Fig. 14f).

Para além da proliferação de meristemas observou-se a indução de organogénese na zona de corte do explante, em particular na presença de 1 ou 2 mg/L BA (Fig. 14g), originando gemas adventícias, o que aumentou o número total de rebentos formados. Repetidas inoculações dos explantes demonstraram que o potencial do explante para a organogénese foi mantido durante, pelo menos, 8 meses (dados não apresentados), sem perda da capacidade de proliferação de novos rebentos caulinares.

Foi também observada a floração em alguns rebentos (Figs. 14h, 14i). Este tipo de resposta encontra-se descrito em detalhe na secção 3.2.1.6.

Estudos histológicos realizados em pedicelos das flores produzidos *in vitro* mostraram uma estrutura anatómica (Fig. 14j) semelhante às mesmas estruturas em plantas silvestres, incluindo a presença de cavidades secretoras (Figs. 14j, 14k) características da família Apiaceae.

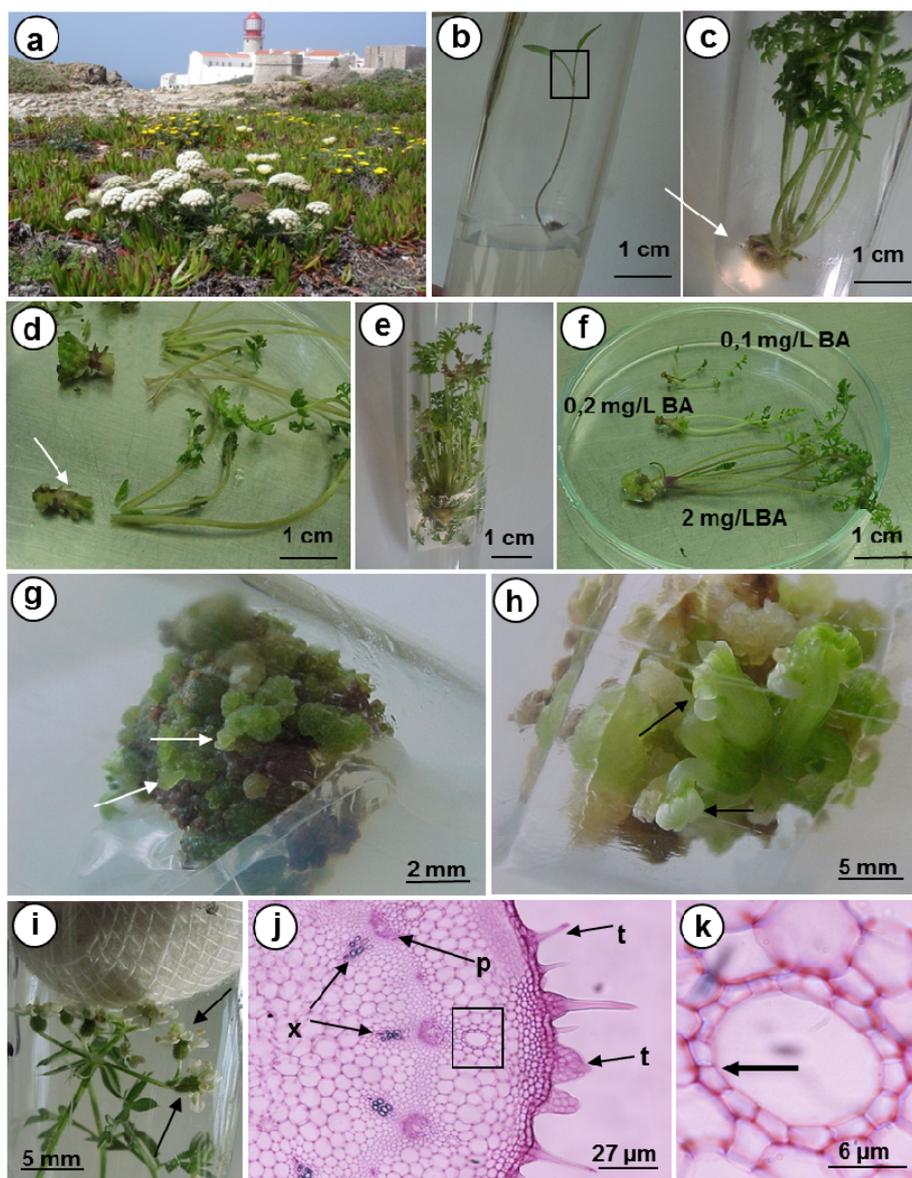


Figura 14: Aspectos morfológicos da proliferação *in vitro* de rebentos de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. a) Localidade de *Daucus carota* subsp. *halophilus* para recolha de sementes. b) Sementes germinadas após 4 semanas. A caixa indica o explante - ápice caulinar - cultivado na primeira inoculação. c) Rebentos obtidos em meio com 2 mg/L BA após 4 semanas de cultura do ápice caulinar. d) Aspetto geral de vários rebentos obtidos após o primeiro ciclo de proliferação. A seta indica o explante utilizado na segunda inoculação. e) Rebentos obtidos no segundo ciclo de proliferação. Comparação entre os rebentos obtidos em meios contendo concentrações diferentes de BA. f) e g) Organogénese: formação de rebentos em calos produzidos na base dos rebentos cultivados em meio contendo 2 mg/L BA. As setas apontam para rebentos adventícios. h) Flores rudimentares (setas) desenvolvidas a partir de rebentos produzidos *in vitro*. i) Flores completas (setas) produzidas em rebentos foliares em desenvolvimento. j) Seção transversal de um pedúnculo floral produzido *in vitro*. A caixa indica uma cavidade secretora. p) Floema, t) Tricomas e x) Xilema. k) Detalhe da cavidade secretora em j.

3.2.1.2. Enraizamento e aclimação *ex situ* e *in situ*

Quando os rebentos formados na fase de proliferação (2-3 cm) foram isolados (Fig. 15a) e transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento observou-se a formação de raízes (Fig. 15b). As raízes começaram a aparecer 2-3 semanas após a transferência para este meio MS e, em geral, 2-3 raízes eram produzidas em cada rebento (Fig. 15b). O enraizamento, que variou entre 46% e 60%, não foi afetado pelas concentrações de BA utilizadas na fase de proliferação (Tabela 14). Além disso, a taxa de formação de raízes não aumentou na presença de IBA (dados não apresentados). Após enraizamento, as plântulas foram transferidas para vasos e cobertas com plástico para reduzir a perda de água (Fig. 15c) e mantidas no fitotrão.

Tabela 14: Enraizamento em meio base MS de rebentos caulinares de *D. carota* subsp. *halophilus* produzidos *in vitro* em diferentes concentrações de BA.

BA (mg/L) - meio de proliferação onde se formaram os rebentos a enraizar em meio MS	Explantos inoculados em meio base MS	Nº de explantes enraizados	Enraizamento (%)
0,1	285	132	45,7 ± 5,6 ^a
0,2	303	193	59,7 ± 5,8 ^a
0,5	752	447	59,3 ± 2,5 ^a
1	615	311	54,1 ± 7,8 ^a
2	456	223	55,6 ± 4,4 ^a

Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas. Valores nas colunas seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes (Teste de Tukey, P < 0,05).

A percentagem de aclimação foi de cerca de 95%. Das 37 plantas envasadas 35 plantas foram plantadas com sucesso nos viveiros do Jardim Botânico (Fig. 15d), onde produziram raízes carnudas (Fig. 15e) e flores (Fig. 15f), sem alterações morfológicas.

Na instalação *in situ* de *Daucus* e após um período de 3-6 meses nos viveiros do JBUC 6 plantas foram instaladas no Cabo S. Vicente, Algarve, em fevereiro, sendo 2 maiores (tendo vegetado um ano em viveiro) e 4 menores (instaladas em viveiro durante um mês). Foram monitorizadas em abril e mantiveram-se em boas condições onde cresceram normalmente (Fig. 15g).

No ano seguinte, visitadas em finais de maio, as duas plantas maiores puderam completar o ciclo, florir e produzir sementes (Fig.15h), que se revelaram viáveis, após

testes de germinação. A mesma situação foi verificada com as restantes plantas, no ano seguinte.

Todas as plantas foram colhidas e elaboradas folhas de herbário que foram depositadas no Herbário COI.

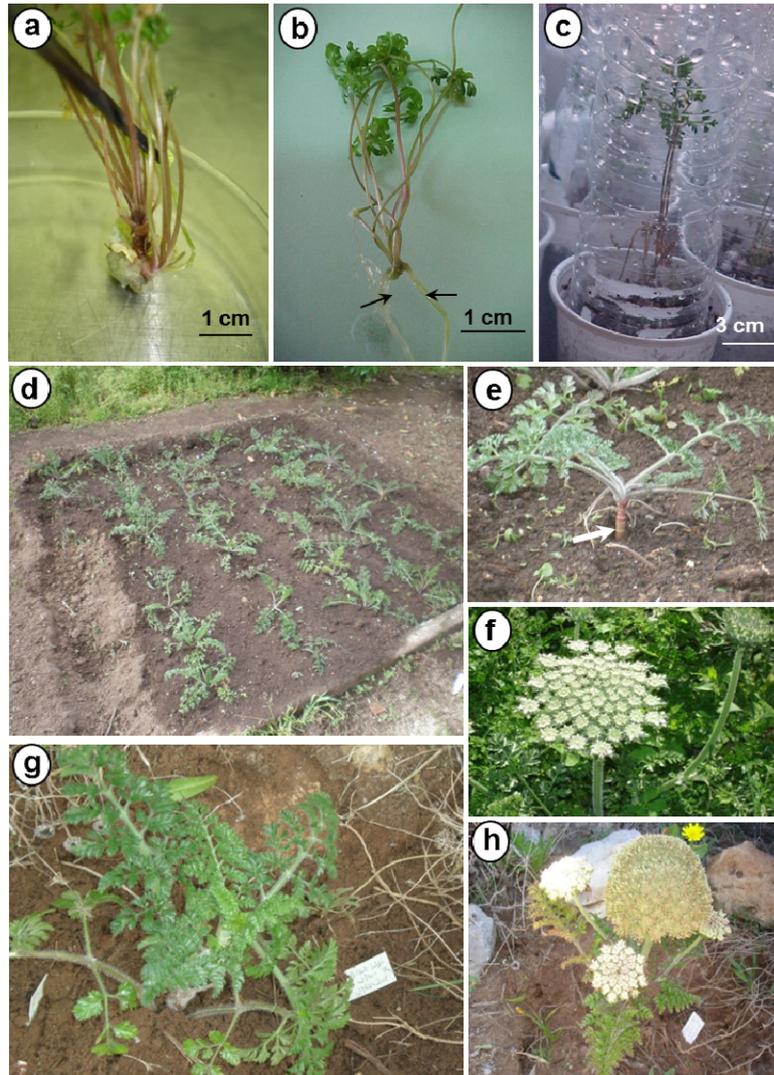


Figura 15: Enraizamento e aclimação de plântulas de *Daucus carota* subsp. *halophilus* obtidas *in vitro*. a) Plântulas antes de serem transferidas para meio de enraizamento. b) Plântula enraizada *in vitro* sem anomalias morfológicas nas raízes (setas). c) Processo de aclimação. d) Plantas no Jardim Botânico de Coimbra, oito meses após o início da cultura. e) Detalhe de uma planta crescendo *ex situ* mostrando a raiz principal carnuda (seta). f) Planta em floração. g, h) Plantas produzidas *in vitro* em diferentes fases do ciclo de vida em habitat natural (Cabo S. Vicente); g) Após plantação e h) Um ano mais tarde, com flores e frutos.

3.2.1.3. Embriogénese somática

Segmentos foliares e segmentos de raiz (0,5-1 cm comprimento) provenientes da germinação *in vitro* de sementes (Fig. 14b) foram cultivados em meio MS contendo 2,4-D. Decorridos 2,5 meses de cultura formaram-se calos embriogénicos (Fig. 16a) e verificou-se que a resposta *in vitro* de segmentos foliares e de segmentos radiculares após 2,5 meses de cultura foi muito semelhante para os dois tipos de explantes (Tabelas 15 e 16).

Tabela 15: Efeito da concentração de 2,4-D na indução de calo embriogénico em segmentos de raízes de *D. carota* subsp. *halophilus* após 2,5 meses de cultura.

2,4-D (mg/L)	Nº de explantes cultivados	Indução (%)	Nº de calo/explante*
0,1	48	100	1 ± 0,04
0,5	34	100	0,87 ± 0,08
1	41	100	0,86 ± 0,04
2	44	100	0,91 ± 0,04

*Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas.

Tabela 16: Efeito da concentração de 2,4-D na indução de calo embriogénico em segmentos foliares de *D. carota* subsp. *halophilus* após 2,5 meses de cultura.

2,4-D (mg/L)	Nº de explantes cultivados	Indução (%)	Nº de calo/explante*
0,1	55	100	0,70 ± 0,09
0,5	56	100	0,78 ± 0,03
1	53	100	0,84 ± 0,09
2	47	100	0,64 ± 0,09

*Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas.

A partir dos calos desenvolveram-se embriões somáticos, ainda no mesmo meio ou após 1,5 meses de subcultura em meio sem hormonas (Fig. 16b). Alguns dos embriões somáticos germinaram precocemente (Fig. 16c), mas a maioria deles desenvolveu-se normalmente passando pelas diferentes fases do desenvolvimento embrionário (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar). A formação de embriões somáticos não foi sincronizada, e todas as fases de desenvolvimento foram observadas no mesmo explante (Fig. 16b). O número de embriões somáticos por explante foi também bastante variável, com alguns explantes a produzirem apenas alguns embriões, enquanto outros originaram mais de 100 (Fig. 16b).

Os embriões somáticos atingiram o estágio cotiledonar de desenvolvimento em meio com 2,4-D (Fig. 16d) e foram então transferidos para um meio sem auxina onde germinaram e se desenvolveram em plântulas (Figs. 16e, 16f). As plântulas foram removidas dos tubos de ensaio (Fig. 16g) e transferidas para vasos (Fig. 16h) em condições semelhantes às descritas na secção anterior. A taxa de sobrevivência das plantas foi próxima de 100%, mas as plântulas produzidas por embriogénese apresentavam-se, em geral, mais finas e menos vigorosas do que as produzidas pela proliferação de meristemas.

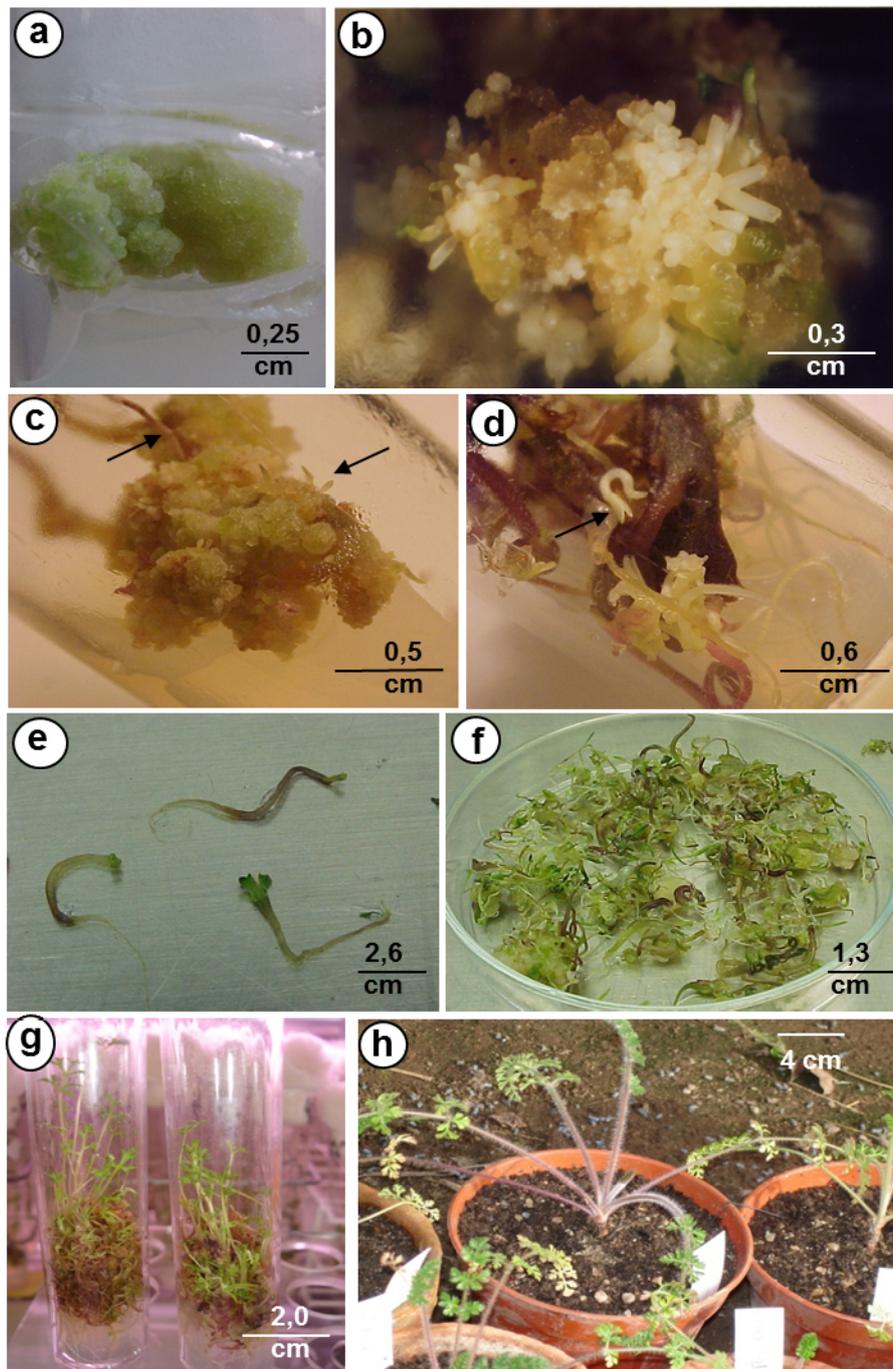


Figura 16: Indução de embriogénese somática e desenvolvimento de plântulas em *Daucus carota* subsp. *halophilus*. a) Calos com origem em segmentos foliares após 1 mês da cultura. b) Embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento, formados em segmentos foliares. c) calos embriogénicos mostrando vários embriões somáticos germinados precocemente (setas). d) Embrião somático cotiledonar (seta) após 2 meses de cultura no meio de indução. e) Plântulas resultantes da germinação de embriões somáticos. f) Grande número de embriões somáticos obtidos a partir de um explante único. g) Plântulas antes da fase de aclimação. h) Plantas de *Daucus carota* subsp. *halophilus* nos viveiros do Jardim Botânico, obtidas por embriogénese somática.

3.2.1.4. Manutenção de calos embriogénicos e quantificação da embriogénese

As porções de calos embriogénicos subcultivadas em meios de indução com 1mg/L de 2,4-D mantiveram a capacidade embriogénica por mais de oito meses, conforme referido, produzindo embriões somáticos com igual periodicidade: indução no meio com 1 mg/L de 2,4-D decorridos 2,5 meses e desenvolvimento dos embriões em meio base MS, decorridos 1, 5 mês de cultura.

Na verdade, os calos embriogénicos puderam ser mantidos na presença de 2,4-D (1 mg/l) e, sempre que transferidos para meio sem hormonas, ocorria o desenvolvimento das massas proembriogénicas em embriões. O número de embriões formados era bastante elevado o que dificultava as contagens. Para se terem dados mais objetivos sobre a capacidade de formação de embriões somáticos dos calos, quantificou-se o número de plântulas obtidas através de embriogénese somática em função do peso fresco dos calos (Fig. 17a).

Foram pesadas sete porções calosas embriogénicas (0,9463; 0,9372; 0,7650; 1,3513; 0,7157; 0,6480; 0,8118 mg) cuja média obtida foi de 0,8822 mg. Cada porção calosa formada nos segmentos peciolares produziu embriões somáticos decorrido 1,5 mês (Fig. 17b). Nesta altura foi dividida por tubos de ensaio com meio base MS em séries de 1 a 7; as séries tinham um mínimo de 4 tubos e um máximo de 18 tubos, pelo que se seguiu a evolução das culturas em 11 tubos (Fig. 17c), por ser o valor médio, tendo sido produzidas, em média, 310 plantas.

Assim, nos 11 tubos de ensaio (equivalente a 11 amostras de calo) foram produzidas 310 plantas, em condições de envasamento. Em cada tubo, ou em cada amostra de calo embriogénico com 0,8822 mg, foram produzidas, em média, 28 plantas, ou seja, 32 plântulas por g de calo embriogénico, decorridos 8,5 meses do início da cultura do explante.

Para o alongamento das plantas, até cerca de 10 cm, em condições para o envasamento, decorreram 3 meses de cultura em meio base; foram depois lavadas e deixadas apenas em água destilada durante 8 a 15 dias, para aclimação e para prosseguir o alongamento da raiz (Fig. 17d).

Decorridos mês e meio de aclimação 80% das plantas produzidas em todos os ensaios foram instaladas em viveiro, de 40 plantas envasadas 32 foram plantadas.

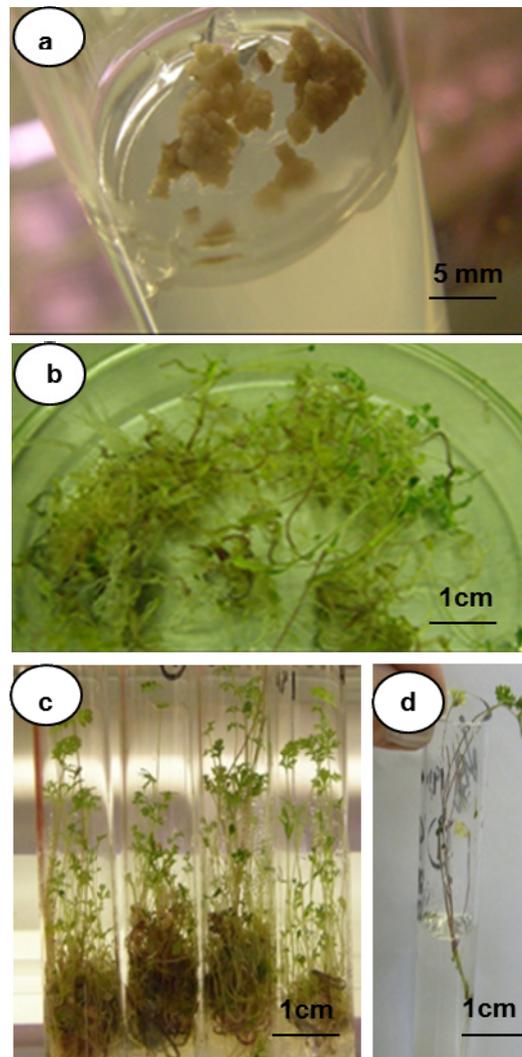


Figura 17: Embriogénese somática de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. Aspectos da cultura de segmentos peciolares. a) Calos embriogénicos. b) Plantas em caixa de Petri provenientes de um só tubo de ensaio. c) Evolução dos embriões somáticos em plantas. d) Plantas prontas para o envasamento.

3.2.1.5. Variabilidade *in vitro* - Citometria de fluxo

A análise do teor em DNA de plantas produzidas *in vitro* foi realizada em plantas obtidas por embriogénese somática e em plantas formadas por proliferação dos meristemas axilares. Conforme indicado na secção 2.2.3.4. o controlo da análise dos diferentes ensaios foi feito em folhas de plântulas resultantes da germinação *in vitro* de sementes de plantas silvestres de dois anos diferentes (semente *in vitro* 2007 e 2008, indicados na Figura).

Os resultados mostram que os teores de DNA são equivalentes, não se tendo verificado alterações no nível de ploidia durante o processo de regeneração *in vitro* nas amostras provenientes dos diferentes explantes inoculados e do tecido vegetal produzido, sob a ação de 2,4-D ou de BA.

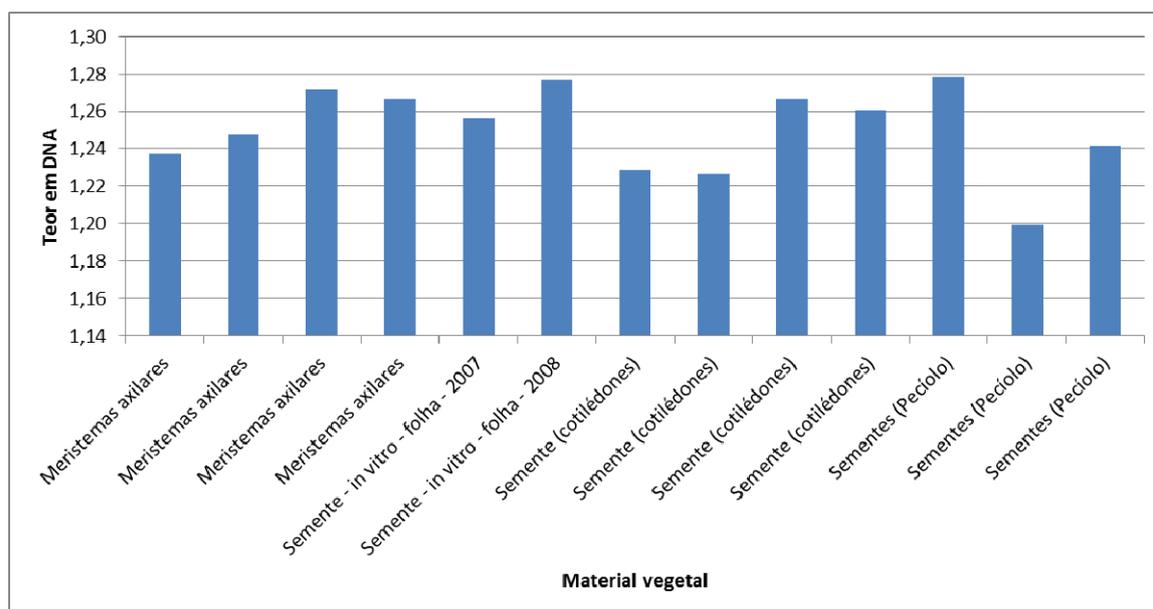


Figura 18: Teor em DNA das plantas de *Daucus carota* subsp. *halophilus* regeneradas *in vitro*.

3.2.1.6. Floração *in vitro* de *D. carota* subsp. *halophilus*

Durante os ensaios de micropropagação de *D. carota* subsp. *halophilus* verificou-se, em alguns casos, a formação de flores nos rebentos caulinares formados *in vitro*. Com o objetivo de determinar as condições que levavam a este tipo de organogénese foram realizados ensaios com vista à determinação das condições de floração.

3.2.1.6.1. Indução da floração

Segmentos nodais de plantas silvestres foram utilizados como explantes (Fig. 19a) e cultivados em meio MS + 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L IAA, de acordo com a metodologia descrita. Decorridas 4 semanas de cultura observou-se a formação de calos de crescimento reduzido e o desenvolvimento de rebentos (Fig. 19b).

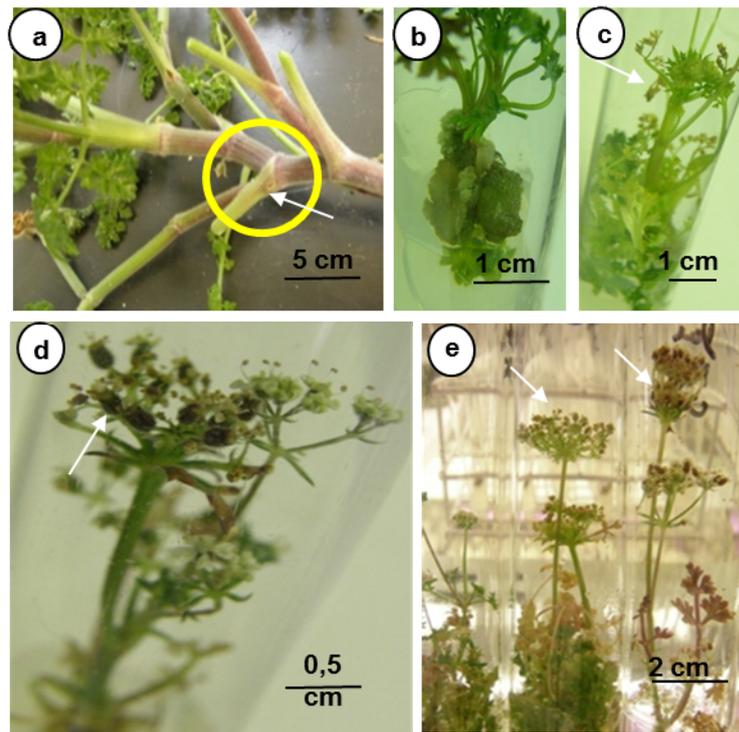


Figura 19: Floração *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. a) Plantas silvestres usadas para o isolamento de segmentos nodais (seta). b) Formação de calo e rebentos foliares. c) Formação das primeiras inflorescências (seta), que completam o desenvolvimento com o aparecimento de frutos (setas em d e e). e) Várias umbelas presentes.

Após 2 meses de cultura, os rebentos caulinares foram subcultivados no mesmo meio e, decorridos mais 2 meses de cultura, era notório o aparecimento de inflorescências (Fig. 19c), que evoluíram atingindo o desenvolvimento máximo por volta das 4 semanas de cultura (Figs. 19d, 19e).

Os resultados mostraram que quando a parte basal (Fig. 20a) da zona de proliferação dos rebentos florais foi subcultivada nas mesmas condições (MS + 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L IAA) verificou-se novamente a formação de rebentos onde, decorridas 4 semanas se voltavam a formar inflorescências, nas mesmas condições que foram acima descritas (Figs. 20a-c). Estes ciclos de floração puderam se repetidos sempre que se procedeu ao isolamento e cultura da parte basal dos rebentos caulinares (Fig. 20a), induzindo-se assim a formação de novos ciclos de floração (Fig. 20c), a cada 4 semanas, tendo as culturas mantido este potencial por mais de 3 anos.

A parte basal dos rebentos (seta da Fig. 20a) foi de novo inoculada em meio com a mesma composição; a parte apical, com as umbelas, foi inoculada em meio base MS (Fig.

20b-seta do tubo da direita), onde ocorreu o desenvolvimento da umbela. A parte mediana contém segmentos nodais (meristemas axilares) que se inocularam no mesmo meio ou em meio com BA, para proliferação.

Decorridas quatro semanas observaram-se os novos rebentos em floração (Fig. 20c).

Verificámos que nas plantas com flores, cultivadas em meio base, os frutos não tinham as sementes formadas e, até um mês nesse meio, acabavam por secar e morrer.

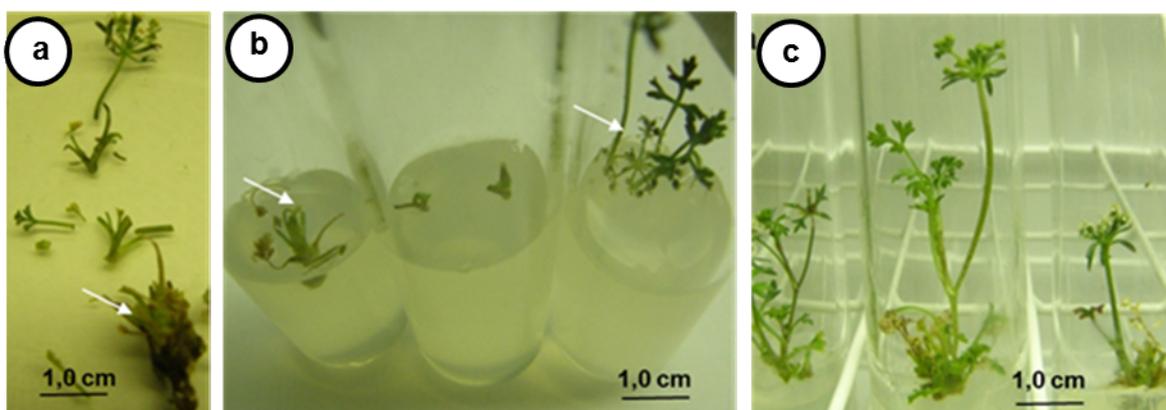


Figura 20: Ciclo de floração *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. a) Isolamento da parte basal de um rebento (seta). b) Inoculação do *stump*, meristemas axilares e parte terminal da inflorescência. c) Diferentes rebentos em floração.

A análise morfológica permitiu observar as diferentes fases deste tipo de morfogénese, tendo sido definidas 4 fases de desenvolvimento das umbelas, indicadas na Figura 21. Essas fases foram designadas: 1) umbela fechada (Fig. 21a), 2) umbela com pétalas visíveis verdes, mas ainda fechadas (Fig. 21b), 3) umbela com pétalas visíveis brancas mas ainda fechadas (Fig. 21c) e 4) umbela com flores abertas e com os estames expostos (Fig 21d).

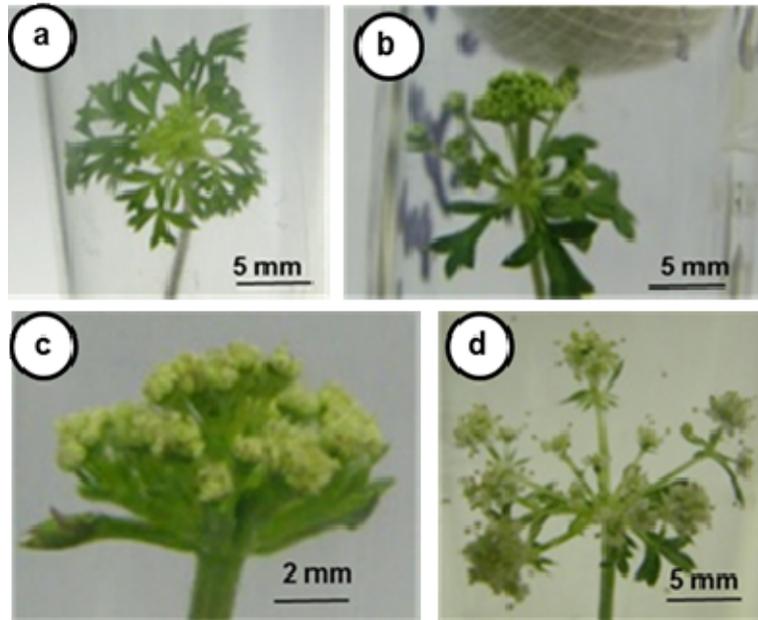


Figura 21: Estados de desenvolvimento das inflorescências durante a floração *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. Fase 1- umbela fechada (a). Fase 2 - umbela com pétalas verdes. (b) Fase 3 - umbela com pétalas brancas. Fase 4 - flores abertas (d) (comparar com Fig. 31c).

3.2.1.6.2. Efeitos de diferentes PGRs na floração

Utilizando o modelo de indução floral descrito, testou-se o efeito do IAA e da BA na formação e desenvolvimento das inflorescências. Assim, os explantes foram cultivados no meio controlo (MS) e em meios contendo apenas IAA (0,5 mg/L), BA (1,5 mg/L) ou a combinação dos dois PGRs. Os resultados estão expressos na Figura 22 e mostram que o meio com ambos os PGRs originou o maior número de inflorescências (155), enquanto os piores resultados (47 inflorescências) foram obtidos no meio contendo apenas BA (Fig. 22).

O tratamento 1 (Fig. 22) refere-se aos resultados da floração no meio base MS, ou no meio com IAA, ou com BA, de culturas provenientes do meio inicial, com os dois PGRs (BA + IAA).

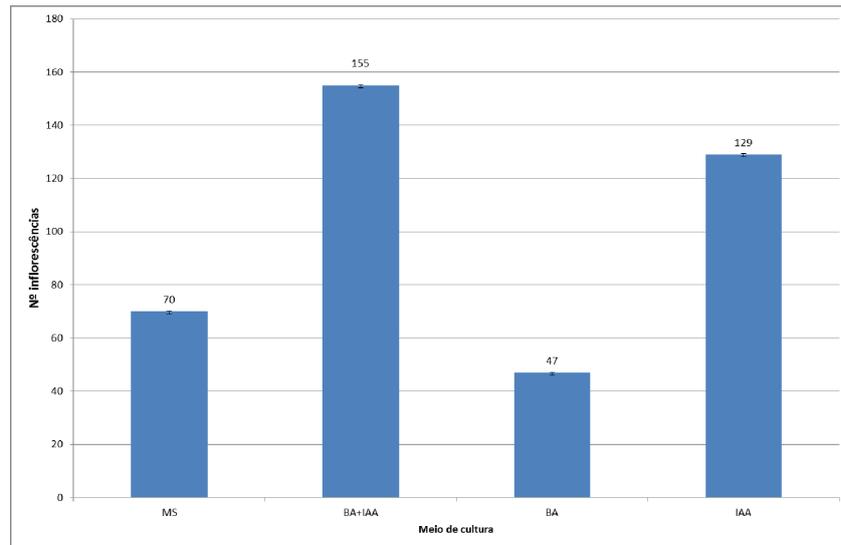


Figura 22: Efeitos dos PGRs na indução de floração *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. Os resultados representam a média com erro padrão de três réplicas.

Para além da indução floral, verificou-se que o meio de cultura afeta também o desenvolvimento das flores, tendo-se verificado que o meio com IAA, e o meio base MS, permitiram um melhor desenvolvimento das inflorescências que o meio com BA ou o meio com os dois PGRs. De facto, nestes últimos meios, não foi possível observar o desenvolvimento das quatro fases das inflorescências, ou seja a abertura das flores nas umbelas, o que no entanto se verificou no meio controlo, em que ocorreram todas as fases florais, e também no meio com apenas auxina, onde se verificou o máximo de inflorescências abertas, a fase morfológica mais adiantada (Fig. 23).

Resultados

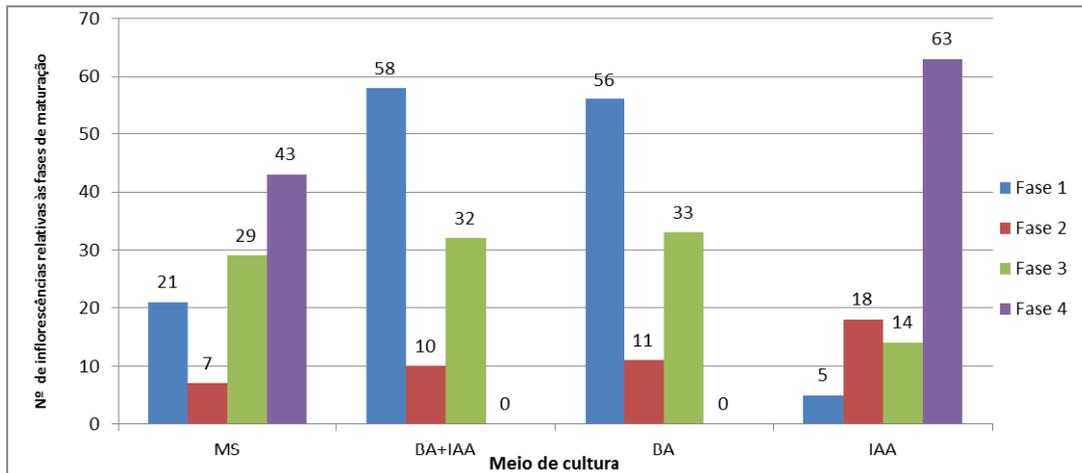


Figura 23: Efeito dos PGRs na evolução morfológica das umbelas de *Daucus carota* subsp. *halophilus*.

A Figura 24 apresenta o desenvolvimento comparativo das plântulas formadas nestes quatro meios de cultura testados, decorridas 4 semanas de cultura.

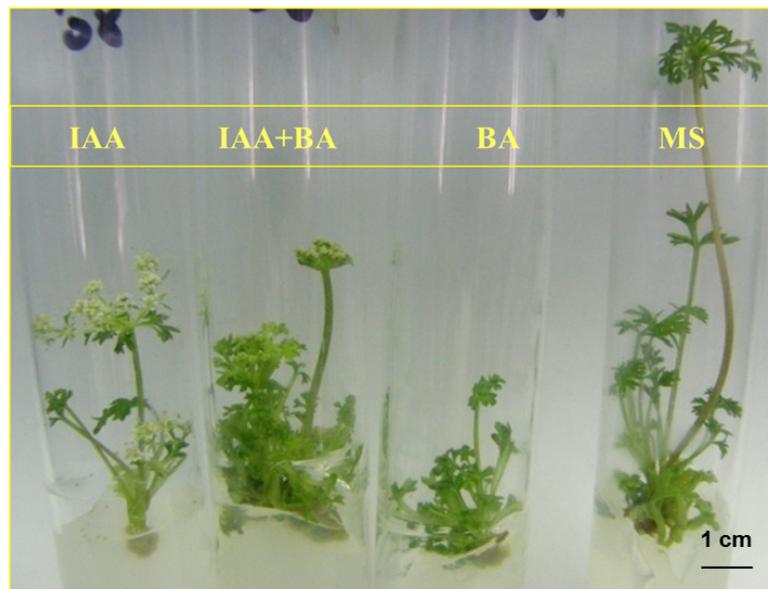


Figura 24: Floração *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus*: desenvolvimento comparativo após quatro semanas em diferentes meios de cultura.

Para avaliar o efeito isolado de IAA e BA na indução e na evolução morfológica das umbelas e se o meio onde os rebentos eram mantidos influenciava a resposta posterior, foi realizada uma segunda fase de experiências (Figs. 25 e 26), com o mesmo tempo de cultura.

Na sequência da experiência anterior, os explantes mantidos em IAA, quando subcultivadas no mesmo meio, produziram a maior quantidade de inflorescências (120) (Fig. 25), observando-se neste meio a formação das quatro fases morfológicas, com grande quantidade de flores abertas (75) (Fig. 26). No entanto, os explantes em meios com IAA quando subcultivados em meios com BA, produziram o menor número de inflorescências (40) (Fig. 25). Esta situação também ocorreu nas culturas em MS, quando os explantes foram subcultivados em MS, onde se observou o maior número de inflorescências (105) (Fig. 25), a maioria na fase morfológica mais avançada, flores abertas (67) (Fig. 26).

A resposta foi muito semelhante a esta última quando os explantes do meio MS foram subcultivados em meio com BA, mas observou-se menor quantidade de inflorescências produzidas (60 vs 105) (Fig. 25). Os explantes provenientes de BA, quando subcultivados em meio MS desenvolveram a maioria das inflorescências na fase um, fechadas (80) (Fig. 26), mas o número total de inflorescências foi menor do que na subcultura dos explantes do meio com BA para meio com IAA (75 vs 90) (Fig. 25), indicando que IAA será necessária para promover a indução de flores.

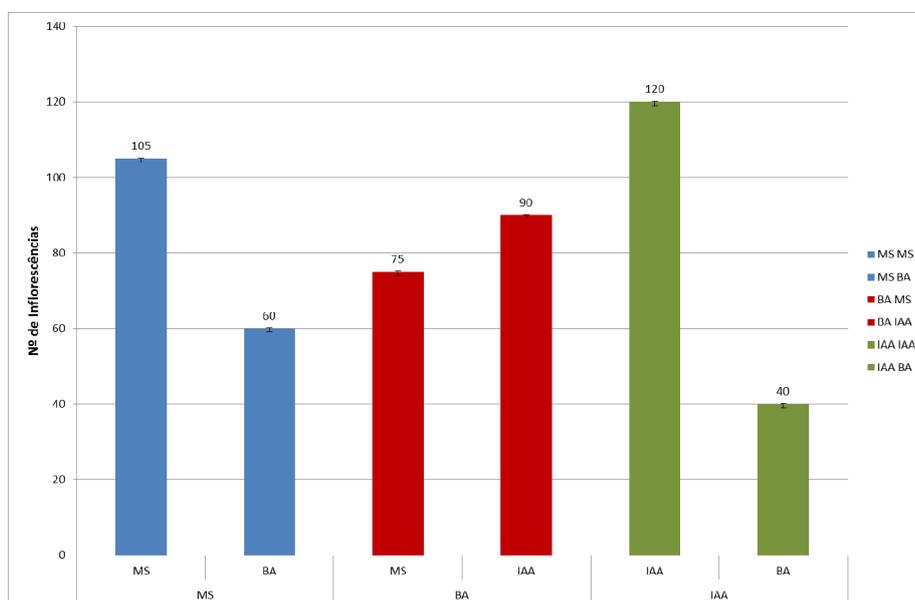


Figura 25: Efeito isolado dos PGRs na indução da floração *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. A cultura inicial e final foi feita em meios diferentes. Os resultados representam a média com erro padrão de três réplicas.

Resultados

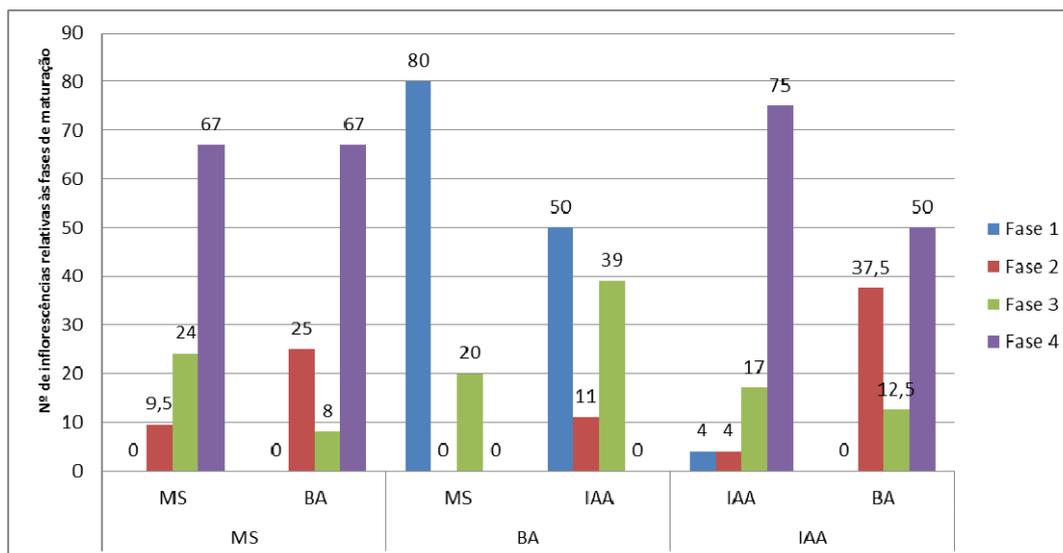


Figura 26: Efeito isolado dos PGRs na evolução morfológica das umbelas *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. A cultura inicial e final foi feita em meios diferentes.

Para além da BA e IAA testou-se ainda o efeito do GA₃ e da sacarose na indução e desenvolvimento floral. Os resultados estão expressos nas Tabelas 17 e 18. Como se pode observar, o GA₃ favoreceu a formação de umbelas, em maior número relativamente ao meio base, embora o valor máximo de indução tenha ocorrido na menor concentração (Tabela 17).

Tabela 17: Efeito da concentração de ácido giberélico (GA₃) na indução da floração *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus*.

GA3 (mg/L)	Nº de explantes cultivados	Indução (%)	Nº de inflorescências/explante*
0	40	25,0	0,25 ± 0,05
0,5	45	42,2	0,42 ± 0,04
1	45	40,0	0,40 ± 0,07
2	49	28,6	0,28 ± 0,06
Total	179	34,1	61

* Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas.

Relativamente à ação da sacarose os resultados obtidos são muito irregulares, verificando-se apenas que no meio com a concentração de 6% se produziu o maior número de umbelas (Tabela 18).

Tabela 18: Efeito da concentração da sacarose na indução da floração *in vitro* de *Daucus carota* subsp. *halophilus*.

Sacarose (%)	Nº de explantes cultivados	Indução (%)	Nº de inflorescências/explante*
0	40	30,0	0,31 ± 0,06
6	46	41,3	0,39 ± 0,12
9	41	9,8	0,10 ± 0,02
12	48	20,8	0,20 ± 0,07
Total	175	25,7	45

* Cada valor é a média com o erro padrão de três réplicas.

Em todos os meios testados se observou o desenvolvimento dos quatro estágios morfológicos sem anomalias morfológicas.

3.2.1.6.3. Caracterização das flores formadas *in vitro*

A análise das flores formadas *in vitro* mostrou que elas eram estruturalmente semelhantes às flores formadas pelas plantas em condições naturais, à exceção das dimensões, que se verificou serem muito mais reduzidas nas primeiras (Fig. 27). Assim, as flores formadas *in vitro* assemelhavam-se a miniaturas das formadas naturalmente.

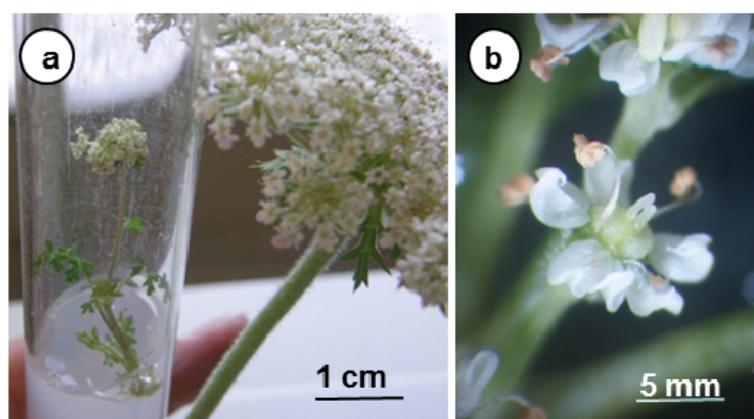


Figura 27: Floração em *Daucus carota* subsp. *halophilus*. a) Umbela formada *in vitro* e outra em condições naturais. b) Flor formada *in vitro*, mais ampliada.

A análise por SEM permitiu também seguir as diferentes fases de diferenciação das inflorescências. Em rebentos caulinares em desenvolvimento (até 1 semana de cultura), verificou-se que o meristema apical caulinar estava presente (Fig. 28a) e o seu funcionamento originava um grande número de primórdios foliares (Figs. 28 b, 28c, 28d).

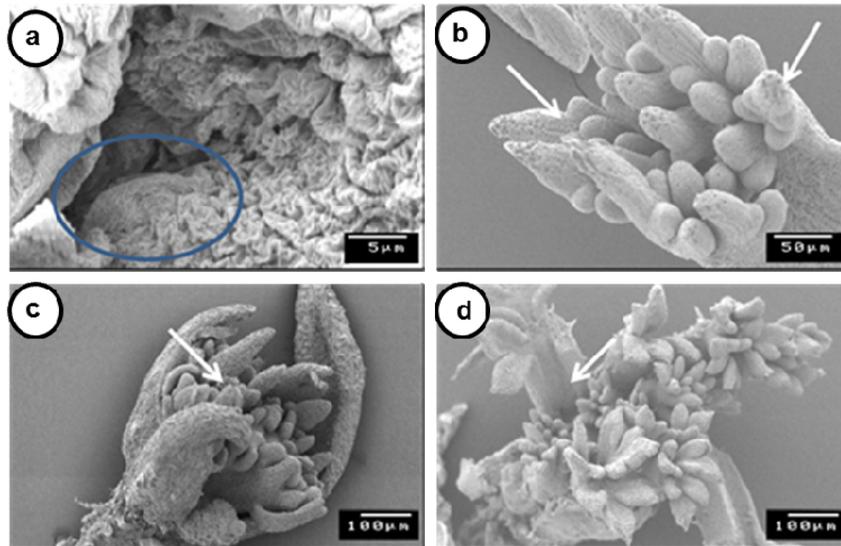


Figura 28: Zona meristemática apical de rebentos caulinares de *D. carota* induzidos *in vitro*. a) Zona do meristema apical do caule (círculo). Figuras b-d) Zonas apicais com primórdios foliares (setas) em diferentes fases de desenvolvimento.

De acordo com as observações efetuadas, a transição do meristema vegetativo para meristema inflorescencial (evocação floral) parece ocorrer entre os 7 a 10 dias de cultura, pois foi durante este período que se observou uma alteração na organização do meristema apical (Figs. 29a, 29b), apresentando-se este com maiores dimensões e originando um tipo de estruturas laterais diferentes dos primórdios foliares, de forma globosa (Figs. 29a, 29b). Essas estruturas apresentavam-se como massas laterais de células representando, provavelmente, novos meristemas inflorescenciais que dão origem às diferentes umbelas (Fig. 29c, 29d) que se formam em condições naturais (Fig. 29e).

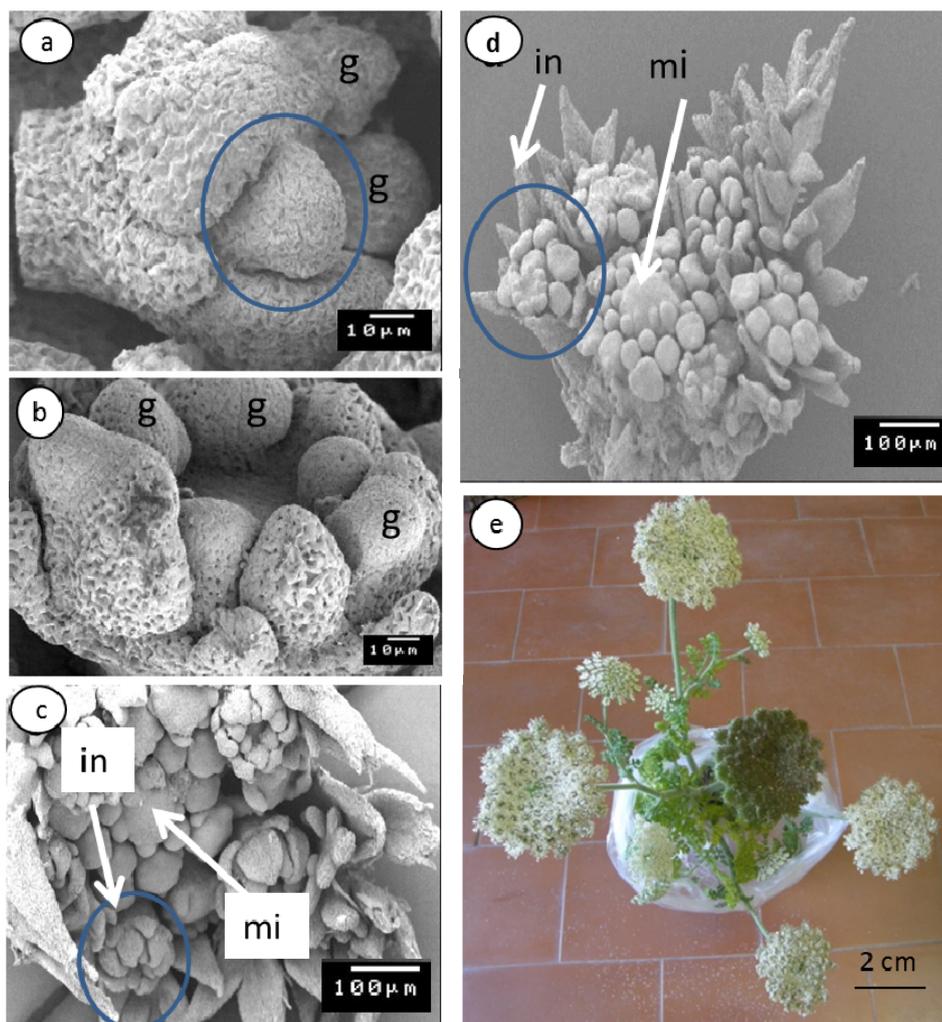


Figura 29: Evocação floral e desenvolvimento das inflorescências.

a) Zona apical de um rebento caulinar onde é visível o meristema inflorescencial (círculo) e várias formações laterais de forma globosa (g), supostamente zonas meristemáticas que darão origem a novas inflorescências. b) Como em a, mas com a zona apical observada noutra posição. A zona meristemática central não é visível por se encontrar rodeada de zonas meristemáticas laterais (g). c) e d) Dois aspetos da diferenciação das inflorescências. Em ambas as figuras é visível a zona do meristema inflorescencial (mi) e inflorescências (in) em diferentes fases de desenvolvimento. e) Planta de *D. carota* subsp. *halophilus* com várias inflorescências.

Em cada inflorescência (Fig. 30a), o meristema inflorescencial produzia lateralmente um número considerável de meristemas florais (Fig. 30b) os quais originavam, por sua vez, os diferentes órgãos florais em fases mais adiantadas da cultura, por volta dos 15 a 20 dias (Figs. 30c, 30d).

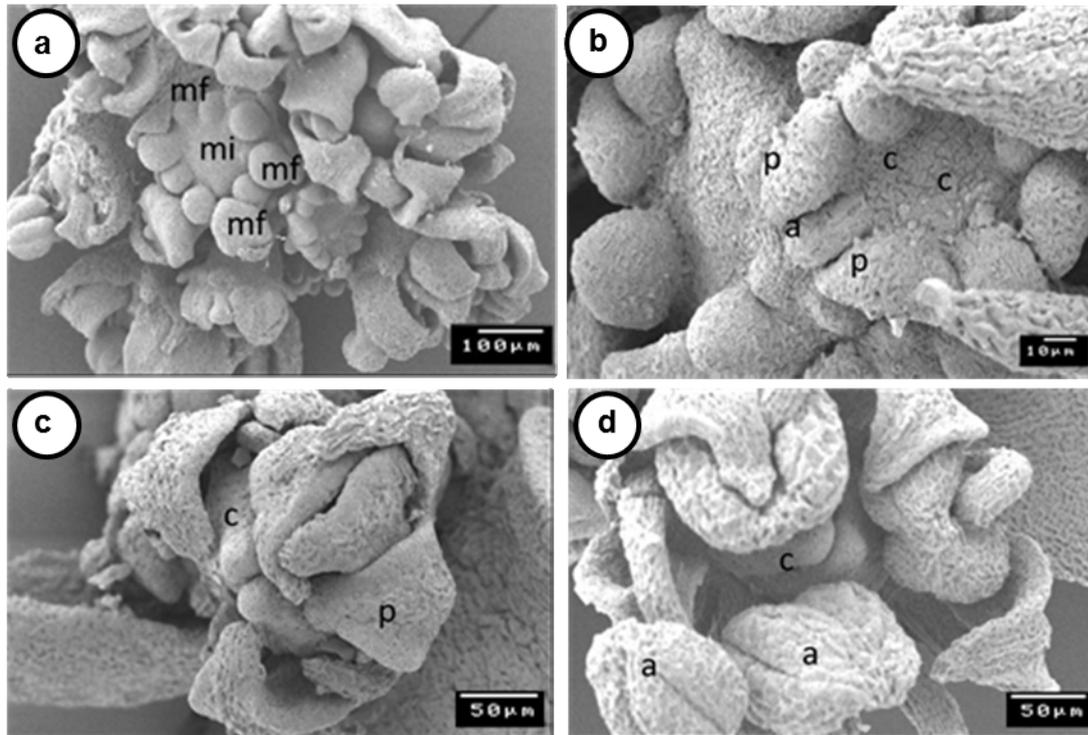


Figura 30: Formação das flores *in vitro*. a) Aspeto de um meristema inflorescencial (mi) onde são visíveis vários meristemas florais (mf) em formação. b) Flores em diferenciação, sendo notórios os diferentes órgãos florais em formação: c – carpelos, a- anteras e p – pétalas. c) e d) Fases mais adiantadas da diferenciação floral onde os órgãos florais estão já diferenciados: c – carpelos, a - anteras e p – pétalas.

Para complementar as figuras de SEM apresentam-se as observações das flores à lupa (Fig. 31), onde se analisa melhor o aspeto geral da morfologia das flores, em diferentes fases.

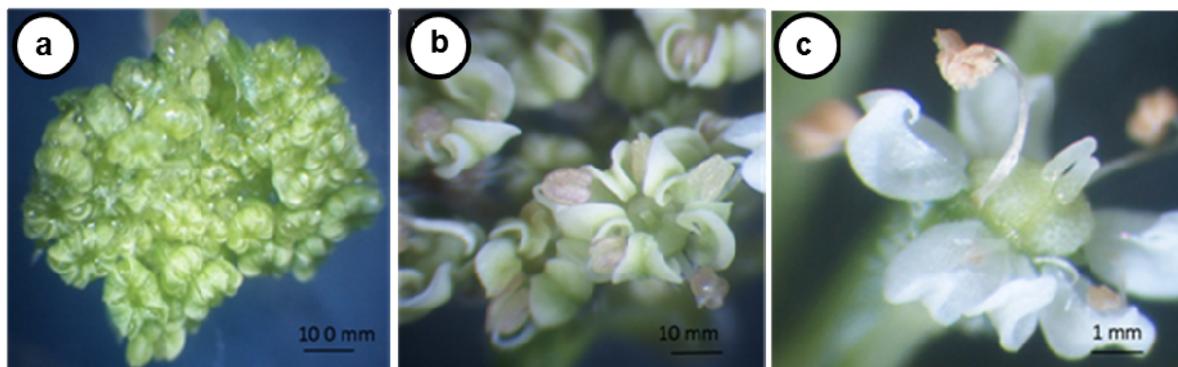


Figura 31: Flores formadas *in vitro* observadas à lupa. Aspeto geral das flores, em diferentes fases. a) Fase 2 - umbela com pétalas verdes. b) Fase 3 - umbela com pétalas brancas. c) Fase 4 - flores abertas (comparar com Fig. 21d).

À semelhança do aspeto geral das flores verificou-se que, para além do tamanho, também a morfologia das estruturas reprodutoras (estames e carpelos) era semelhante nas flores formadas *in vitro* e *in vivo*. Assim, verificou-se que o gineceu era constituído por dois carpelos em ambos os tipos de plantas (Fig. 32a, 32b). No entanto, nas flores formadas *in vitro*, nunca foi possível observar a formação de embriões, que pudemos observar nas plantas silvestres (Fig. 32c), o que sugere que embora os órgãos reprodutores sejam morfologicamente normais a sua funcionalidade é afetada pelas condições de cultura *in vitro*.

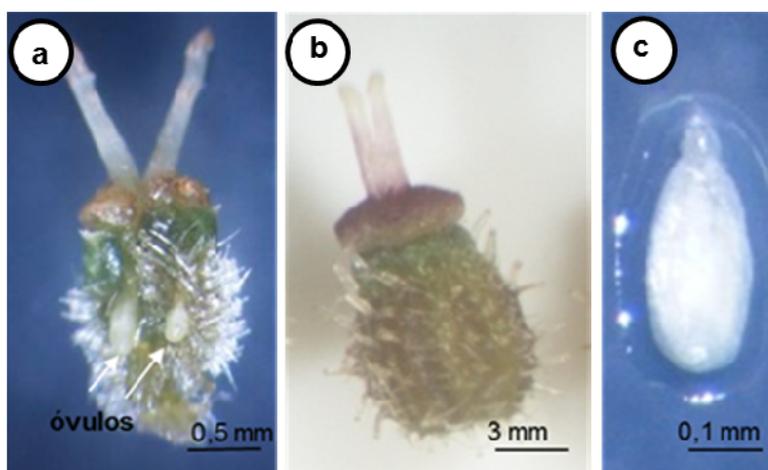


Figura 32: Carpelos de *Daucus carota* subsp. *halophilus* formados *in vitro* (a) e *in vivo* (b). Notar os dois óvulos no carpelo formado *in vitro* (a) e um embrião das sementes de plantas silvestres em c).

3.2.1.6.4. Análise do pólen

Com o objetivo de caracterizar o pólen formado *in vitro* procedeu-se à observação dos grãos de pólen maduros após esmagamento das anteras em carmim ou em DAPI. No caso do DAPI a fluorescência emitida era, na maior parte dos casos, muito fraca tendo sido difícil visualizar os diferentes núcleos. No entanto, algumas observações mostraram a presença de 3 núcleos de dimensões semelhantes, embora um ligeiramente maior que os outros dois (Fig. 33a). Esta observação parece sugerir uma divisão do núcelo generativo para formação dos dois gâmetas sem que ocorra formação do tubo polínico.

Observações semelhantes foram obtidas com carmim acético (Fig. 33b). Os grãos de pólen foram estudados em umbelas com as flores enroladas e pétalas verdes (fase 2). O aspeto geral do pólen formado *in vitro* era muito idêntico ao pólen formado em condições

naturais, embora neste nunca tenham sido observados três núcleos mas apenas dois correspondentes ao núcleo generativo e vegetativo (Fig. 33c).

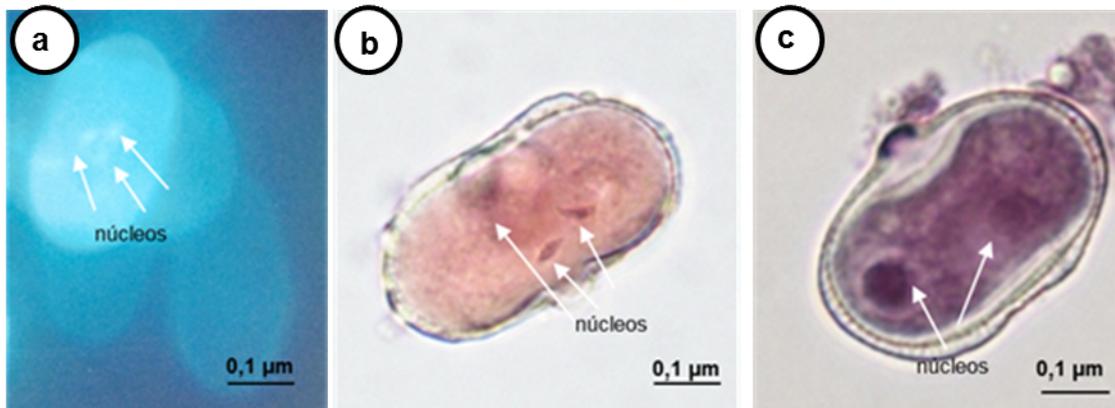


Figura 33: Pólen de *Daucus carota* subsp. *halophilus*. Pólen de flores produzidas *in vitro* mostrando três núcleos após tratamento com DAPI (a) e em carmim acético (b). c) Pólen de flores de flores silvestres em carmim acético.

Tentativas para conseguir a germinação do pólen *in vitro* foram infrutíferas, mesmo utilizando concentrações de sacarose da ordem dos 18%. No entanto, a germinação do pólen de plantas a crescer no campo também não foi conseguida. De referir ainda que no caso da polinização artificial das flores formadas *in vitro* não foi possível conseguir a germinação dos grãos de pólen (quer produzido *in vitro*, quer em condições naturais) no estigma.

3.2.1.6.5. Estudos histológicos

Os estudos histológicos realizados nos explantes cultivados para indução de floração (tempo 0) mostraram a existência de meristemas axilares formados por células muito vacuolizadas (Fig. 34a-d). Em alguns casos esse meristemas apresentavam já algum desenvolvimento tendo originado novos rebentos em formação (Fig. 34b), também formados por células com uma acentuada vacuolização. Estes meristemas são os responsáveis pela proliferação de rebentos, descrita na secção 3.2.1.6.1. Um aspeto interessante que se observou foi a formação de meristemas adventícios próximos dos meristemas axilares (Figs 34c, 34d). À semelhança dos meristemas axilares este tipo de meristemas era também formado por células muito vacuolizadas, sendo facilmente

observáveis as ligações vasculares destes meristemas aos tecidos subjacentes (Fig. 34d). Estes meristemas surgiam isoladamente ou em grupos (Fig. 34d) sendo provavelmente responsáveis pela elevada proliferação de rebentos observada nesta espécie, o que também significa que parte dos rebentos terá origem não em meristemas axilares mas sim em meristemas adventícios.

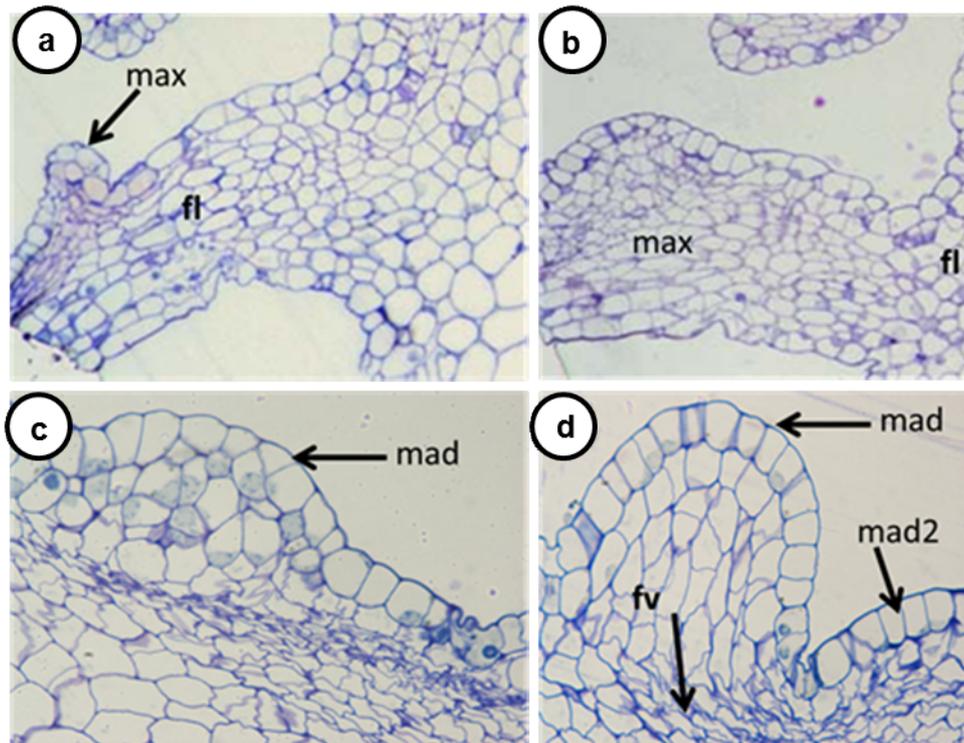


Figura 34: Secções longitudinais em explantes (*stumps*) cultivados para a indução de floração (tempo 0). a) Meristema axilar (max) no início do desenvolvimento e uma folha (fl) que tem na axila o meristema referido (X 200). b) Meristema axilar (max) bastante mais desenvolvido que na figura anterior, sendo visível parte da folha (fl) (X 200). c) Meristema adventício (mad) em formação (X 200). d) Meristema adventício (mad) mais desenvolvido que na figura anterior sendo notória a ligação do meristema em formação com os tecidos subjacentes por feixes vasculares (fv). Um segundo meristema adventício (mad2) em desenvolvimento é parcialmente visível no lado direito da figura (X 200).

As observações realizadas entre 4 e 7 dias de cultura mostraram o desenvolvimento dos meristemas axilares e a concomitante origem de rebentos caulinares (Fig. 35). Em virtude destes meristemas axilares assumirem agora uma posição na extremidade dos rebentos serão a partir daqui designados por SAM (*shoot apical meristem*). Em termos de organização estes meristemas eram muito similares aos descritos no tempo zero, sendo caracterizados pela presença de células muito vacuolizadas (Fig. 35 a) e por uma camada

L1 muito nítida que se demarcava claramente das restantes células do meristema (Fig. 35a, 35b). Estes meristemas originavam lateralmente meristemas axilares (Fig. 35a). No entanto, em algumas secções analisadas (em particular aos 7 dias de cultura) verificou-se a presença de zonas meristemáticas com características diferentes. Assim, em alguns casos, os meristemas apicais apresentavam maiores dimensões (Fig. 35c) e ocorria uma zona de transição formada por células mais achatadas entre o meristema e os tecidos subjacentes (Fig. 35c). Noutros casos, foi possível observar zonas meristemáticas com células pouco vacuolizadas, de citoplasma denso e de núcleos volumosos (Fig. 35e). Ao contrário do verificado nos meristemas vegetativos, estes meristemas não apresentavam uma camada L1 tão diferenciada relativamente às restantes e os planos de divisões observados não eram exclusivamente anticlinais (Fig. 35e). Estas observações representam, provavelmente, a modificação do meristema vegetativo para meristema floral, um conjunto de alterações vulgarmente conhecido por evocação floral.

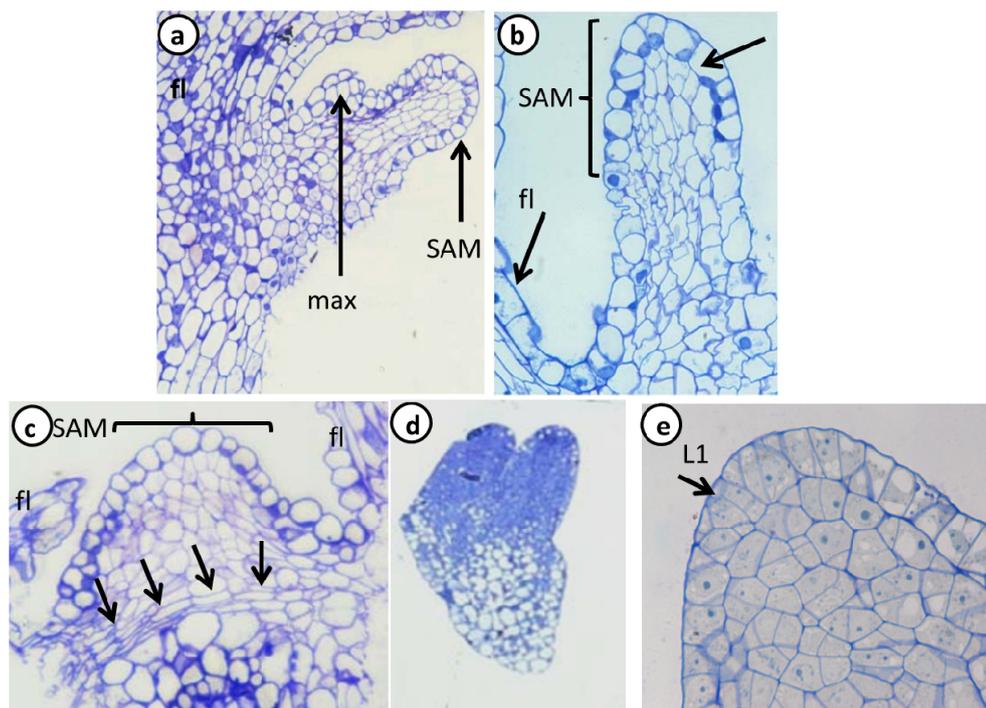


Figura 35: Secções longitudinais da zona meristemática do explante após 4-7 dias de cultura em meios de indução floral. a) Desenvolvimento do meristema apical (SAM) sendo visível a formação de um meristema axilar (max). fl indica a folha do explante inicial. Notar a grande vacuolização das células meristemáticas (X 200). b) Detalhe de um SAM em desenvolvimento onde mais uma vez se destaca a vacuolização de grande parte das células. fl – folha. É também notória a diferença nos planos de divisão celular entre a camada L1 e as restantes (X 200). c) Zona meristemática em que o meristema apresenta maiores dimensões comparativamente ao observado na figura b e onde se observa uma zona de transição (indicada pelas setas) entre o meristema (SAM) e o resto do explante (X 200). d) Secção onde são visíveis dois meristemas formados por células com citoplasma denso (x50). e) Detalhe de um meristema com células com citoplasma denso e núcleos volumosos. Notar o padrão mais aleatório de divisões na camada L1 (x500).

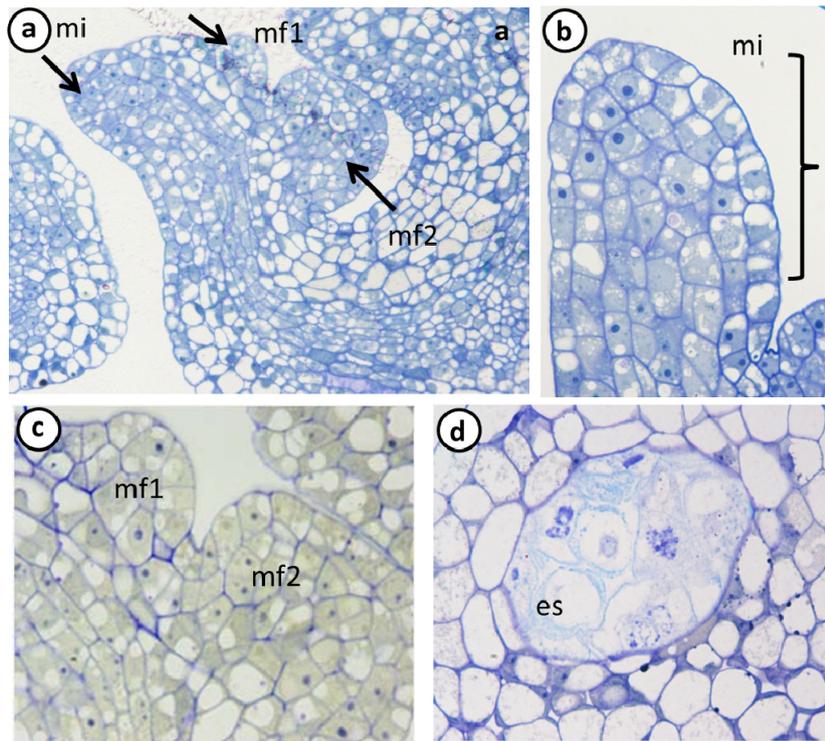


Figura 36: Diferenciação floral após 11-15 dias de cultura em meios de indução de floração. a) Zona apical de um rebento onde é visível o meristema inflorescencial (mi) e dois meristemas florais laterais (mf1 e mf2) (X 200). b) Detalhe de um meristema inflorescencial (X 500). c) Secção onde são visíveis dois meristemas florais laterais (mf1 e mf2) (X 500). d) Secção de uma flor onde se pode observar o tecido esporogénico (es) numa antera em desenvolvimento (X 500).

Após 11 dias de cultura, a parte apical dos rebentos apresentava já uma organização típica da fase de floração, com a presença de um meristema inflorescencial e de meristemas laterais do tipo floral (Fig. 36a). O meristema inflorescencial apresentava o mesmo tipo de características descritas no parágrafo anterior embora com a camada L1 mais bem definida e com as células apresentando um maior grau de vacuolização (Fig. 36b). Os meristemas laterais (florais) surgem como massas de células globosas (ver Fig. 30a) sem uma diferenciação muito nítida e formadas por células de tipo meristemático (Figs. 36 a, 36c). Em fases mais adiantadas, para além das duas semanas de cultura, os meristemas florais diferenciaram flores onde se podia observar a diferenciação dos órgãos florais (Fig. 36d).

3.2.2. *Distichoselinum tenuifolium*

Seguindo a mesma metodologia descrita previamente (*Daucus carota* subsp. *halophilus*) procedeu-se a ensaios para multiplicação *in vitro* através da proliferação de meristemas axilares e de organogénese em meios com BA, bem como por embriogénese somática em meios com 2,4-D.

3.2.2.1. Proliferação de meristemas

Sementes recolhidas em habitat natural (Fig. 37a) germinaram *in vitro* durante 30 dias, sendo os ápices caulinares retirados e cultivados *in vitro* (Fig. 37b, 37c) sob a ação da BA, em dois ciclos seguidos de 30 dias de cultura, conforme metodologia descrita para *D. carota*. Ao final do primeiro ciclo, as plântulas produzidas (Fig. 37d) foram cortadas e a parte basal (Fig. 37e) foi cultivada nas mesmas condições de cultura, sendo as plântulas preparadas para a fase seguinte de enraizamento (Fig. 37e).

O nível de resposta foi 100% visto todos os explantes inoculados terem respondido com produção de rebentos, nos dois ciclos de cultura, embora em número reduzido (Tabelas 19 e 20; Figura 37).

Verificou-se que a média do número de rebentos produzidos por explante foi semelhante na primeira inoculação de 30 dias, seguida de uma segunda inoculação de outros 30 dias com 1mg/L de BA (1,67 na primeira inoculação e 1,18 na segunda). Idênticos resultados foram obtidos utilizando 2 mg/L de BA (1,32 na primeira inoculação e 1,14 na segunda), nas mesmas condições de cultura (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19: Efeito da concentração de BA na proliferação de rebentos em ápices caulinares de *Distichoselinum tenuifolium*, após 4 semanas de cultura.

BA (mg/L)	Nº de explantes inoculados	Indução (%)	Nº de rebentos/explante*
1	37	100	1,67 ± 0,15
2	51	100	1,32 ± 0,03

*Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas.

Tabela 20: Proliferação de rebentos em ápices caulinares de *Distichoselinum tenuifolium*, num segundo ciclo de cultura.

BA (mg/l)	Nº de explantes inoculados	Indução (%)	Nº de rebentos/explante*
1	36	100	1,18 ± 0,11
2	22	100	1,14 ± 0,08

*Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas.

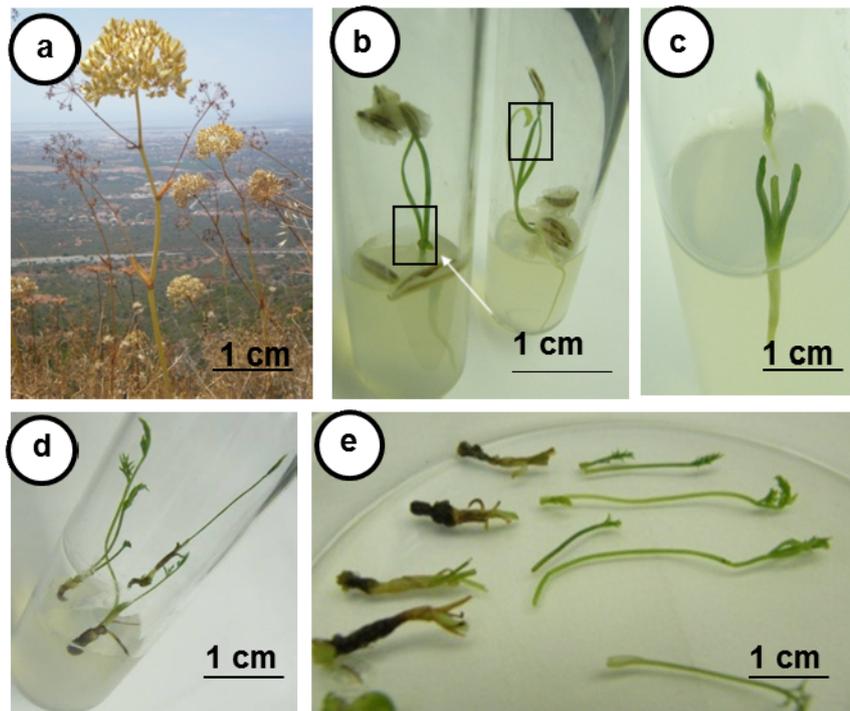


Figura 37: Proliferação de rebentos caulinares em *Distichoselinum tenuifolium*. a) Planta em habitat natural, Moncarapacho, Algarve, na fase de recolha de sementes. b) Tipos de explantes assinalados: segmentos foliares e ápice caulinar (seta). c) Ápice caulinar *in vitro*. d) Formação de plântulas. e) Corte e preparação do *stump* (base do explante) para a segunda inoculação.

3.2.2.2. Embriogénese somática

Seguindo a metodologia descrita para *D. carota*, a cultura *in vitro* de segmentos foliares de *Distichoselinum tenuifolium* em meios com 2,4-D (1 ou 2 mg/L), durante três meses, originou a formação de calos (Fig. 38a), a partir dos quais se produziram embriões somáticos exibindo vários estádios morfológicos (Figs. 38a-38d), desde torpedo a cotiledonar (Fig. 38c, 38d).

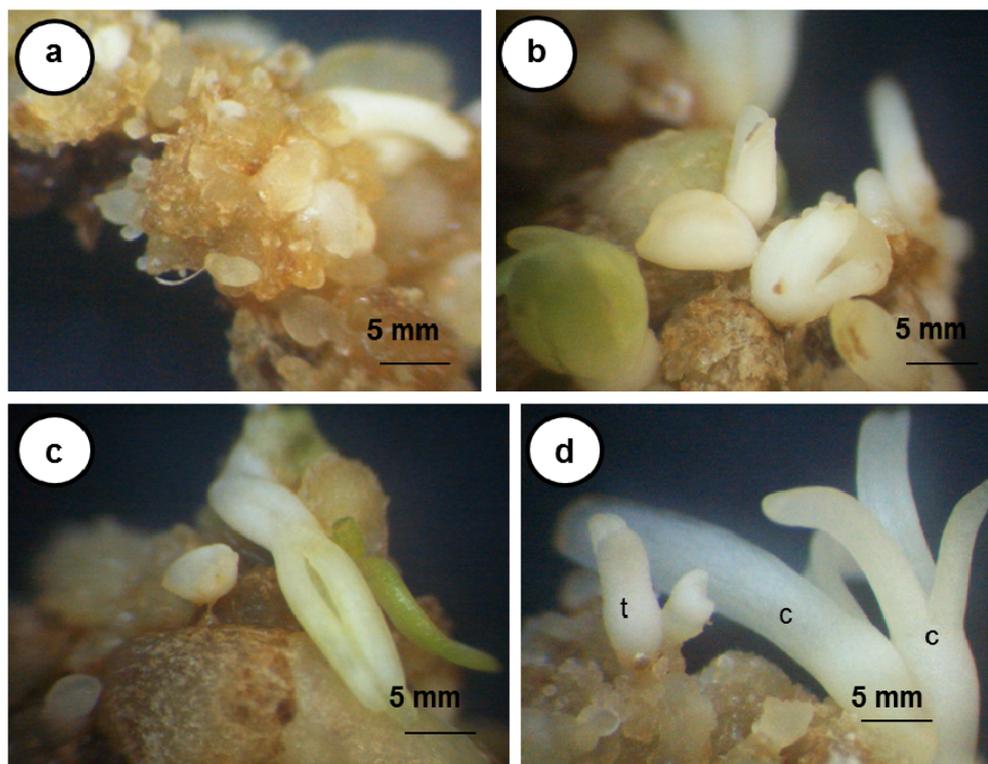


Figura 38: Aspectos da embriogénese somática em *Distichoselinum tenuifolium*, após 3 meses de cultura em 2,4-D. a) Embriões somáticos em fase inicial de desenvolvimento. b) Embriões somáticos em estados mais avançados de desenvolvimento. c) Dois embriões no estado cotiledonar. d) Um embrião em fase de torpedão (t) e dois no estado cotiledonar (c).

A avaliação *in vitro* foi feita relativamente aos explantes com resposta, pelo que a taxa de indução foi de 100%.

Os melhores resultados (6,4 embriões/explante) foram conseguidos no meio com 1 mg/L, embora resultados idênticos tenham sido obtidos em meio base.

Tabela 21: Efeito de 2,4-D na indução de embriogénese somática em segmentos foliares de *Distichoselinum tenuifolium*.

2,4-D (mg/L)	Nº de explantes inoculados	Indução (%)	Nº de embriões /explante*
0	17	100	7, 2 ± 0,84
1	12	100	6, 4 ± 1,08
2	26	100	4, 8 ± 1,81

*Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas.

Os embriões formados em meio com 2,4-D (Fig. 39a) foram subcultivados em meio base MS, o que permitiu a germinação e o alongamento das plantas (Fig. 39b) para a fase

seguinte, de aclimatização e envasamento em estufa (fitotrão) (Figs. 39c, 39d, 39e), ocorrendo a posterior cultura em espaço exterior (Figs. 39f), seguindo os mesmos procedimentos descritos para *D. carota*.

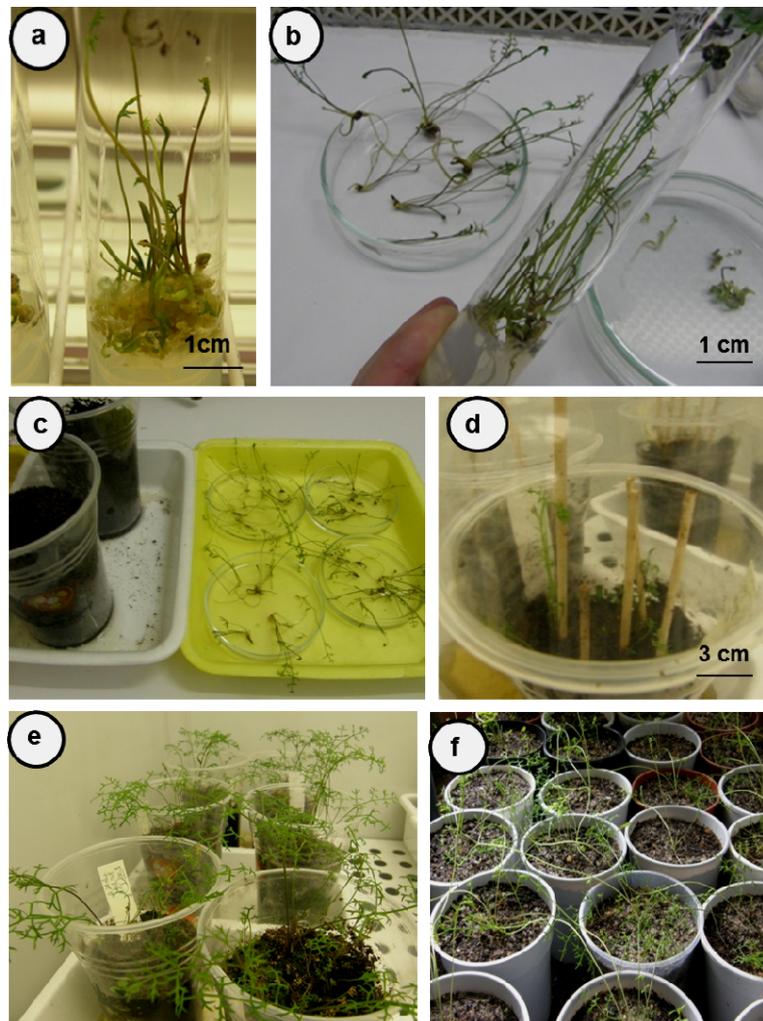


Figura 39: Germinação, desenvolvimento e aclimação de plântulas de *Distichoselinum tenuifolium*, induzidas por embriogênese somática. a) Formação de calo com embriões somáticos em meio com 2,4-D. b) Desenvolvimento dos embriões somáticos em meio base MS. c) Plântulas prontas a envasar. c) Preparação do substrato dos vasos e limpeza das plântulas. b) Aclimação das plântulas no fitotrão, numa primeira fase cobertas com proteção, retirada (e) após uma semana. f) Trinta plantas envasadas para transferência para os viveiros.

3.2.2.3. Organogênese

Segmentos foliares de *Distichoselinum tenuifolium* (Fig. 37b) foram extraídos conforme procedimentos descritos para os ápices caulinares e cultivados *in vitro* sob a ação

de BA (1 e 2 mg/L). Verificou-se a formação direta de rebentos na zona de corte (Fig. 40a), em que vários rebentos eram produzidos num mesmo explante (Figs. 40a, 40b). Os rebentos caulinares desenvolveram-se em altura (Figs. 40c, 40d) e decorridas seis semanas foram cortados (Fig. 40e) para enraizamento em meio base MS.

A produção de rebentos em segmentos foliares de *Distichoselinum tenuifolium* (Tabela 22) foi favorecida com a maior concentração de BA (2 mg/L) onde foram produzidos em média 2,48 rebentos, para 1,98 no meio com a concentração de 1 mg/L.

Tabela 22: Efeito de BA na indução de rebentos caulinares em segmentos foliares de *Distichoselinum tenuifolium*.

BA (mg/L)	Nº de explantes inoculados	Indução %	Nº de rebentos/explante*
1	47	100	1,98 ± 0,33
2	21	100	2,48 ± 0,45

*Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas.



Figura 40: Aspectos da organogénese em *Distichoselinum tenuifolium* em segmentos foliares cultivados em BA. Formação direta de rebentos na zona de corte, que se desenvolvem bem em altura, como em b). c) Pormenor ampliado de a). d) Vários rebentos formados do mesmo segmento foliar. E) Rebentos caulinares imediatamente antes da cultura para indução de enraizamento.

3.2.2.4. Enraizamento e aclimação *ex situ*

A formação de raízes nos rebentos caulinares formadas *in vitro* por proliferação de meristemas e por organogénese, ocorreu mesmo na ausência de auxinas e os rebentos (1,5 cm ou 6 cm de comprimento, respetivamente). Plântulas formadas por organogénese puderam enraizar após 1,5 meses de cultura em meio MS base (Fig. 41a).

A fase seguinte de aclimação na câmara de cultura (Figs. 41b, 41c) ocorreu nas mesmas condições descritas para *D. carota* subsp. *halophilus*, seguida da instalação das plantas no exterior, nos viveiros e na escola médica do Jardim Botânico, onde puderam completar o ciclo de vida decorridos dois anos, com a produção de flores e frutos (Fig.41d).

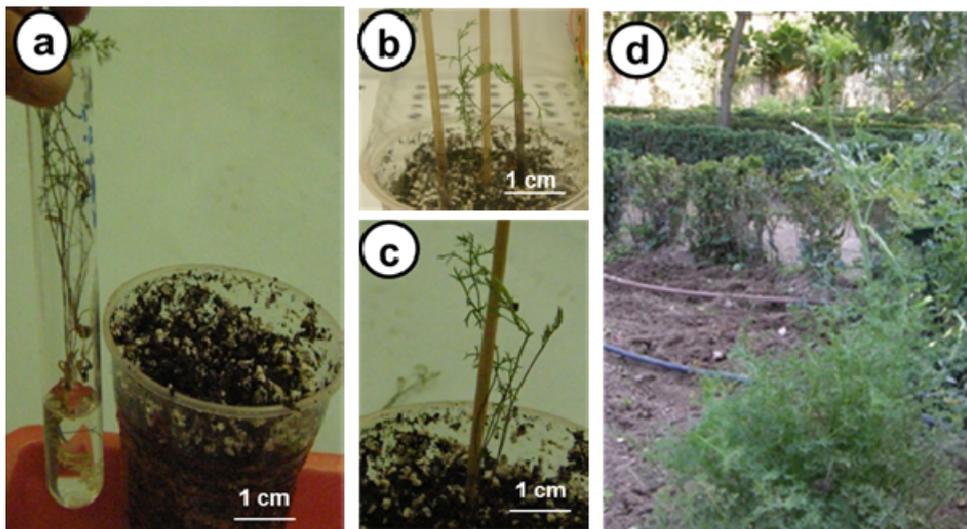


Figura 41: Aclimação de plantas de *Distichoselinum tenuifolium* formadas por organogénese. a) Plantas enraizadas *in vitro* prontas a envasar. b) Envasamento com proteção inicial, retirada em c), após uma semana. d) Planta após 2 anos de ser instalada no JBUC, com uma inflorescência em formação.

Relativamente às plantas micropropagadas por embriogénese somática foram instaladas em viveiro (Fig. 42a) consoante procedimentos descritos para *D. carota*. Decorrido cerca de um ano de cultura nos viveiros (Fig. 42b), evoluíram no seu desenvolvimento (Figs. 42b, 42c), com a produção das primeiras umbelas (Fig. 42d) de morfologia idêntica às da plantas-mãe.



Figura 42: Aclimação de plantas de *Distichoselinum tenuifolium* produzidas por embriogénese somática. a) Plantação no JBUC. b) Doze meses após plantação. c) Plantas desenvolvidas após 14 meses. d) Plantas em floração e início de frutificação, decorridos 16 meses nos viveiros do JBUC.

3.2.3. *Angelica pachycarpa*

Seguindo a mesma metodologia descrita para os casos anteriores procedeu-se a ensaios *in vitro* de proliferação de meristemas axilares com BA e de indução de embriogénese somática com 2,4-D.

3.2.3.1. Proliferação de meristemas

Os ápices caulinares (Fig. 43b) foram isolados de plântulas de *Angelica pachycarpa* obtidas pela germinação de sementes colhidas em habitat natural (Fig. 43a). Inoculados em meio MS com BA (Tabela 23), nas mesmas condições descritas para *Daucus*, deram origem a rebentos caulinares (Fig. 43 c), num primeiro e segundo ciclos de 30 dias de cultura *in vitro* (Tabela 23).

Ao final do primeiro ciclo, as plântulas produzidas (Fig. 43c) foram cortadas e a parte basal (*stump*) foi cultivada nas mesmas condições de cultura, sendo as plântulas preparadas para a fase seguinte de enraizamento (Fig. 43d).

Os resultados indicam a produção de poucos rebentos caulinares, com uma média idêntica em todos os meios testados, incluindo o meio base. O meio contendo 2 mg/L BA

Resultados

apresentou a média mais elevada de rebentos caulinares (2,5 por explante) produzidos na primeira inoculação (Tabela 23).

Tabela 23: Formação *in vitro* de rebentos caulinares após duas inoculações dos ápices caulinares de *Angelica pachycarpa*.

BA (mg/L)	Número de rebentos caulinares por explante inoculado* (média)		Total de rebentos caulinares nos dois ciclos de cultura (média)
	1ª inoculação	2ª inoculação	
0	2,1	1,7	3,8
0,1	2,0	1,8	3,8
1	1,9	1,2	3,1
2	2,5	1,5	4,0

*Cada experiência foi repetida três vezes com 14 a 40 explantes por tratamento

3.2.3.2. Enraizamento e aclimação

Os rebentos caulinares isolados do explante foram cultivados em meio MS suplementado com 0,1 mg/L IBA para enraizamento. A formação de raízes foi observada (Fig. 43d) após 1,5 mês de cultura, sendo registada uma percentagem de enraizamento de 32,8% (de 58 rebentos produzidos 19 enraizaram).

Seguindo a metodologia descrita para *Daucus*, as plantas foram envasadas e instaladas nos viveiros, onde completaram o ciclo de vida.

3.2.3.3. Embriogénese somática

Segmentos de raízes e segmentos foliares (0,5-1cm comprimento) (Fig. 43b) cultivados em meios com 0,1 e 1 mg/L de 2,4-D produziram, após 2,5 meses de cultura, massas de calos (Fig. 43e) a partir dos quais se observou a formação de embriões somáticos (Fig. 43f).

Os calos embriogénicos foram produzidos em maior quantidade a partir das porções radiculares e estas culturas puderam ser mantidas nas mesmas condições por mais de um ano sem perda do seu potencial para originar embriões somáticos. Os calos foram mantidos *in vitro* com repicagens mensais em meio de indução suplementado com 2,4-D (0,1 e 1 mg/L). Quando transferidos para meios MS produziam de novo embriões somáticos ao final de 1,5 meses de cultura.

A percentagem de indução de calo foi avaliada nestas culturas (Tabela 24), em que a indução de embriões somáticos foi melhor sucedida em meio base quando as culturas provinham do meio 0,1 mg/L 2,4-D, do que com a maior concentração (51,25% e 25,8%, respetivamente) (Tabela 24).

Tabela 24: Indução de embriogénese somática em *Angelica pachycarpa*, em calos mantidos *in vitro* mais de um ano.

Meio de cultura	Nº de explantes (0,5-1cm, porções radiculares)	Nº de explantes com formação de calo	Nº de explantes com calo e embriões somáticos	Sem resposta	Nº de embriões somáticos (após subcultura em meio MS)	Indução (%)
0,1 mg/L 2,4-D	80	25	41	14	112	51,25
1 mg/L 2,4-D	89	48	23	18	69	25,8

Os embriões somáticos atingiram o estágio cotiledonar no meio suplementado com 2,4-D, sendo o desenvolvimento dos embriões somáticos muito assíncrono (Fig. 43f, 43g).

A conversão de embriões somáticos em plântulas foi melhor sucedida após um mês de cultura em meio base quando as culturas provinham do meio 0,1 mg/L 2,4-D do que com a maior concentração (53,4% e 33,3%, respetivamente) (Tabela 25).

Tabela 25: Germinação de embriões somáticos em *Angelica pachycarpa*, após um mês de cultura.

Meios de cultura	Nº de embriões somáticos	Nº embriões germinados em meio MS	Embriões germinados (%)
2,4-D (0,1 mg/L)	58	31	53,4
2,4-D (1mg/L)	27	9	33,3

Os embriões somáticos ou grupos de embriões somáticos com pequenas porções de calos (Fig. 43h) foram transferidos durante 2 meses para o meio base MS para prolongar a fase de crescimento dos embriões e conversão em plântulas.

As plântulas foram envasadas conforme metodologia descrita e ficaram em aclimação no fitotrão (fig.43 i), sendo posteriormente instaladas nos viveiros do jardim botânico (Fig. 43j).

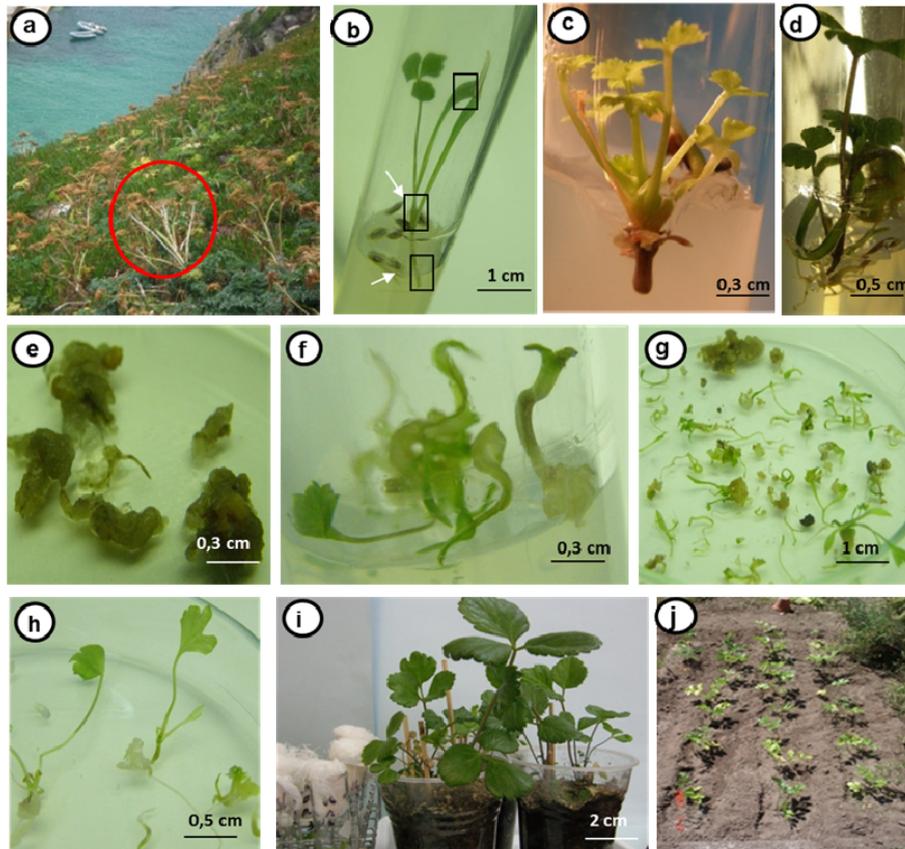


Figura 43: Micropropagação de *Angelica pachycarpa*. Multiplicação de meristemas (a a d) e embriogénese somática (e a j). a) Localização das plantas silvestres em habitat natural. b) Três tipos de explantes assinalados nas caixas: segmentos foliares, porções radiculares (seta) e ápice caulinar (seta). c) Produção de rebentos foliares a partir do ápice caulinar cultivado em BA. d) Enraizamento de uma dessas plântulas. e) Calo embriogénico formado em porções radiculares. f) Diferentes estágios de desenvolvimento de embriões somáticos. g) Embriões somáticos provenientes de uma só amostra/tubo de ensaio. h) Conversão de embriões somáticos em plântulas. i) Plantas envasadas após aclimação no fitotrão. j) Aclimação *ex situ*, nos viveiros do JBUC.

3.2.3.4. Aclimação *ex situ* e *in situ*

Os ensaios de transferência e instalação das plântulas derivadas dos embriões somáticos para condições de exterior foi bem sucedida durante dois anos (Figs. 44a-c) e observou-se a produção de sementes no segundo ano (Fig. 44c). Estas sementes recolhidas nos viveiro do jardim botânico estavam viáveis apresentando frequências de germinação *in vitro* de 42%, tendo sido utilizadas nas experiências seguintes de micropropagação e preservadas no banco de sementes do JBUC.



Figura 44: Aclimação *ex-situ* de plântulas de *Angelica pachycarpa* micropropagadas por embriogénese somática. a) Instalação e desenvolvimento das plantas em viveiro no final do 1º ano. b) Desenvolvimento das plantas no 2ºano. c) Produção de sementes.

Para a aclimação *in situ*, as primeiras plantas micropropagadas foram instaladas em maio de 2008 na ilha Berlenga, não tendo resisitido até junho desse ano. O processo foi repetido no ano seguinte, com a plantação realizada mais cedo, tentando a aclimação das plantas logo no início do ano.

No início de março de 2009 nove plantas envasadas provenientes de aclimação em exterior nos viveiros do JBUC, em resultado de embriogénese somática, foram transferidas para habitat natural (Fig.45a, 45b). Dois meses depois em maio do mesmo ano, cinco plantas estavam boas condições (Fig. 45c). No entanto, em maio do ano seguinte, 2010, todas as plantas tinham morrido, tendo sido instalados ninhos de gaivota nos campos de ensaio (Figs. 45d, 45e). Não tendo havido monitorização e acompanhamento periódico não foi possível a instalação bem sucedida, à semelhança das condições dos viveiros do JBUC.

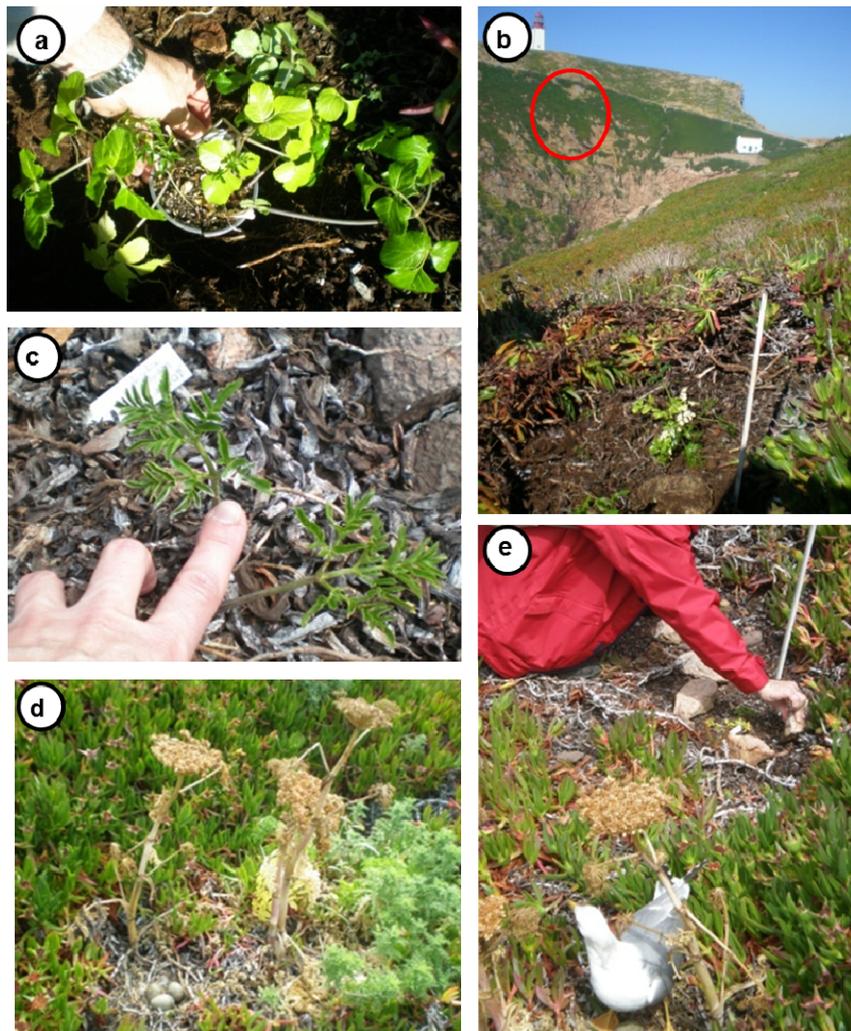


Figura 45: Aclimação *in situ* de *Angelica pachycarpa*. a) Primeira fase - instalação e sinalização de 10 plantas na primeira semana de março 2009. b) Localização dos campos de ensaio em frente da localização das plantas nativas, na direção do farol. c) Segunda fase - dois meses depois da instalação (maio 2009), cinco plantas sobreviveram em boas condições. d) Terceira fase - no ano seguinte as gaivotas nidificaram e apoderaram-se dos canteiros, eliminando todas as plantas, instaladas junto às plantas nativas, já frutificadas, em d) e e).

3.2.4. *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*

Sementes de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* foram recolhidas de plantas em habitat natural (Figs. 46a, 46b). Seguindo a metodologia descrita, segmentos foliares e o ápice caulinar (Fig. 46c) foram utilizados para a embriogénese e proliferação de meristemas *in vitro* em meios suplementados com 2,4-D (0-2mg/L) e com BA (0-2 mg/L), respetivamente.

3.2.4.1. Proliferação de meristemas

Decorridas quatro semanas de cultura do ápice caulinar (Fig. 46d) os resultados indicaram que a média de proliferação de rebentos formados, nos dois ciclos de 30 dias de cultura, aumentou com o aumento da concentração de BA (Tabelas 26 e 27; Fig. 46e). Relativamente ao primeiro conjunto de experiências foi atingido um máximo de 4,5 rebentos por explante, no meio contendo BA com a concentração de 2 mg/L (Tabela 26).

Num segundo conjunto de experiências, e após a remoção de todos os rebentos para enraizamento, a parte basal do explante (*stump*) (Fig. 46f) foi inoculado novamente (Fig. 46 g) no mesmo meio de cultura para um novo ciclo de multiplicação. O número de rebentos caulinares produzidos foi mais elevado nesta segunda fase de cultura (Fig. 46h), em todos os meios testados. O valor médio máximo (7,2 rebentos por explante) foi encontrado para a concentração de 2mg/L BA e o menor (2,6 rebentos por explante) foi observado usando a menor concentração de BA (0,1 mg/L) (Tabela 27).

A formação de um calo organogénico ocorreu na zona de corte do explante (Fig.46 g), dando origem a rebentos adventícios, o que contribuiu para o aumento do número total de rebentos formados.

Os rebentos caulinares puderam enraizar (Fig. 47a) depois de transferidos para meio base MS, apenas quando o pH foi aumentado para valores entre 6,0-6,4. As plântulas obtidas eram morfológicamente idênticas às plantas silvestres

Tabela 26: Efeito da concentração de BA sobre a proliferação de rebentos em ápices caulinares de *Seseli montanum subsp. peixotoanum*, após 4 semanas de cultura.

BA (mg/L)	Nº de explantes cultivados	Indução (%)	Nº de rebentos/explante*
0	6	100	0,67 ± 0,33
0,1	31	100	3,25 ± 0,17
1	30	100	4,46 ± 0,63
2	30	100	4,45 ± 0,23

*Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas.

Resultados

Tabela 27: Efeito da concentração de BA sobre a proliferação de rebentos em ápices caulinares de *Seseli montanum subsp. peixotoanum*, num segundo ciclo de proliferação.

BA (mg/L)	Nº de explantes cultivados	Indução (%)	Nº de rebentos/explante*
0	0	100	0 ± 0
0,1	31	100	2,5 7± 0,39
1	22	100	5,62 ± 0,50
2	22	100	7,20 ± 1,74

*Cada valor é a média com erro padrão de três réplicas.

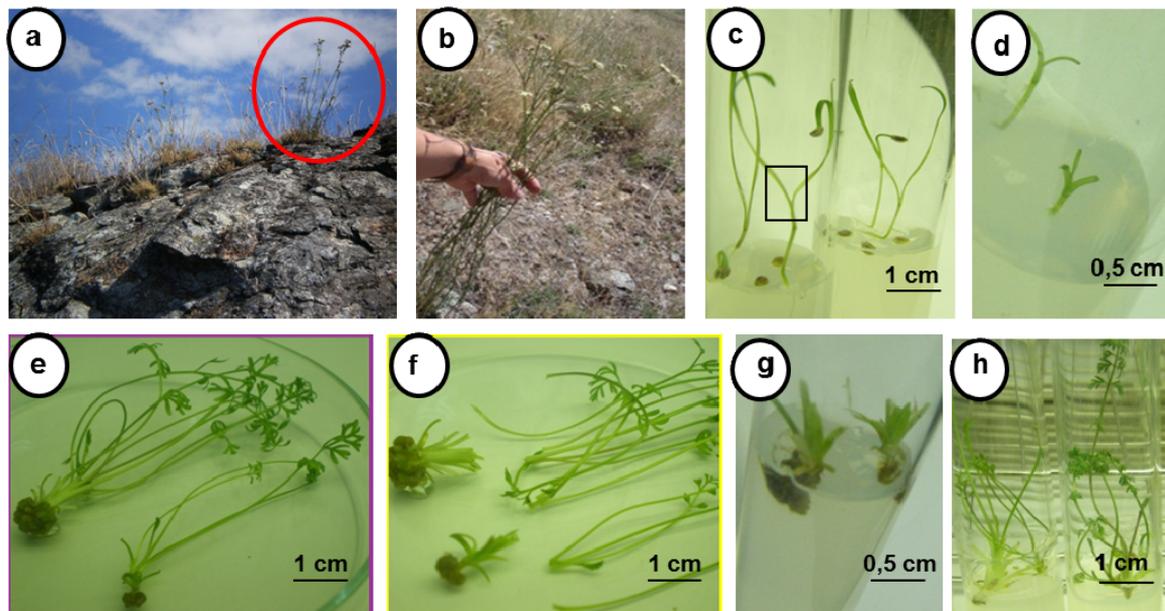


Figura 46: Micropropagação de *Seseli montanum subsp. peixotoanum* por proliferação de meristemas. a) Planta em habitat natural, nas rochas ultrabásicas. b) Planta em habitat natural, em maior ampliação. c) Indicação do ápice caulinar na plântula. d) Explante no início do 1º ciclo de 30 dias de cultura. e) Proliferação de rebentos foliares decorridos 30 dias, provenientes de meio com maior concentração à esquerda e com menor à direita. f) Corte do *stump*. g) Segunda inoculação. h) Produção de rebentos caulinares após a segunda inoculação.

3.2.4.2. Enraizamento e aclimação *ex situ*

Os rebentos caulinares (2-3 cm) foram isolados e transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento. A formação de raízes foi observada (Fig.47a) apenas em meio MS com pH ajustado para 6,2-6,4. De seguida as plantas foram retiradas dos tubos, limpas e mantidas em água (Fig. 47b) para aclimação durante uma semana, antes de serem

transferidas para vasos e instaladas no fitotrão. Cerca de 40% das plântulas sobreviveram (10 em 23) e foram posteriormente transferidas para viveiro (Fig.47c).

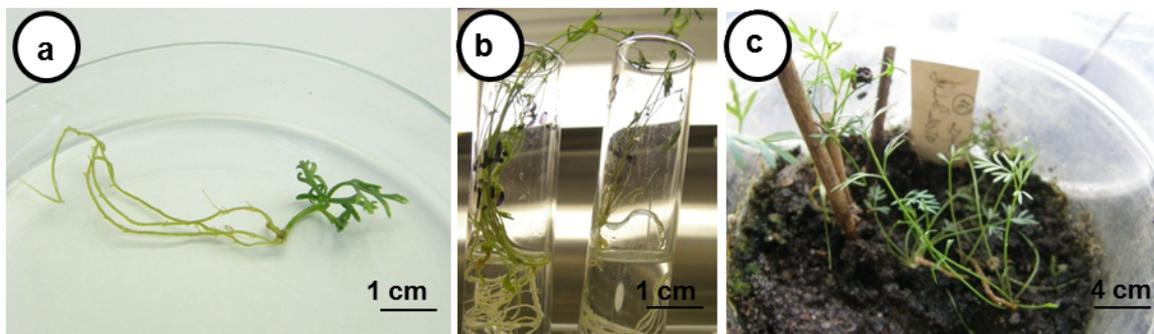


Figura 47: Enraizamento e envasamento de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* micropropagado por proliferação de meristemas. a) Rebento enraizado. b) Plântula mantida em água para aclimação. c) Plântulas envasadas.

3.2.4.3. Embriogénese somática

De acordo com os procedimentos descritos, os segmentos foliares (0,5-1 cm) provenientes da germinação *in vitro* das sementes de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* colhidas em habitat natural (Fig. 46a, 4ab) foram cultivados em meio MS contendo 2,4-D (0,1, 1 e 2 mg/L 2,4-D). Os explantes cultivados nestas condições produziram calos embriogénéticos (Fig. 48a) decorridos 4 meses de cultura (Tabela 28). A maior percentagem de calos (63%) foi produzida no meio com 2 mg/L, registando-se a menor percentagem na menor concentração de 2,4- D (Tabela 28).

Os calos nodulares (Fig. 48a) foram repicados para meios com igual composição, onde os primeiros embriões somáticos se formaram no meio 0,1 mg/L de 2,4-D, decorridos 4 meses de cultura. Nesta altura, avaliou-se a formação de embriões somáticos em todos os meios.

No meio com a concentração de 0,1 mg/L de 2,4-D formaram-se, em oito tubos de ensaio (equivalente a 8 amostras de calo) uma média de 31 embriões somáticos; no meio com 1 mg/L 2,4-D apenas se formaram, no total, 28 embriões (Tabela 28); no meio com 2 mg/L de 2,4-D não houve registo de embriões somáticos no mesmo período de cultura (Tabela 28).

Nas culturas em meios com 0,1 ou 1mg/L de 2,4-D, os embriões somáticos foram transferidos para meio com MS, para desenvolvimento dos embriões (Fig. 48d); os calos

Resultados

nodosos, com possíveis embriões ainda incipientes, do meio com 2 mg/L 2,4-D foram subcultivados no mesmo meio. Decorridos 3 meses de cultura foram produzidas 66 plântulas no meio com 1 mg/L e 282 plântulas no meio com 0,1 mg/L (Tabela 29), como se descreve de seguida.

Foi feita uma extrapolação baseada no número de embriões germinados a partir dos calos iniciais após 4 meses de cultura. Assim, o meio de indução com a menor concentração de 2,4-D (0,1 mg/L) foi o mais eficaz e produziu a maior profusão de embriões somáticos em menos tempo (Tabela 28), tendo sido por isso para a estimativa do potencial embriogénico.

Tabela 28: Embriogénese somática em segmentos foliares de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*, sob a ação de diferentes concentrações de 2,4-D.

Etapas para contabilização/meses				
2,4 D (mg/L)	1 ^a /0	2 ^a /4	3 ^a /4	4 ^a /3
	Nº explantes	Nº callos	Nº embriões somáticos	Nº de plântulas germinadas
0,1	100	38	(em média =31 embriões somáticos por amostra)*	Ver tabela 29
1	100	42	28	66
2	100	61	0	Nódulos embriogénicos

Avaliou-se o processo de indução em oito amostras, encontrando uma média de 31 embriões (por tubo/calos) após 4 meses de cultura. Seguimos, durante 3 meses a evolução do material repicado para meio sem hormona, das séries correspondentes a 3 tubos de ensaio, que contabilizámos. Calculámos uma média dos valores nestes 3 casos que utilizámos para estimar os valores de indução (Tabela 29).

Tabela 29: Estimativa de plântulas produzidas por embriogénese somática em segmentos foliares de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*, cultivados *in vitro* em 0,1 mg/L 2,4-D

Nº embriões somáticos formados (por amostra)*	Repicagens dos embriões para MS	Nº de plântulas germinadas após 3 meses
Amostra 1 – 30	Embriões da amostra 1 - 13 tubos	351
Amostra 2 – 26	Embriões da amostra 2 - 15 tubos	405
Amostra 3 – 36	Embriões da amostra 3 - 12 tubos	324
Média de 1 a 3 = 31 embriões somáticos por amostra	Média - 13 tubos	Média de 1 a 3 = 360 plântulas - 360 / 13 tubos = 28 plântulas

Estas contagens e estimativas pretenderam aproximar os valores esperados para valores corrigidos pela extrapolação feita. Assim, em média, podem ser produzidas cerca de 28 plântulas (Tabela 29), decorridos 7 meses de cultura, de cada tubo de ensaio e amostra de calo embriogénico onde se produziram embriões somáticos. Embora não tenha havido pesagens das amostras dos calos como em *Daucus*, as dimensões eram idênticas às de *Daucus* (0,29 mg),

Observou-se, nalguns casos, a produção de grande quantidade de embriões somáticos na mesma amostra de material vegetal (Fig. 48c).

Os embriões somáticos desenvolveram-se ainda no meio com 2,4-D (Fig. 48b) e foram depois transferidos para um meio sem auxina, onde decorridos 3 meses de cultura, originaram plântulas (Fig. 48d), que foram preparadas para envasamento (Fig. 48 e) de seguida..

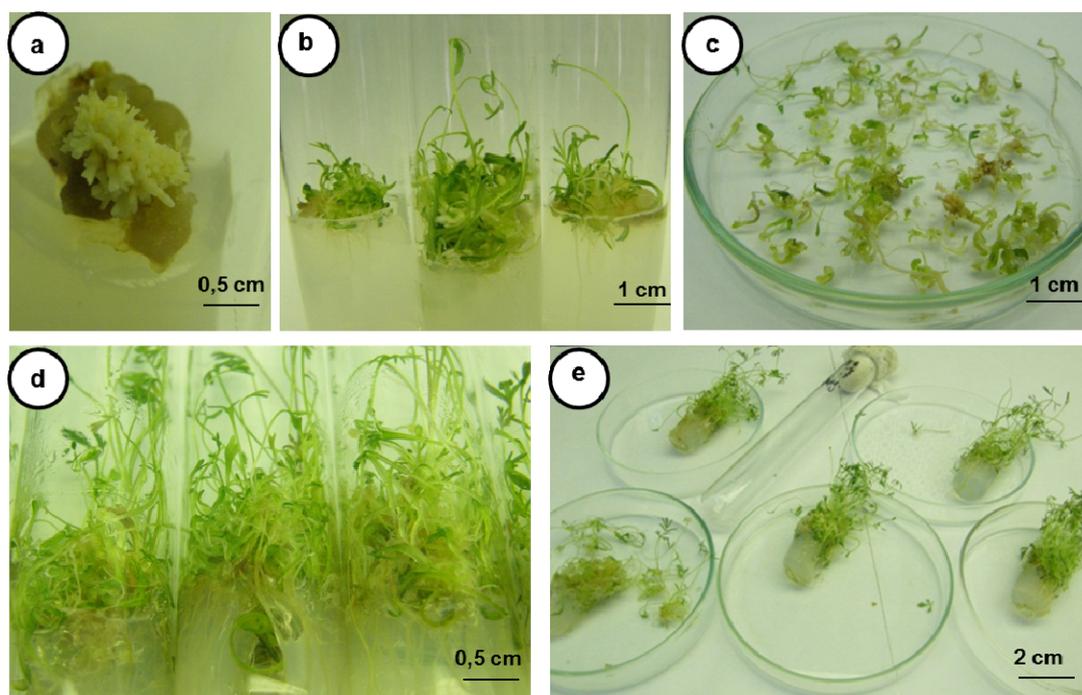


Figura 48: Micropropagação de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* por embriogénese somática. a) Formação calo e indução de embriões somáticos. b) Germinação de embriões. c) Embriões provenientes de uma só amostra. d) Plântulas resultantes do desenvolvimento de embriões somáticos em meio base. e) Plântulas retiradas dos tubos de ensaio para preparação para o envasamento.

Resultados

As plântulas formadas eram muito finas e pequenas pelo que foram submetidos a um período mais longo de germinação em meio base sem o que rapidamente necrosavam, em especial no sistema radicular. Todos os meios tinham a particularidade do pH ajustado a valores entre 6,2- 6,4. Cerca de 50% das plântulas formadas foram envasadas em boas condições (10 plantas em 20).



Figura 49: Aclimação *ex situ* de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*. a) Plantas produzidas por embriogénese somática em aclimação no viveiro do JBUC. b) Plantação de Apiaceae raras na escola médica do JBUC - ações de sensibilização para a conservação da biodiversidade. c) Planta micropropagada por multiplicação de meristemas, aclimatizada na escola médica, com produção de flores e frutos, visíveis em (d).

As plântulas produzidas *in vitro* por embriogénese somática (Fig. 49a) e por proliferação de meristemas (Fig. 47) foram aclimatadas em condições de exterior nos viveiros (Fig. 49a) e nos terraços da escola médica do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (Fig. 49b, 49c, 49d), onde um exemplar já produziu flor e fruto (Fig. 49d).

3.2.5. *Eryngium duriaei*

3.2.5.1. Proliferação de meristemas

Embriões zigóticos retirados *in vitro* de sementes de *Eryngium duriaei* colhidas em duas localidades, Mata da Margarça e Serra da Estrela (Figs. 50a, 50b) originaram plântulas (Fig. 50c) decorridos 30 dias de cultura em meio base MS. O ápice caulinar destas plântulas foi cortado e cultivado em meio com 0,2 mg/L BA ocorrendo a produção de rebentos foliares (Fig. 50d) decorridos cerca de três meses de cultura *in vitro*.

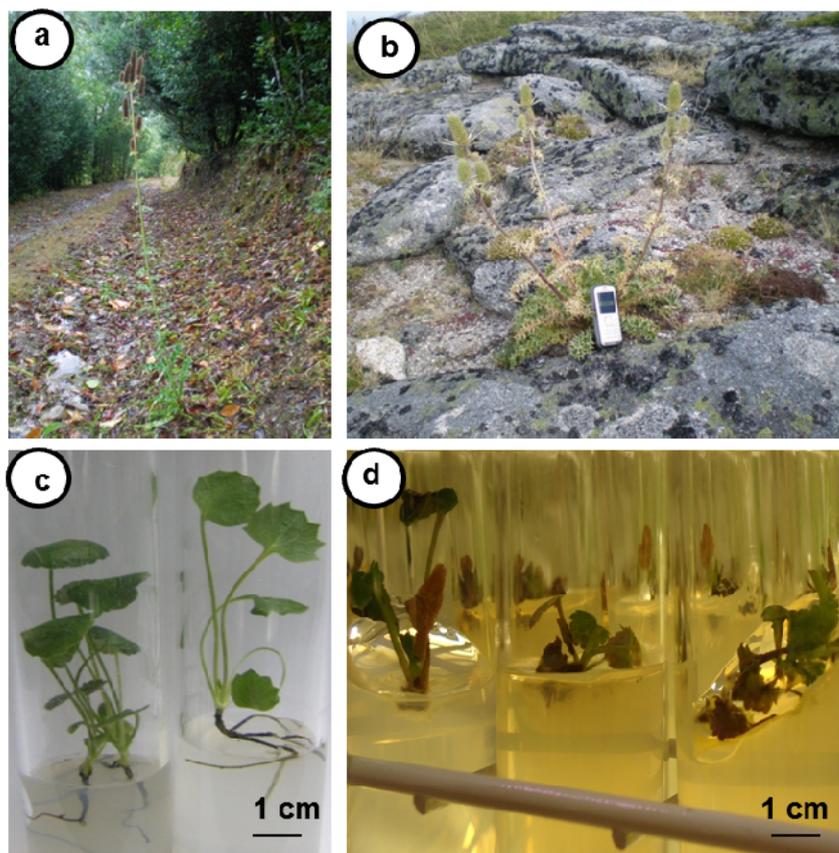


Figura 50: Cultura *in vitro* de *Eryngium duriaei*. Plantas de *Eryngium duriaei* em habitat natural onde se colheram as sementes: a) Mata da Margarça. b) Serra da Estrela. c) Plântulas *in vitro* decorridos 30 dias. d) Proliferação de rebentos caulinares a partir da cultura, em meio base com 0,2 mg/L BA, do ápice caulinar das plântulas cultivadas *in vitro* (em c).

3.2.6. Conservação *in vitro*, *ex situ* e *in situ* – avaliação final

Os quatro *taxa* mais vulneráveis, *Daucus carota* subsp. *halophilus*, *Angelica pachycarpa*, *Distichoselinum tenuifolium* e *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* foram propagados e mantidos *in vitro* (Tabela 30). Para cada *taxon* foram aplicadas duas técnicas de micropropagação, embriogénese somática e multiplicação de meristemas. Ensaio

deorganogénese foram também realizados em *Distichoselinum tenuifolium*, tendo sido iniciada a cultura *in vitro* de *Eryngium duriaei*.

A seguinte tabela resume os melhores resultados obtidos nos diferentes casos para o tipo de explante, reguladores de crescimento e metodologia utilizados.

Tabela 30: Resultados dos protocolos otimizados para a micropropagação dos quatro endemismos mais vulneráveis das Apiaceae endémicas ibéricas, representadas em Portugal.

Técnicas de micropropagação/ Meio de cultura-explante	<i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	<i>Angelica pachycarpa</i>	<i>Distichoselinum tenuifolium</i>	<i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i>
Embriogénese somática	0,1 mg/L 2,4-D Segmentos foliares	0,1 mg/L 2,4-D Segmentos de raiz	1 mg/L 2,4-D Segmentos foliares	1 mg/L 2,4-D Segmentos peciolares
Multiplicação de meristemas	2 mg/L BA Ápice caulinar	2 mg/L BA Ápice caulinar	2 mg/L BA Ápice caulinar	2 mg/L BA Ápice caulinar
Organogénese	-	-	2 mg/L BA Segmentos foliares	-

A conservação *ex situ* dos quatro taxa mais vulneráveis foi conseguida pela preservação em banco de sementes do JBUC e outras instituições congéneres e pela aclimatização das plantas micropropagadas em estufa e posterior integração das plantas nas coleções vivas do JBUC, viveiros e canteiro da escola médica, onde algumas já completaram o ciclo de vida.

Todos os taxa foram igualmente integrados no Herbário COI.

A instalação *in situ* foi bem-sucedida para as plantas micropropagadas de *Daucus carota* subsp. *halophilus*, que completaram o ciclo de vida em habitat natural originando plantas com sementes viáveis, que foram retiradas e preparadas para ser integradas em Herbário COI.

A instalação de *Angelica pachycarpa* foi conseguida nos viveiros do JBUC produzindo sementes viáveis, que foram posteriormente utilizadas nas culturas *in vitro* e preservadas no banco de sementes. A curto prazo a instalação *in situ* foi positiva, pois cinco das nove plantas demonstravam boas condições após dois meses de plantação, mas no ano seguinte não resistiram, em grande parte devido à intervenção negativa da imensa população de gaiótas que se instalou na zona de plantação incompatibilizando a manutenção das plantas vivas.

Seseli e *Distichoselinum* apenas se instalaram *ex situ* nas coleções vivas do JBUC, onde completaram o ciclo de vida, conforme referido, não tendo ainda sido ensaiada a instalação *in situ*, que contudo será menos urgente que nas outras duas espécies, cujas populações nativas são em quantidade mais reduzida.

3.3. CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Seguindo a metodologia descrita na secção respetiva (2.3.) procedeu-se à colheita de plantas para extração, caracterização e estudo da atividade antifúngica dos óleos essenciais.

3.3.1. *Daucus carota* subsp. *halophilus*

3.3.1.1. Composição química

Os óleos essenciais de *Daucus carota* subsp. *halophilus* foram extraídos com rendimentos de 0,4% para as umbelas em antese e variando entre 0,6% e 1% (v/p) nas umbelas com frutos maduros.

Os óleos foram analisados por CGL e CGL-EM e a composição qualitativa e quantitativa está apresentada na Tabela 31, onde os compostos estão listados em ordem de eluição na coluna de polidimetilsiloxano.

A composição dos óleos obtidos a partir de umbelas colhidas em duas localidades diferentes do Algarve (Cabo de S. Vicente e Arrifana) é no geral semelhante. No entanto, existem algumas diferenças importantes entre os óleos, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, particularmente na quantidade de fenilpropanóides. As amostras obtidas de umbelas em antese são predominantemente constituídas por hidrocarbonetos monoterpénicos (64,9-76,8%), sendo o sabineno o principal constituinte (28,3-33,8%), enquanto os principais compostos dos óleos obtidos a partir das umbelas com frutos maduros são a elemicina (26-31%) e o sabineno (27,6-29%). A elemicina atinge apenas 6,2% e 5,9%, respetivamente, nos óleos obtidos de umbelas em antese (amostras 1 e 3).

Tabela 31: Composição química dos óleos essenciais de *Daucus carota* subsp. *halophilus* no Algarve: Cabo de S. Vicente e Arrifana (amostras 1 e 3 – umbelas em antese; amostras 2 e 4 – umbelas com frutos maduros).

IR ^a	IR ^b	Compostos ^a	Percentagem (%)			
			Cabo de S. Vicente		Arrifana	
			1	2	3	4
922	1030	α -Tujeno	0,4	0,3	0,4	0,2
930	1030	α -Pinoeno	12,6	10,1	16,0	12,2
943	1073	Canfeno	0,5	0,5	1,0	0,3
964	1128	Sabineno	28,3	27,6	33,8	29,0
970	1118	β -Pinoeno	2,3	2,8	5,1	2,5
980	1161	Mirceno	3,2	2,6	4,7	2,0
997	1171	α -Felandreno	v	v	0,1	0,1
1010	1187	α -Terpineno	1,4	0,4	1,4	0,3
1011	1275	<i>p</i> -Cimeno	0,1	0,3	0,1	0,2
1020	1206	Limoneno	11,8	6,5	11,0	5,5
1020	1215	β -Felandreno	0,5	0,2	v	0,1
1025	1235	<i>Z</i> - β -Ocimeno	0,5	0,2	0,2	0,1
1035	1250	<i>E</i> - β -Ocimeno	0,1	v	v	v
1046	1249	γ -Terpineno	2,6	0,8	2,3	1,0
1050	1458	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	0,2	0,4	0,3	0,3
1076	1288	Terpinoleno	0,5	0,2	0,6	0,2
1081	1543	Linalol	0,5	1,1	1,2	1,0
1081	1542	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	0,1	0,1	0,2	0,1
1105	1556	<i>cis-p</i> -2-Menteno-1-ol	0,3	0,2	0,4	0,1
1118	1515	Cânfora	–	0,1	v	–
1120	1620	<i>trans-p</i> -2-Menteno-1-ol	0,2	0,1	v	v
1135	1553	Pinocarvona	–	0,1	v	v
1144	1695	Borneol	–	v	v	v
1158	1597	Terpineno-4-ol	4,8	2,1	4,1	2,0
1169	1692	α -Terpineol	0,3	0,2	0,3	0,2
1177	1673	<i>cis</i> -Piperitol	v	0,1	v	v
1187		<i>trans</i> -Piperitol	v	–	v	v
1264	1574	Acetato de bornilo	0,2	0,3	0,6	0,1
1330		δ -Elemeno	0,3	0,4	0,6	0,4
1328	1688	α -Acetato de terpenilo	0,4	0,1	0,1	0,1
1346		α -Longipineno	0,3	0,1	v	0,1
1369	1487	α -Copaeno	v	v	v	0,1

1369	2006	Metileugenol	0,3	0,1	0,1	t
1383	1586	β -Elemeno	v	0,1	v	0,1
1405	1563	α -Cedreno	0,3	0,1	v	0,1
1411	1563	Aristoleno	0,2	0,2	v	v
1411	1590	<i>E</i> - β -Cariofileno	1,4	0,8	0,6	0,5
1442	1662	α -Humuleno	0,1	0,1	v	v
1446	1661	<i>trans</i> - β -Farnesol	0,3	0,2	v	v
1461	2219	<i>E</i> -Metiliso Eugenol	7,4	6,9	0,7	0,5
1466	1699	Germacreno D	0,3	0,2	0,1	0,1
1484	1724	Biciclogermacreno	0,3	0,2	0,3	0,2
1489		β -Himachaleno	0,3	0,1	0,1	0,1
1498	1720	β -Bisaboleno	5,3	1,8	0,4	0,4
1508	1751	δ -Cadineno	0,6	0,2	0,3	0,2
1518		Elemicina	6,2	26,0	5,9	31,0
1530	1766	<i>E</i> - α -Bisaboleno	0,3	0,2	v	0,1
1542	1816	Germacreno B	0,2	0,1	v	0,1
1557	1968	Óxido de Cariofileno	0,1	0,3	0,3	0,2
1618	2174	T-Muurolol	0,3	0,2	v	v
1630	2219	T-Cadinol	0,1	0,2	0,1	0,1
1630	2216	α -Cadinol	0,7	0,2	0,2	0,1
1663		β -Bisabolol	0,1	0,1	v	v
1668		Cânfora de juniperus	0,7	0,6	0,3	0,2
1777		Isocalamendiol	0,3	0,3	0,1	0,1
		Hidrocarbonetos monoterpénicos	64,9	52,6	76,8	53,8
		Monoterpenos oxigenados	7,1	5,0	7,5	4,0
		Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	10,0	4,6	2,8	2,7
		Sesquiterpenos oxigenados	2,6	2,1	1,2	0,8
		Fenilpropanoides	13,9	33,0	6,7	31,6
		Total identificado	98,5	97,3	95,0	92,9

v: vestígios (< 0.05 %); IR^a: Índices de retenção na coluna SPB-1; IR^b: Índices de retenção na coluna SupelcoWax-10.

^a Compostos ordenados por ordem de eluição na coluna SPB-1.

Parte do material propagado *in vivo* e *in vitro* foi utilizado para a caracterização dos óleos essenciais. Conforme referimos, a utilização de plantas micropropagadas permite a obtenção dos óleos de material vegetal a crescer em condições controladas, contribuindo simultaneamente para uma maior uniformidade dos óleos obtidos e para uma redução dos impactes ambientais negativos resultantes de uma recolha abusiva de plantas no campo.

Resultados

Assim, as plantas micropropagadas de *Daucus carota* subsp. *halophilus* e instaladas nos viveiros do JBUC, completaram o ciclo de vida formando umbelas com frutos maduros que foram utilizadas para a extração dos óleos, seguindo a mesma metodologia, tendo-se observado que tinham composição química idêntica às plantas silvestres.

3.3.1.2. Atividade antifúngica

Os óleos mostraram uma variabilidade de inibição para os vários fungos testados, como se pode observar na Tabela 32. Os dermatófitos mostraram maior sensibilidade para estes óleos quando comparados com as leveduras e outros fungos filamentosos. A amostra com teores elevados de elemicina (amostra 2) mostrou ser a mais ativa com valores de CMI e CML entre 0,16 e 0,32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 0,32 e 0,64 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respetivamente (Tabela 32).

Tabela 32: Atividade antifúngica (CMI e CML) dos óleos de *Daucus carota* subsp. *halophilus* contra estirpes de leveduras, dermatófitos e *Aspergillus* (amostra 1 – umbelas em antese; amostra 2 – umbelas com frutos maduros).

Estirpes	Amostra 1		Amostra 2		Fluconazol		Anfotericina B	
	CMI ^a	CML ^a	CMI ^a	CML ^a	CMI ^b	CML ^b	CMI ^b	CML ^b
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,5	2,5	1,25	1,25	1	>128	N.T. ^c	N.T.
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	2,5	2,5	1,25	1,25	4	>128	N.T.	N.T.
<i>Candida krusei</i> H9	2,5	2,5	2,5	2,5	64	64-128	N.T.	N.T.
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	1,25	1,25	1,25	1,25	8	8	N.T.	N.T.
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	1,25	2,5	1,25	2,5	<1	<1	N.T.	N.T.
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0,32	0,64	0,32- 0,64	1,25	16	128	N.T.	N.T.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	0,64	0,64- 1,25	0,16- 0,32	0,64	16-32	32-64	N.T.	N.T.
<i>Microsporium canis</i> FF1	0,64	0,64	0,32	0,32	128	128	N.T.	N.T.
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	0,64	0,64- 1,25	0,32	0,32- 0,64	16	64	N.T.	N.T.
<i>Microsporium gypseum</i> CECT 2905	0,64	0,64- 1,25	0,32	0,64	128	>128	N.T.	N.T.

<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0,64	0,64	0,32	0,32	16	16	N.T.	N.T.
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	1,25	>20	10	>20	N.T.	N.T.	1-2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	1,25	≥20	2,5	>20	N.T.	N.T.	2	4
<i>Aspergillus flavus</i> F44	2,5	>20	20	>20	N.T.	N.T.	2	8

Resultados obtidos em três experiências independentes desenvolvidas em duplicado.

^a CMI e CML determinados pelo método de macrodiluição e expressos em microlitro por mililitro (v/v).

^b CMI e CML determinados pelo método de macrodiluição e expressos em micrograma por mililitro (p/v).

^c Não testado.

3.3.2. *Distichoselinum tenuifolium*

3.3.2.1. Composição química

Os óleos essenciais de *Distichoselinum tenuifolium* foram extraídos com rendimentos de 1% para umbelas em antese e variando entre 2% e 2,6% para as umbelas com frutos maduros (v/p).

A composição qualitativa e quantitativa dos óleos está apresentada na Tabela 33, onde os constituintes químicos estão listados em ordem de eluição numa coluna de polidimetilsiloxano.

Em geral, a composição dos óleos obtidos das plantas colhidas em dois locais diferentes do Algarve (Moncarapacho e Burgau) e em estádios diferentes de desenvolvimento da planta é semelhante. As amostras são predominantemente compostas por hidrocarbonetos monoterpénicos (86,2-93,1%), sendo o principal composto o mirceno (47,7-84,6%), com a maior concentração nos óleos obtidos a partir das umbelas com frutos maduros. Algumas diferenças qualitativas foram observadas especialmente no limoneno, que atingiu uma percentagem importante nos óleos nas plantas obtidas na localidade de Burgau (13,6-19,9%).

Resultados

Tabela 33: Composição dos óleos essenciais de *Distichoselinum tenuifolium* (amostras 1 e 3 - umbelas em antese; amostras 2 e 4 - umbelas com frutos maduros).

IR ^a	IR ^b	Compostos ^a	Percentagem (%)			
			Moncarapachoo		Burgau	
			1	2	3	4
921	1016	Triciclono	v	v	v	v
922	1030	α -Tujeno	0,1	v	0,3	0,2
930	1030	α -Pineo	1,3	0,8	0,6	1,2
943	1073	Canfeno	0,1	0,1	v	v
964	1128	Sabineno	2,2	0,2	11,0	6,0
970	1118	β -Pineo	0,9	0,7	0,7	1,1
980	1161	Mirceno	77,4	84,6	47,7	59,2
997	1171	α -Felandreno	0,6	0,3	0,3	v
1010	1187	α -Terpineno	0,4	0,1	1,1	v
1011	1275	<i>p</i> -Cimeno	0,3	0,1	0,3	1,0
1020	1206	Limoneno	5,6	1,5	19,9	13,6
1020	1215	β -Felandreno	1,4	0,2	1,2	1,7
1046	1249	γ -Terpineno	0,7	0,1	2,7	v
1050	1458	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	v	v	0,2	v
1076	1288	Terpinoleno	2,0	0,5	1,5	v
1081	1543	Linalol	0,3	0,1	v	0,2
1081	1542	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	v	v	0,2	v
1084		Perileno	v	0,1	v	1,9
1145	1666	Criptona	v	v	v	0,1
1157	1839	<i>p</i> -Cimeno-8-ol	v	v	v	0,3
1158	1597	Terpineno-4-ol	0,9	0,1	4,1	1,5
1169	1692	α -Terpineol	v	v	0,2	v
1194	1824	<i>trans</i> -Carveol	v	v	v	0,2
1203	1467	Acetato de fenchilo	0,1	0,2	v	v
1206		Timil metil óxido	v	0,1	v	0,5
1210	1724	Carvona	v	v	v	0,4
1328	1688	α -Acetato de terpenilo	v	0,1	v	0,2
1369	1487	α -Copaeno	2,9	v	3,8	v
1466	1699	Germacreno D	0,6	0,5	0,6	v
1508	1751	δ -Cadineno	0,1	v	0,1	v
1542		<i>trans</i> -Nerolidol	v	0,2	v	0,2
1618	2174	T-Muurolol	v	0,1	v	v
1622	2212	β -Eudesmol	v	0,1	v	v
1630	2216	α -Cadinol	v	0,2	0,2	v

1639	2197	Bulnesol	v	v	0,3	v
		Hidrocarbonetos monoterpênicos	93,1	89,4	87,4	86,2
		Monoterpenos oxigenados	1,7	0,9	5,1	3,6
		Hidrocarbonetos sesquiterpênicos	3,6	0,6	4,5	0,2
		Sesquiterpenos oxigenados	0,2	0,6	0,7	0,4
		Total identificado	98,6	91,5	97,7	90,4

v: vestígios (< 0.05 %); IR^a: Índices de retenção na coluna SPB-1; IR^b: Índices de retenção na coluna SupelcoWax-10.

^a Compostos ordenados por ordem de eluição na coluna SPB-1.

3.3.2.2. Atividade antifúngica

A avaliação da CMI e CML do óleo mostrou uma variabilidade de inibição contra os vários fungos testados (Tabela 34). Os dermatófitos e *Cryptococcus neoformans* mostraram ser mais sensíveis para este óleo do que as espécies de *Candida* e *Aspergillus*, com valores de CMI e CML que variaram entre 0,32 µL/mL e 1,25 µL/mL (Tabela 34).

Paralelamente foi avaliada a atividade antifúngica do mirceno, o principal composto do óleo essencial, tendo-se observado que o óleo tem maior atividade que o mirceno.

Tabela 34: Atividade antifúngica (CMI e CML) do óleo de *Distichoselinum tenuifolium* e do mirceno contra estirpes de leveduras, dermatófitos e *Aspergillus*.

Estirpes	Óleo essencial		Mirceno		Fluconazol		Anfotericina B	
	CMI ^a	CML ^a	CMI ^a	CML ^a	CMI ^b	CML ^b	CMI ^b	CML ^b
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,5	5	5,0–10,0	> 20,0	1	> 128	N.T. ^c	N.T.
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	5	5	20,0	> 20,0	4	> 128	N.T.	N.T.
<i>Candida krusei</i> H9	5	5	10,0	20,0	64	64–128	N.T.	N.T.
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	2,5	2,5–5	2,5	> 20,0	8	8	N.T.	N.T.
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2,5	5–10	2,5	> 20,0	< 1	< 1	N.T.	N.T.
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0,32–0,64	0,64	0,64	0,64–1,25	16	128	N.T.	N.T.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	0,64	1,25	5,0	5,0	16–32	32–64	N.T.	N.T.
<i>Microsporum canis</i> FF1	0,64	0,64	1,25–2,5	1,25–2,5	128	128	N.T.	N.T.

Resultados

<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	0,64	1,25	2,5	2,5	16	64	N.T.	N.T.
<i>Microsporium gypseum</i> CECT 2905	1,25	1,25	5	5	128	> 128	N.T.	N.T.
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0,64	0,64	1,25	2,5	16	16	N.T.	N.T.
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	2,5	> 20	> 20	> 20	N.T.	N.T.	1-2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	2,5	> 20	≥20,0	> 20,0	N.T.	N.T.	2	4
<i>Aspergillus flavus</i> F44	20	≥20	> 20,0	> 20,0	N.T.	N.T.	2	8

Resultados obtidos em três experiências independentes desenvolvidas em duplicado.

^a CMI e CML determinados pelo método de macrodiluição e expressos em microlitro por mililitro (v/v).

^b CMI e CML determinados pelo método de macrodiluição e expressos em micrograma por mililitro (p/v).

^c Não testado.

3.3.3. *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*

3.3.3.1. Composição química

Os óleos essenciais de *S. montanum* subsp. *peixotoanum* foram extraídos com rendimentos de 0,5% (v/p). A composição qualitativa e quantitativa dos óleos está apresentada na Tabela 35, onde os constituintes químicos estão listados em ordem de eluição numa coluna de polidimetilsiloxano.

Os hidrocarbonetos monoterpénicos são o principal grupo de componentes (79,2-80,9%). Os principais constituintes dos óleos de *S. montanum* subsp. *peixotoanum* são α -pineno (36-37,1%), β -pineno (22,5-23,6%) e limoneno (7,7-8,8%).

Tabela 35: Composição dos óleos essenciais de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*.

IR ^a	IR ^b	Compostos ^a	Percentagem (%)	
			1 (Samil)	2 (Alimonde)
921	1028	Triciclono	v	0,1
930	1029	α -Pineno	36,0	37,1
943	1063	α -Fenchona	0,1	0,1
943	1072	Canfeno	3,1	2,9
943	1127	Verbeneno	0,1	0,2
964	1123	Sabineno	0,8	0,7
969	1116	β -Pineno	22,5	23,6
977	1161	Mirceno	6,5	7,0

1005	1152	α -Felandreno	0,1	0,1
1012	1272	<i>p</i> -Cimeno	0,1	0,2
1021	1201	Limoneno	8,8	7,7
1021	1210	β -Felandreno	0,6	0,5
1027	1233	<i>E</i> - β -ocimeno	0,1	0,2
1035	1249	<i>Z</i> - β -ocimeno	0,2	0,3
1047	1249	γ -Terpineno	v	v
1076	1288	Terpinoleno	v	0,1
1082	1542	Linalol	0,1	0,2
1120	1639	Pinocarveol	0,2	0,2
1134	1556	Pinocarvona	0,1	0,2
1158	1595	Terpineno-4-ol	0,2	0,2
1164	1615	Mirtenal	0,1	0,1
1169	1689	α -Terpineol	0,3	0,2
1175	1842	Mirtenol	0,1	0,2
1382	1580	β -Elemeno	5,8	5,2
1408	1590	<i>E</i> - β -Cariofileno	0,2	0,3
1467	1699	Germacreno-D	0,8	0,8
1471	1707	β -Selineno	0,4	0,6
1481	1717	Biciclogermacreno	0,9	1,0
1482	1701	α -Selineno	0,7	0,6
1490	1746	Germacreno A	1,6	1,8
1497	1746	γ -Cadineno	v	v
1506	1746	δ -Cadineno	0,3	0,1
1557	1964	Óxido de cariofileno	0,5	0,2
		Hidrocarbonetos monoterpénicos	79,2	80,9
		Monoterpenos oxigenados	1,1	1,3
		Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	10,7	10,4
		Sesquiterpenos oxigenados	0,5	0,2
		Total identificado	91,5	92,8

v: vestígios (< 0.05 %); IR^a: Índices de retenção na coluna SPB-1; IR^b: Índices de retenção na coluna SupelcoWax-10.

^a Compostos ordenados por ordem de eluição na coluna SPB-1.

3.3.3.2. Atividade antifúngica

De um modo geral este óleo mostrou ser pouco ativo para a maioria das estirpes, como se pode observar na Tabela 36. A estirpe que mostrou ser mais sensível foi o *Epidermophyton floccosum* com valores de CMI de 0,64-1,25 μ L/mL. A atividade

Resultados

fungicida dos principais compostos deste óleo, α -pineno e β -pineno, também foi avaliada, sendo o α -pineno o composto mais ativo (Tabela 36).

Tabela 36: Atividade antifúngica (CMI e CML) do óleo de *Seseli montanum subsp. peixotoanum* e de α -pineno e β -pineno contra estirpes de leveduras, dermatófitos e *Aspergillus*.

Estirpes	<i>Seseli montanum</i>		α -pineno		β -pineno		Fluconazol		Anfotericina B	
	CMI ^a	CML ^a	CMI ^a	CML ^a	CMI ^a	CML ^a	CMI ^b	CML ^b	CMI ^b	CML ^b
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>20	>20	0,64- 1,25	0,64- 1,25	>20	>20	1	>128	N.T. ^c	N.T.
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	>20	>20	1,25	1,25- 2,5	>20	>20	4	>128	N.T.	N.T.
<i>Candida krusei</i> H9	>20	>20	0,16- 0,32	0,32	10	10	64	64-128	N.T.	N.T.
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	5	10	0,64	0,64	20	20	8	8	N.T.	N.T.
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	10-20	10-20	0,32	0,32	20	20	<1	<1	N.T.	N.T.
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	1,25	2,5	0,08	0,32	5	5-10	16	128	N.T.	N.T.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	1,25	2,5	0,32	0,32- 0,64	10	10	16-32	32-64	N.T.	N.T.
<i>Microsporum canis</i> FF1	1,25	1,25	0,16	0,16- 0,32	5,0	5,0	128	128	N.T.	N.T.
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	1,25	2,5	0,08	0,08	5-10	5-10	16	64	N.T.	N.T.
<i>Microsporum gypseum</i> CECT 2908	2,5	2,5	0,16	0,16	10	10	128	>128	N.T.	N.T.
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0,64- 1,25	0,64- 1,25	0,16	0,16	5-10	5-10	16	16	N.T.	N.T.
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	2,5-5	>20	2,5	5	>20	>20	N.T.	N.T.	1-2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	10	>20	1,25	1,25- 2,5	>20	>20	N.T.	N.T.	2	4
<i>Aspergillus. flavus</i> F44	>20	>20	1,25	1,25	>20	>20	N.T.	N.T.	2	8

Resultados obtidos em três experiências independentes desenvolvidas em duplicado.

^a CMI e CML determinados pelo método de macrodiluição e expressos em microlitro por mililitro (v/v).

^b CMI e CML determinados pelo método de macrodiluição e expressos em micrograma por mililitro (p/v).

^c Não testado.

3.3.4. *Thapsia minor*

3.3.4.1. Composição química

Os óleos essenciais foram obtidos com um rendimento de 3,1% e 3,25% (v/p), para as amostras colhidas na Queimadela (amostra 1) e em Mucelão (amostra 2), respetivamente. Os óleos foram analisados por CGL e CGL-EM e a composição qualitativa e quantitativa é apresentada na Tabela 37, onde os compostos estão listados em ordem de eluição numa coluna de polidimetilsiloxano.

A fração contendo monoterpenos oxigenados é dominante (87,1% e 87,4%), enquanto a fração sesquiterpénica apenas representa 1,1% do óleo. O acetato de geranilo é o principal constituinte nas 2 amostras (82,3 e 83,0%, respetivamente), podendo, assim, esta planta ser considerada uma boa fonte vegetal deste composto.

Tabela 37: Composição dos óleos essenciais de *Thapsia minor* em Portugal.

IR ^a	IR ^b	Compostos ^a	Percentagem (%)	
			Amostra 1 (Queimadela)	Amostra 2 (Mucelão)
930	1029	α -Pineno	0,7	0,8
964	1127	Sabineno	1,6	1,4
969	1116	β -pineno	v	0,4
977	1161	Mirceno	0,7	0,8
1005	1152	Δ -3-Careno	0,7	0,1
1012	1272	<i>p</i> -Cimeno	2,3	3,1
1019	1214	1,8-Cineol	0,4	0,5
1027	1233	<i>cis</i> - β -Ocimeno	v	0,1
1035	1249	<i>trans</i> - β -Ocimeno	v	0,2
1047	1249	γ -Terpineno	3,2	3,0
1082	1542	Linalol	2,0	2,0
1158	1595	Terpineno-4-ol	0,3	0,6
1169	1689	α -Terpineol	v	0,6
1233	1842	Geraniol	1,8	0,5
1342	1722	Acetato de nerilo	0,3	0,2
1357	1750	Acetato de geranilo	82,3	83,0
1408	1590	<i>E</i> - β -Cariofileno	0,5	0,5
1467	1699	Germacreno-D	0,3	0,3

Resultados

1557	1968	Óxido de cariofileno	0,3	0,2
		Hidrocarbonetos monoterpénicos	9,3	9,9
		Monoterpenos oxigenados	87,1	87,4
		Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	0,8	0,8
		Sesquiterpenos oxigenados	0,3	0,2
		Total identificado	97,5	98,3

v: vestígios (< 0.05 %); IR^a: Índices de retenção na coluna SPB-1; IR^b: Índices de retenção na coluna SupelcoWax-10

^a Compostos ordenados por ordem de eluição na coluna SPB-1.

3.3.4.2. Atividade antifúngica

O óleo mostrou ser mais ativo para os dermatófitos, *Cryptococcus neoformans* e *Candida guilliermondii* com valores de CMI variando entre 0,32 e 1,25µL/mL (Tabela 38).

Foi também avaliada a atividade do principal composto do óleo, o acetato de geranilo, que também demonstrou boa atividade para as mesmas estirpes.

A atividade antifúngica do óleo poderá ser associada à contribuição significativa do monoterpreno oxigenado, acetato de geranilo.

Tabela 38: Atividade antifúngica (CMI e CML) do óleo de *Thapsia minor* e do acetato de geranilo contra leveduras, dermatófitos e estirpes de *Aspergillus*.

Estirpes	<i>Thapsia minor</i>		Acetato de geranilo		Fluconazol		Anfotericina B	
	CMI ^a	CML ^a	CMI ^a	CML ^a	CMI ^b	CML ^b	CMI ^b	CML ^b
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10	>20	>20	>20	1	>128	N.T. ^c	N.T.
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	5-10	>20	>20	>20	4	>128	N.T.	N.T.
<i>Candida krusei</i> H9	10	≥20	10-20	≥20	64	64-128	N.T.	N.T.
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	0,64	5	1,25	10-20	8	8	N.T.	N.T.
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	>20	>20	2,5-5	20	<1	<1	N.T.	N.T.
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0,32	0,64	0,32	0,64	16	128	N.T.	N.T.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	0,64-1,25	1,25	0,32-0,64	0,64	16-32	32-64	N.T.	N.T.
<i>Microsporium canis</i> FF1	0,64	0,64	0,16	0,16-0,32	128	128	N.T.	N.T.
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	0,32-0,64	0,32 - 0,64	0,32	0,32-0,64	16	64	N.T.	N.T.

<i>Microsporium gypseum</i> CECT 2905	0,64- 1,25	0,64- 1,25	0,64	0,64	128	>128	N.T.	N.T.
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0,32- 0,64	0,32- 0,64	0,16	0,16	16	16	N.T.	N.T.
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	5	>20	>20	>20	N.T.	N.T.	1-2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	2,5	>20	10-20	>20	N.T.	N.T.	2	4
<i>Aspergillus flavus</i> F44	>20	>20	>20	>20	N.T.	N.T.	2	8

Resultados obtidos em três experiências independentes desenvolvidas em duplicado.

^a CMI e CML determinados pelo método de macrodiluição e expressos em microlitro por mililitro (v/v).

^b CMI e CML determinados pelo método de macrodiluição e expressos em micrograma por mililitro (p/v).

^c Não testado.

Os resultados do estudo dos óleos essenciais das outras três subespécies nativas de *Daucus carota* (subsp. *carota*, subsp. *gummifer* e subsp. *maximus*), bem como de *Eryngium duriaei* estão descritos de seguida, capítulo 3.3.5.1 e 3.3.5.2., respetivamente.

3.3.5. Óleos essenciais e quimiotaxonomia

3.3.5.1. *Daucus carota* L.

O estudo da quimiotaxonomia das subespécies deste *taxon* concretizou-se com a avaliação morfológica das plantas, dos frutos e do teor em DNA, conforme apresentado na secção 3.1.3.1. Relativamente às mesmas populações, referidas na secção 2.1.4., complementou-se este estudo com a análise dos óleos essenciais obtidos de *D. carota* subsp. *halophilus*, *D. carota* subsp. *carota*, *D. carota* subsp. *gummifer* e *D. carota* subsp. *maximus*.

Foram realizadas várias amostragens em várias populações e localidades de Portugal Continental, conforme indicámos na Tabela 39, para que os resultados pudessem ser representativos e se pudessem correlacionar com os outros caracteres estudados (caracteres morfológicos e genoma).

A composição qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais das quatro subespécies nativas de Portugal Continental está descrita na Tabela 39 onde os compostos estão eluídos de acordo com a coluna de polidimetilsiloxano.

Na tabela estão indicados para cada composto os valores mínimos e máximos encontrados nos óleos das várias amostras analisadas.

Os óleos dos quatro *taxa* foram obtidos de plantas na mesma fase vegetativa. Apesar de se observar alguma variabilidade intra-específica, provavelmente devida às diferentes condições edafoclimáticas em que vegetam as plantas nas várias populações, observou-se que os hidrocarbonetos monoterpénicos e os monoterpénos oxigenados foram sempre os principais grupos de constituintes identificados nos óleos de *D. carota* subsp. *carota* e *D. carota* subsp. *gummifer*, enquanto que os hidrocarbonetos monoterpénicos e os fenilpropanóides foram dos principais grupos de compostos identificados nos óleos de *D. carota* subsp. *maximus* e *D. carota* subsp. *halophilus*. Foram observadas algumas diferenças importantes no que respeita aos componentes principais dos óleos destes quatro *taxa*.

D. carota subsp. *maximus* tem a asarona como constituinte característico, uma vez que este é um composto importante neste *taxon* (5,8-25,8%) e está ausente em todas as outras subespécies. Além deste composto outros fenilpropanóides estão também muito bem representados neste *taxon*, como o *E*-metiliso Eugenol (8,2-15,7%) e a elemicina (4,9-13,6%). Dos monoterpénos destacam-se o α -pineno (10-25,9%) e o acetato de geranilo (3,4-16%) e dos sesquiterpenos o β -bisaboleno (8,3-15,1%).

D. halophilus caracteriza-se por ter teores elevados de fenilpropanóides, em especial elemicina (15-31%). Dos hidrocarbonetos monoterpénicos distingue-se o α -pineno (12,2-23%) e o sabineno e (9-29%).

D. carota subsp. *gummifer* e *D. carota* subsp. *carota* caracterizam-se por ter percentagem elevada de α -pineno (11-31% e 13-27,1%, respetivamente) e acetato de geranilo (18-55% e 28,7-65%, respetivamente) e ter baixo teor de fenilpropanóides. No óleo destes dois *taxa* algumas pequenas diferenças foram observadas nos teores de carotol e de 11 α H-himachal-4-en-1- β -ol, dependendo da origem geográfica das plantas.

Tabela 39: Composição dos óleos essenciais das quatro subespécies de *Daucus carota* L. em Portugal Continental.

RI ^a	RI ^b	Compostos ^a	Percentagem (%)			
			<i>D. carota</i> subsp. <i>maximus</i>	<i>D. carota</i> subsp. <i>gummifer</i>	<i>D. carota</i> subsp. <i>carota</i>	<i>D. carota</i> subsp. <i>halophilus</i>
922	1030	α -Tujeno	v-0,2	v-0,2	v	0,2-0,4
930	1030	α -Pino	10,0-25,9	11,0-31,0	13,0-27,1	12,2-23,0
943	1073	Canfeno	0,5-1	0,6-1	0,5-0,6	0,3-0,5
964	1128	Sabineno	1,2-1,3	2,1-10	0,6-0,9	9,0-29,0
970	1118	β -Pino	4,0-6,8	3,8-5,2	2,3-4,5	2,2-2,8
980	1161	Mirceno	1,4-3,0	2,1-3,7	1,2-2,5	2,0-3,1
997	1171	α -Felandreno		v		v-0,1
1010	1187	α -Terpineno		0,1-0,7		0,3-1,3
1011	1275	<i>p</i> -Cimeno		v-0,3		0,1-0,3
1020	1206	Limoneno	1,8-3,3	5,8-9,0	1,2-9,0	5,5-12,0
1020	1215	β -Felandreno	0,3-0,4	v-0,5		0,1-0,5
1025	1235	Z- β -Ocimeno	v-0,1	0,6-2	0,1-0,2	0,1-0,5
		<i>cis</i> -Verbenol	v-0,1			
1035	1250	<i>E</i> - β -Ocimeno	v-0,1	0,2-4,1	0,1-0,2	v-0,1
1046	1249	γ -Terpineno		0,2-1,7		0,8-2,6
1050	1458	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno		v-0,3		0,1-0,4
1162	1624	Mirtenal	0,1-0,2			
1169	1690	α -Terpineol	v-0,1			
1076	1288	Terpinoleno		v-0,3		0,2-0,5
1081	1543	Linalool	0,9-1,3	0,4-1	1,3-1,6	0,5-1,1
1081	1542	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno		v-0,2		v-0,1
1105	1556	<i>cis-p</i> -2-Menteno-1-ol		v-0,1		0,1-0,2
1120	1620	<i>trans-p</i> -2-Menteno-1-ol		v		v-0,2
		<i>trans</i> -Verbenol			v-0,1	
1135	1553	Pinocarvona				t
1144	1695	Borneol				t
1158	1597	Terpineno-4-ol		0,1-2,1	v-0,1	2,0-4,7
1169	1692	α -Terpineol		v-0,1	v-0,1	0,2-0,3
1176	1699	Verbenona			v-0,1	
1177	1673	<i>cis</i> -Piperitol				0,1-v

Resultados

1187		<i>trans</i> -Piperitol	v	v		v
1208		Nerol			v-0,1	
1233	1838	Geraniol			0,5-1,2	
1239	1555	Acetato de linalilo	0,1-0,3			
1240	1730	Geranial			v-0,3	
1264	1574	Acetato de bornilo		0,3-0,4		0,1-0,3
1330	1465	δ -Elemeno		v-0,1		0,1-0,4
1328	1688	α -Terpinil acetato		0,1-0,3		0,1-0,4
1341	1723	Acetato de nerilo			v-0,1	
1346		α -Longipineno			v-1,0	0,1-0,3
1363	2225	Acetato de geranilo	3,4-16,0	18,0-55,0	28,7-65,0	v-1,0
1369	1487	α -Copaeno		v-0,1		v-0,1
1369	2006	Metileugenol	0,1-0,2			v-0,3
1381	1534	β -Cubebeno	v	v		
1383	1586	β -Elemeno		v-0,1		v-0,1
1405	1563	α -Cedreno				0,1-0,3
1411	1563	Aristoleno				t-0,2
1411	1590	<i>E</i> - β -Cariofileno	0,1-0,5	0,6-1,1	0,4-1,3	0,5-1,4
1442	1662	α -Humuleno		0,3-0,6	v-0,1	v-0,1
1446	1661	<i>trans</i> - β -Farnesol				v-0,3
1448	1665	<i>trans</i> - β -Farneseno	0,1-0,3	0,2-0,3	v-0,1	
1461	2219	<i>E</i> -Metiliso Eugenol	8,2- 15,7		1,0-1,3	0,5-7,4
		Neocalitropseno			0,1-0,5	
1466	1699	Germacreno D		2-5,5	v-0,2	0,1-0,3
1473	1708	β -Selineno	v		v-0,1	
1484	1724	Biciclogermacreno	v-0,1	v-0,3	0,1-0,3	0,2-0,3
1489		β -Himachaleno		v-0,1	v-1,3	0,1-0,3
1498	1720	β -Bisaboleno	8,3-15,1		0,3-0,5	0,4-3,5
1508	1751	δ -Cadineno				0,2-0,5
1518		Elemicina	4,9-13,6		0,1-1,6	15,0-31,0
1530	1766	<i>E</i> - α -Bisaboleno	0,5-4,2	0,1-0,2		v-0,3
1542	1816	Germacreno B				v-0,2
1557	1968	Óxido de Cariofileno	v		0,1-0,2	0,1-0,3
1581	2001	Carotol	v-0,2	5,0-15,0	1,5-6,1	

1618	2174	T- Muurolol		v		t-0,3
1622	2089	11 α H-himachal-4-en-1- β -ol		0,1-1,1	0,5-9,4	
1630	2219	T-Cadinol		v-0,1		v-0,2
1630	2216	α -Cadinol		v-0,2		0,1-0,7
1644	1755	α -Asarona	5,8-25,8			
1663		β -Bisabolol		v-0,4		v-0,1
1668		Cânfora de juniperus				0,2-0,6
1777		Isocalamendiol				0,1-0,3

v: vestígios (< 0.05 %); IR^a: Índices de retenção na coluna SPB-1; IR^b: Índices de retenção na coluna SupelcoWax-10.

^a Compostos ordenados por ordem de eluição na coluna SPB-1.

3.3.5.2. *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss.

Conforme descrito na seção 2.1.5., para avaliar as relações taxonómicas relativamente a determinados caracteres morfológicos, o nível de ploidia e conteúdo de DNA nuclear foram analisadas plantas silvestres das quatro populações de *Eryngium duriaei*, na Serra da Estrela, Parque da Peneda Gerês e duas populações da Serra do Açor (Margarça e Colcurinho), resultados descritos na seção 3.1.3.2. Para complementar estes estudos foi realizada a caracterização dos óleos essenciais das partes aéreas de indivíduos das mesmas quatro populações.

Os constituintes dos óleos essenciais estão indicados na Tabela 40, de acordo com a eluição numa coluna de polidimetilsiloxano.

Os óleos são predominantemente formados por hidrocarbonetos sesquiterpénicos e sesquiterpenos oxigenados. Os derivados do cariofilenos são constituintes químicos importantes em todas as amostras (Tabela 40).

Tabela 40: Composição do óleo essencial de populações de *Eryngium duriaei*.

IR ^a	IR ^b	Compostos ^a	Porcentagem (%)			
			Colcurinho < 1.700 m	Gerês < 1.700 m	Margaraça < 1.700 m	Estrela > 1.700 m
929	1030	α -Pinenos	0,7	0,4	0,2	v
978	1290	<i>n</i> -Octanal	0,4	0,6	0,2	1,8
978	1161	Mirceno	v	v	v	v
1019	1206	Limoneno	v	v	v	1,2
1024	1237	<i>Z</i> - β -Ocimeno	0,3	0,6	0,8	-
1034	1255	<i>E</i> - β -Ocimeno	0,8	0,3	v	-
1079	1393	<i>n</i> -Nonanal	v	v	v	-
1181	1495	<i>n</i> -Decanal	0,7	v	v	0,3
1235	n.d.	2-Decenal	0,1	v	v	0,5
1327	n.d.	Bicicloelemeno	v	v	v	v
1369	1493	α -Copaeno	-	-	-	1,4
1376	1518	β -Burbuneno	-	-	-	0,4
1386	1585	β -Elemeno	0,7	0,3	0,5	2,9
1386	n.d.	<i>n</i> -Dodecanal	v	v	0,1	t
1408	1595	<i>E</i> - β -Cariofileno	6,6	12,2	5,8	6,0
1440	1665	α -Humuleno	0,3	0,4	0,4	1,4
1444	1665	<i>E</i> - β -Farneseno	0,4	0,2	0,4	0,5
1461	1685	α -Neocalitropseno	28,0	32,3	53,0	-
1464	1680	γ -Muuroleno	-	-	-	0,4
1468	1676	γ -Curcumeno	0,8	0,7	0,4	-
1468	1699	Germacreno D	-	-	-	5,6
1471	1711	β -Selineno	3,1	2,4	1,5	3,0
1481	1727	Biciclogermacreno	3,4	3,8	2,4	-
1483	1714	α -Selineno	-	-	-	1,2
1491	1752	Germacreno A	-	-	-	0,6
1503	n.d.	<i>Z</i> -Calameleno	-	-	-	0,5
1508	1749	δ -Cadineno	-	-	-	1,8
1521	1904	α -Calacoreno	-	-	-	0,5
1556	1969	Óxido de Cariofileno	7,4	7,3	4,1	47,3
1556	2112	Espatulenol	1,0	0,2	0,5	-
1561	2063	Globulol	0,5	0,2	0,5	-
1567	1992	Salvial-4(14)-en-1-one	-	-	-	1,2

1583	2022	Óxido de Humuleno	1,1	0,4	0,4	4,1
1615	2145	Isocariofileno-14-al (β -Betulenal)	15,8	15,8	8,5	1,1
1631	2214	α -Cadinol	-	-	-	1,7
1637	2344	14-Hidroxi- β -cariofileno	13,7	6,6	5,8	-
		Total	86,1	85,0	85,9	85,6

v: vestígios (< 0.05 %); IR^a: Índices de retenção na coluna SPB-1; IR^b: Índices de retenção na coluna SupelcoWax-10.

^a Compostos ordenados por ordem de eluição na coluna SPB-1.

Foram encontradas diferenças significativas nos constituintes principais dos óleos das plantas de populações de diferentes altitudes, acima ou abaixo dos 1.700 metros (Tabela 40).

Os óleos obtidos de plantas em diferentes regiões de altitude menor que 1.700 m são caracterizados por quantidades elevadas de α -neocalitropseno (28-53%), β -betulenal (8,5-15,8%) e 14-hidroxi- β -cariofileno (5,8-13,7%), enquanto o óleo das plantas da população da Serra da Estrela (acima de 1.700 m) é caracterizado por teores elevados de óxido de cariofileno (47,3%) e *E*- β -cariofileno (6%). O composto principal do óleo de populações localizadas a menos de 1.700m, α -neocalitropseno, não está presente no óleo das populações que se encontram na Serra da Estrela, onde foi possível recolher material em anos diferentes. Constatámos que não há variação na composição do óleo das populações desta região, e que este é sempre caracterizado por níveis elevados de óxido de cariofileno.

CAPÍTULO 4. DISCUSSÃO



Discussão

4.1. ENDEMISMOS IBÉRICOS DAS APIACEAE PORTUGUESAS: UMA REAVALIAÇÃO PARA FINS DE CONSERVAÇÃO

É sabido que as sociedades humanas foram construídas sobre a biodiversidade, beneficiando da grande variedade de organismos, que aprendemos a usar como medicamentos, alimentos, fibras e outros recursos (Diaz *et al.*, 2006). Na realidade, a biodiversidade tem feito parte integrante da experiência humana. Além do seu valor intrínseco, ecológico, genético, social, económico, científico, educacional, cultural, a biodiversidade proporciona também valias recreativas e estéticas que recomendam a sua preservação. No entanto, muitas atividades indispensáveis à subsistência do Homem conduzem à perda de biodiversidade, tendência que deverá continuar no futuro.

A mudança climática é um processo natural e constitui uma ameaça importante para a biodiversidade global; contudo, a perturbação antrópica é a ameaça mais prejudicial de todas, tendo causado, nas últimas décadas, o próprio aumento da taxa de alterações climáticas (Shehadeh, 2011). Estima-se que em 2100, 10-30% das espécies a nível global podem estar em elevado risco de extinção (Fischlin *et al.*, 2007; Heyder, 2010), o que significa que deverá ocorrer um aumento na erosão genética das espécies, reduzindo drasticamente a sua capacidade de adaptação aos novos e instáveis ecossistemas. A variabilidade genética dentro das populações é essencial para a sobrevivência e segurança futura de qualquer espécie e sem uma fonte de genes diversificada, mais espécies ficam em risco devido à falta de capacidade de adaptação a ambientes em mudança (Shehadeh, 2011). Outras ameaças à biodiversidade incluem uma área de distribuição geográfica limitada, como o caso dos endemismos, e a invasão de espécies exóticas agressivas, que podem resultar também de intervenções humanas, pela interferência em ecossistemas porventura mais delicados.

Não proteger, para utilização futura, a diversidade de importantes culturas vegetais que constituem grande parte da dieta de cada ser humano seria extremamente insensato. Shehadeh (2011) refere ainda que, se não for por outro motivo, os seres humanos devem conservar a biodiversidade por propósitos egocêntricos. Aliás, o Artigo 1º sobre os objetivos da Convenção sobre Diversidade Biológica (CBD, 1992) indica claramente a importância da preservação da biodiversidade para a utilização humana. Assistimos atualmente ao desenvolvimento de trabalho em rede onde especialistas avaliam o valor das

espécies negligenciadas e subutilizadas, relativamente a possíveis impactos sociais, ambientais e económicos, as designadas espécies NUSs (Will, 2008).

A diversidade é assim considerada como uma indicação do bem-estar do ecossistema e, conseqüentemente, da necessidade de proteção de determinado local, ou seja: quanto maior o valor de diversidade, maior o valor ecológico do ecossistema em questão. A perda da diversidade biológica em vários ecossistemas em todo o mundo é considerada como a maior mudança na ecologia contemporânea, que hoje inclui elementos humanos, socioeconómicos e políticos (MA, 2003; Mlambo, 2012). Atualmente, a conservação da biodiversidade alargou o seu enfoque para além da compreensão e preservação da diversidade de genes, espécies e ecossistemas, devendo ser hoje abrangidos, na pesquisa pela biodiversidade, os aspetos relativos à promoção do bem-estar da humanidade (Rands *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 2010; Probert *et al.*, 2011; Mlambo, 2012), recorrendo aos serviços de base, de abastecimento, de regulação e culturais proporcionados pelos ecossistemas (MA, 2003).

No quadro atual são considerados três alertas fundamentais sobre a biodiversidade à escala global: (a) as mudanças induzidas pelo homem na orientação de perdas e prevalência claras das espécies em comunidades bióticas; (b) os grandes impactos dessas mudanças nos processos do ecossistema e, portanto, no bem-estar humano, e (c) as conseqüências negativas, que serão sentidas desproporcionalmente pelos mais pobres, mais vulneráveis à perda dos serviços dos ecossistemas (Diaz *et al.*, 2006; Mlambo, 2012).

Numa escala regional, o conjunto dos seres vivos que habita um país constitui um património insubstituível porque, cada espécie, bem como cada população, abriga na sua composição genética a informação de milhões de anos de adaptações que foram evoluindo.

Existem inúmeras possíveis abordagens para a conservação da diversidade, mas podem ser caracterizadas três tipos distintos (e complementares): individual, nacional e global. A primeira refere-se a um estudo numa área individual protegida - um banco de genes; a segunda, um estudo florístico - conservação da flora de uma região geográfica definida, usualmente nacional; a terceira, um estudo monográfico - à escala global, por exemplo, constituição de um reservatório/inventário de genes de um determinado *taxon* (Maxted e Kell, 2009; Brehm *et al.*, 2011; Kell e Maxted, 2011; Maxted *et al.*, 2011). Este trabalho enquadrou-se no segundo caso – um estudo florístico, pela conservação da flora

ibérica e endémica da família Apiaceae, sendo o objetivo principal contribuir para o conhecimento, preservação e valorização da biodiversidade em Portugal.

É importante começar por definir e avaliar a diversidade. Ela refere-se à variedade da vida no planeta, ou seja, à propriedade intrínseca aos sistemas vivos, de serem distintos; engloba, numa unidade funcional, as plantas, os animais, os microrganismos, os ecossistemas e os processos ecológicos (Diaz *et al.*, 2006). Biodiversidade no sentido amplo é o número, a abundância, a composição, a distribuição espacial e interações de genótipos, populações, espécies, tipos e características funcionais e unidades de paisagem num determinado sistema (Diaz *et al.*, 2006).

Neste trabalho, o desenho experimental começou com a consulta de floras portuguesas e ibérica e das *checklists* disponíveis para estimar a priorização dos *taxa* a estudar, passando pela análise da sua diversidade e de possíveis falhas de informação. Desenvolvido o plano de ação, avançaram as atividades de campo e de conservação *in situ* e *ex situ* para o estudo e a caracterização dos *taxa*, e o seu interesse e disponibilidade para uma utilização sustentável, num modelo de conservação aproximado ao de Maxted *et al.* (1997a); a partir da diversidade vegetal e da exploração de campo, o investigador avança para estratégias, técnicas e produtos de conservação, sua caracterização e utilização. De acordo com alguns conservacionistas, a conservação é mais facilmente conseguida se as populações humanas constatarem algum valor económico nas espécies a proteger (Kareiva e Marvier, 2007). Assim, juntamente com os estudos para a conservação das plantas endémicas Apiaceae da flora Portuguesa, também se procurou encontrar características dessas plantas suscetíveis de serem exploradas e que possam ter algum interesse do ponto de vista económico. As plantas da família Apiaceae são produtoras de óleos essenciais e as atividades biológicas dos óleos essenciais produzidos por algumas destas espécies foram avaliadas. Também, sobre este aspeto, as técnicas de micropropagação constituem uma ferramenta poderosa na conservação, produção e disponibilização de plantas e dos seus óleos essenciais, ou outros compostos de interesse, que possam ser isolados a partir delas, evitando assim a sobre-exploração de populações nativas.

A nossa estratégia de ação, à escala das possibilidades reais de trabalho, consistiu numa tentativa de aproximação à metodologia de conservação *gap analysis* que é aplicável a qualquer abordagem de conservação da biodiversidade (Maxted *et al.*, 2008), que engloba as tecnologias *in situ* e *ex situ* - as duas principais técnicas de conservação da

biodiversidade definidas na CBD (1992) - complementadas com o estudo de herbário e análises ecogeográficas e de germoplasma.

Seguindo esta metodologia de conservação foi construída uma unidade de conservação de cariz geral, absoluto, e não foi nosso objetivo a utilização de parâmetros de diversidade biológica para avaliação da conservação relativa. Contudo, essa seria uma possibilidade interessante, num outro estudo de conservação de teor mais quantitativo, passível de ser desenvolvido na mesma amostragem, por uma equipa mais vasta e interdisciplinar.

No contexto apresentado revelam-se de extrema importância todos os esforços para a preservação e a valorização do património genético, principalmente de espécies raras, espécies utilizadas em diferentes culturas e de espécies silvestres relacionadas com espécies cultivadas (CWR) (CBD, 2002; Sharrock, 2006; Maxted e Dulloo, 2008; Maxted e Kell, 2009). É importante desenvolver programas *ex situ* e técnicas de micropropagação *in vitro* que permitam a conservação do genótipo e a rápida multiplicação, estudo e valorização de plantas (Ekiert, 2000), com eventual contributo para o bem-estar da humanidade.

Como indicado por Shehadeh (2011), a conservação efetiva e o uso sustentável da biodiversidade requer diferentes ações: o uso complementar de metodologias de conservação *ex situ* e *in situ*; a coordenação de esforços de conservação nacionais, regionais e internacionais; a ligação da conservação com a utilização para a conservação; capacitação dos guardiões da biodiversidade; adaptação e melhor compreensão da biologia, distribuição e ameaças, de várias espécies em *genepools*; promoção da educação e consciencialização sobre a importância da conservação da diversidade das plantas; reforço das capacidades dos sistemas nacionais para a conservação dos recursos genéticos.

Concretizando uma avaliação ampla e genérica dos endemismos ibéricos das Apiaceae em Portugal, pretendeu-se compatibilizar o conhecimento e a conservação da natureza com o uso diversificado e sustentável dos seus recursos, sensibilizando a comunidade e estimulando a pesquisa científica.

4.1.1. Taxonomia, fenologia, distribuição geográfica e critérios de conservação

A consulta de material de herbário e de bibliografia de especialidade para a identificação, o reconhecimento da localização geográfica, a caracterização do habitat e a fenologia das espécies vegetais, assumem grande relevância e maior dificuldade no caso de espécies raras, como as endêmicas, uma vez que as plantas estão restritas a localizações geográficas específicas e, geralmente, muito limitadas. A Flora Ibérica (Castroviejo *et al.*, 2003) apresenta a revisão mais recente sobre as Apiaceae ibéricas e por isso o trabalho de campo realizado foi baseado nesta obra.

Excluindo *Bunium macuca* subsp. *macuca*, foi possível localizar 13 Apiaceae ibéricas endêmicas em sete anos de herborizações (2005-2011) em 162 ações para colheitas de campo a 44 localidades, de norte a sul de Portugal. De realçar que 121 herborizações em 36 localidades foram para o estudo dos endemismos, mas visitámos outras oito localidades em mais 41 ações de campo para o estudo das populações das quatro subespécies nativas de *D. carota*.

Foram elaborados mais de 150 espécimes *voucher*, que estão depositadas em Herbário COI, e o banco de sementes do Jardim Botânico de Coimbra foi enriquecido com onze *taxa*, seis destes integrados na coleção e no *Index Seminum* pela primeira vez, sendo os quatro *taxa* mais vulneráveis micropropagados e posteriormente integrados nas coleções vivas.

Foi possível constatar que as Apiaceae ibéricas endêmicas estão representadas em Portugal por plantas com uma larga faixa edafo-climática e por espécies com grande variabilidade de habitats, desde os solos ultrabásicos de Trás-os-Montes e Alto Douro (*Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*) (Aguiar, 2001) aos solos calcários do Algarve (barrocal algarvio-*Distichoselinum tenuifolium*).

Várias diligências com instituições e cientistas da especialidade foram concretizadas para além de uma pesquisa exaustiva em Herbários de Portugal e Espanha relativamente a *Bunium macuca* subsp. *macuca*. Como referido, apenas se encontrou um exemplar deste *taxon* em Herbário COI onde o autor Mateo López Udías (Castroviejo, Flora Iberica, X: 66, 2003) refere a colheita em 1901, em Setúbal, na província de Alto Alentejo, conforme erradamente interpretado na Flora Ibérica, pois esta região localiza-se na Estremadura. Mesmo assim, a planta não pôde ser encontrada nem na área de Setúbal,

nem no Alto Alentejo. Além disso, não foi possível encontrar outras referências a este *taxon* em publicações especializadas, como sejam as obras de vários taxonomistas portugueses (Aguiar, 2001; Lopes, 2001; Silveira, 2001; Honrado, 2003; Ribeiro, 2006; Pinto-Gomes, 2008; Almeida, 2009a). Com base nestes dados, pode ser razoável considerar a forte probabilidade deste *taxon* estar extinto em Portugal.

Conopodium subcarneum e *Eryngium galioides* têm sido considerados como *taxa* muito raros em Portugal (Aguiar, 2001; Pinto-Gomes, 2008). Os nossos estudos confirmam esta constatação, visto que apenas pudemos localizar as duas espécies nas províncias da Beira Alta e do Algarve, respetivamente.

Eryngium galioides está considerado na Lista de Plantas Vasculares Europeias, 2011 (*IUCN Red List of Threatened Species, 2011*), como LC-*Least Concern*, mas os resultados das observações efetuadas mostram que deveria ser considerada uma espécie prioritária para conservação, pelo menos em Portugal.

Embora não seja referido na Flora Ibérica, *Eryngium duriaei* também foi encontrado na província do Douro Litoral, na Misarela, Serra da Freita, para além de outras localidades indicadas: Serra da Estrela e Serra do Gerês e duas populações distintas na Serra do Açor (Mata da Margarça e Colcurinho). Constatou-se que as populações acima de 1.700 m de altitude apresentavam diferenças morfológicas nítidas, relativamente às outras (700-1.000 m). Esta verificação vem ao encontro da alusão da Flora Ibérica que refere duas subespécies: *duriaei* e *juresianum*. Estudos fitoquímicos com base nos óleos essenciais e outras técnicas moleculares puderam esclarecer a caracterização genética e a quimiotaxonomia destes *taxa* *Eryngium duriaei* subsp. *duriaei* e *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* (Tavares *et al.*, 2012c), a apresentar de seguida (seção 4.1.1.2.). De igual modo (seção 4.1.1.1.), foi avaliado o teor em DNA e a quimiotaxonomia de populações das quatro subespécies de *Daucus carota* nativas em Portugal Continental, uma informação importante, dada a grande variabilidade morfológica deste *taxon*, o que torna muito difícil uma identificação inequívoca. As duas chaves taxonómicas apresentadas na seção de resultados (3.1.3.1. e 3.1.3.2.) foram baseadas no nosso trabalho de campo e nas descrições da Flora Ibérica (2003), para facilitar a melhor identificação e distinção morfológica das 4 subespécies nativas de *Daucus carota* e das 2 subespécies de *Eryngium duriaei*.

Embora *Angelica pachycarpa* não conste na Lista de Plantas Vasculares Europeias, 2011 (*IUCN Red List of Threatened Species, 2011*) e de acordo com outras referências

(Queiroga *et al.*, 2008), verificou-se que esta será uma das espécies endémicas mais vulneráveis em Portugal, uma vez que ocorre exclusivamente nas ilhas Berlengas (Tauleigne *et al.*, 2004; Queiroga *et al.*, 2008). Alguns resultados sobre a micropropagação desta espécie já foram publicados (Tavares *et al.*, 2009-2010), embora a população excessiva de gaivotas na ilha Berlenga tenha dificultado o trabalho de monitorização para a instalação *in situ* das plantas micropropagadas, conforme descrito na seção 3.2.3.4.

O conjunto de resultados do trabalho de campo efetuado permitiu atualizar os critérios de conservação para algumas das Apiaceae estudadas, nomeadamente:

- *Eryngium galioides* - embora referida na Flora Ibérica para 5 províncias portuguesas (Ag AAl BA BA1 BB (TM)), apenas foi localizada uma população na Nave do Barão, Loulé, numa área muito restrita e com condições edafo-climáticas muito específicas, o que nos leva a incluir esta espécie no grupo 1 – de maior prioridade de conservação.

- *Eryngium duriaei* - foi detetada uma população, ainda que reduzida, na província do Douro Litoral, na Serra da Freita, não referenciada na Flora Ibérica.

Para além disso, demonstrou-se que as características morfológicas de 4 populações estudadas em diferentes províncias e localidades - Serra da Estrela; Colcurinho, Açor; Serra do Gerês; Mata da Margaraça - apresentam diferenças notórias, consoante se localizem acima ou abaixo dos 1.700m, pelo que foram estudadas outras características químicas e do genoma (a apresentar de seguida, seção 4.1.1.2.), para perceber as relações taxonómicas destas populações, que são descritas em seção própria (3.1.3.2.). As populações da Serra da Estrela são também reduzidas, pelo que sugerimos que este *taxon* seja considerado prioritário, pertencendo ao grupo 1.

- *Bunium macuca* subsp. *macuca* - embora indicado para Portugal (Castroviejo *et al.*, 2003), este *taxon* não foi localizado. Após consulta a vários botânicos e coletores portugueses e espanhóis poderemos supor que esta subespécie endémica ibérica possa estar extinta em Portugal.

- *Conopodium subcarneum* – *taxon* indicado para cinco províncias portuguesas (BA, (BB), BL, (E), TM); no entanto, as populações encontradas na BA são pouco abundantes, pelo que se sugere a realização de mais estudos na prospeção de campo e localização deste *taxon*, que por isso é considerado de estudo prioritário, pertencendo ao grupo 1.

Discussão

- *Ferulago capillaris* – embora indicado para duas províncias portuguesas, BA, Mi, apenas foi localizado no Minho (Parque Nacional Peneda e Gerês) em populações pequenas e em condições de habitat muito específicas - leito seco do Rio Homem, mata da Albergaria - devendo ser incentivada a sua prospeção em habitat natural, pelo que o critério de conservação será grupo 1 e não grupo 2.

- *Laserpitium eliasii* subsp. *thalictrifolium* – uma situação semelhante à anterior foi observada para este *taxon*, que embora indicado para 3 províncias portuguesas -BA, Mi e TM - apenas parece existir em locais muito específicos, em populações pouco representadas, no mesmo habitat que *Ferulago capillaris*; deverá ser incentivada a sua pesquisa, pelo que o critério de conservação será prioritário: grupo 1 em vez de grupo 2.

- *Thapsia minor* - embora indicado para nove províncias portuguesas (AAL, Ag, BA, Bal, BB, BL, DL, E, Mi) este *taxon* foi localizado sempre em populações muito pequenas, devendo ser feita a avaliação e reconhecimento da sua distribuição geográfica, pelo que se propõe um critério de prioridade de conservação mediano: grupo 2 e não grupo 3.

Com base neste estudo propõe-se uma nova tabela de critérios de conservação dos endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas:

Tabela 41: Endemismos ibéricos das Apiaceae portuguesas: atualização de critérios de conservação prioritária.

<i>Taxa</i>	Províncias localizadas	Crítérios de prioridade de conservação	Localidades avaliadas
1. <i>Eryngium galioides</i>	Ag	Grupo 3 para grupo 1 – RARO em Portugal	Nave do Barão
2.1. <i>Eryngium duriaei</i> subsp. <i>duriaei</i>	BA	Grupo 2 para grupo 1 – presente apenas acima de 1.700m	Serra da Estrela
2.2. <i>Eryngium duriaei</i> subsp. <i>juresianum</i>	Mi BL DL.	Grupo 2	Serra da Freita Açor Gerês Mata da Margaraça
3. <i>Daucus carota</i> subsp. <i>halophilus</i>	Costa SW, Ag BAI E.	Grupo 1	Cabo S. Vicente Arrifana Cabo Sardão Cabo Carvoeiro Cabo da Roca Cabo Espichel
4. <i>Bunium macuca</i> subsp. <i>macuca</i>	AAI.	Grupo 1 – extinto?	Não encontrada
5. <i>Conopodium subcarneum</i>	BA TM.	Grupo 2 para grupo 1 – localizado em populações pequenas	Serra da Arada Serra da Nogueira, Bragança
6. <i>Conopodium majus</i> subsp. <i>marizianum</i>	AAI Ag BA BAI BB BL DL E Mi (R) TM.	Grupo 3	Tabuaço Serra da Freita Lousã Montemuro
7. <i>Seseli montanum</i> subsp. <i>peixotoanum</i>	TM.	Grupo 1	Alimonde Samil
8. <i>Angelica major</i>	BA BB Mi TM.	Grupo 2	Serra da Estrela
9. <i>Angelica pachycarpa</i>	Berlenga Islands-E.	Grupo 1	Berlenga
10. <i>Ferula communis</i> subsp. <i>catalaunica</i>	AAI Ag BA BAI BB BL E R TM.	Grupo 3	Guarda Évora Loulé Óbidos
11. <i>Ferulago capillaris</i>	BA Mi TM.	Grupo 2 para grupo 1 – populações pequenas em habitats muito específicos	Celorico da Beira Guarda Gerês
12. <i>Distichoselinum tenuifolium</i>	Ag.	Grupo 1	Moncarapacho Espargal Burgau
13. <i>Laserpitium eliasii</i> subsp. <i>thalictrifolium</i>	Mi.	Grupo 2 para grupo 1 - populações pequenas em habitats muito específicos	Gerês Bragança
14. <i>Thapsia minor</i>	BL DL.	Grupo 3 para grupo 2 – localizado em populações pequenas	Mucelão Queimadela Piódão, Açor

Para além da necessária monitorização das populações espontâneas, da micropropagação e valorização das espécies, sua recolha e armazenamento de sementes, também a educação e a sensibilização para a importância da biodiversidade é fator indispensável para a sua conservação. Nesse sentido foram realizadas algumas iniciativas abertas a toda a comunidade nomeadamente no acompanhamento da plantação de novas espécies nas coleções vivas do jardim botânico de Coimbra, que divulgámos a nível nacional e internacional (*Projeto Inquire*).

O trabalho de campo, a pesquisa em micropropagação e o estudo dos óleos essenciais foram concretizados nas mesmas populações, cujos *taxa* a que pertencem têm exemplar testemunho no Herbário de Coimbra e estão referenciados nos anexos I e II.

Convirá realçar que embora tenha sido realizado um trabalho de campo exaustivo e continuado, nas localidades referidas de norte a sul do país, por um período de sete anos, temos a consciência de que este não é (nem pode ser) um estudo definitivo nem acabado. Outros estudos e abordagens podem acrescentar informação nesta matéria, em regiões que não visitámos ou nas mesmas, em datas diferentes, como decorre de qualquer processo que envolva espécies vivas que, por definição, são sistemas dinâmicos, implicando o seu estudo uma atualização e acompanhamento permanentes.

4.1.1.1. Quimiotaxonomia das quatro subespécies de *Daucus carota* L. nativas em Portugal

O género *Daucus* L. apresenta um elevado nível de variações morfológicas, bem expresso nos *taxa* infraespecíficos, como é o exemplo de *Daucus carota* L. nativo de regiões temperadas da Europa e do sudoeste da Ásia. Os seus ancestrais selvagens provavelmente tiveram origem no Afeganistão, o centro de diversidade da espécie (Bradeen *et al.*, 2002) e hoje disseminada em diversos ecossistemas e zonas geográficas (Amaral Franco, 1974; Castroviejo *et al.*, 2003; Pereira Coutinho, 1939; Sampaio, 1946; Tutin *et al.*, 1968).

Como foi descrito, as subespécies de *D. carota* e também a espécie *E. duriaei* apresentam um alto nível de variações morfológicas e, apesar das várias descrições disponíveis nas Floras analisadas, essas descrições não são, do nosso ponto de vista, suficientemente claras ou completas para um reconhecimento inequívoco destes *taxa*.

Além da caracterização do fenótipo outras ferramentas de diagnóstico, como a caracterização dos óleos essenciais e do genótipo dos indivíduos, foram avaliadas para certificar a identificação dos *taxa*. Assim, o estudo quimiotaxonómico que nos propusemos fazer sobre as quatro subespécies de *Daucus carota* nativas em Portugal Continental e da espécie *Eryngium duriaei* foi baseado em diferentes metodologias de análise.

Relativamente a *Daucus* a avaliação morfológica e da morfometria de amostras de frutos de diversas populações de *Daucus carota* subsp. *maximus* mostrou que esta subespécie é claramente diferente das outras três subespécies, não só pelas dimensões das plantas adultas e das umbelas, como pelas características dos frutos. O hábito desta subespécie é também nitidamente diferente: é uma planta herbácea com altura até 170 (200) cm, umbelas com 12-23 cm de diâmetro; os frutos são menores, até 2,5 x 2 mm, e os espinhos dos frutos são sempre compridos, até 1,50 mm, de ápices estrelados. Os indivíduos das outras subespécies são plantas herbáceas menores, geralmente até 50 (100) cm de altura, com umbelas mais estreitas, 3-12 cm de diâmetro; os frutos são maiores, até 3,5 x 2,5 mm e com espinhos até 1,50 mm de comprimento, que podem ter ápices estrelados, de uma ou duas pontas ou simples. Diferentemente os indivíduos das subsp. *carota*, *gummifer* e *halophilus* não são facilmente distinguíveis morfológicamente, nem pela morfometria dos frutos.

De um modo geral, a análise do teor em DNA revelou uma acentuada dificuldade na obtenção de histogramas de núcleos com pico G1 inferior a 3% (valor médio CV foi de 5,62%). No entanto, diferenças significativas foram detetadas no tamanho do genoma, com a subsp. *maximus* a apresentar o teor de DNA mais elevado e a subespécies *halophilus* o menor.

No que respeita aos óleos essenciais também *D. carota* subsp. *maximus* se distingue dos outros *taxa* pelo elevado conteúdo de asarona, composto ausente nos óleos essenciais das outras subespécies. As outras três subespécies (subsp. *carota*, subsp. *gummifer* e subsp. *halophilus*) apresentam algumas diferenças na composição dos óleos essenciais, em especial a subsp. *halophilus* com elevado teor em elemicina (15-31%). Este fenilpropanóide não está presente no óleo da subespécie *gummifer* e é apenas um composto minoritário no óleo da subespécie *carota* (0,1-1,6 %). Por outro lado, é muito difícil distinguir a subsp. *carota* da subsp. *gummifer* pelos seus óleos essenciais, uma vez que ambos apresentam elevados teores de acetato de geranilo.

Discussão

Assim, os óleos de *Daucus carota* subsp. *maximus* e subsp. *halophilus* são manifestamente diferentes das outras duas subespécies (subsp. *carota* e *gummifer*) pela maior quantidade de fenilpropanóides. No entanto, no óleo de *Daucus carota* subsp. *maximus* a asarona é o principal fenilpropanóide e no da subsp. *halophilus* a elemicina, acompanhada pelo monoterpene sabineno. Este último composto é minoritário na subespécie *maximus*, mas, em contrapartida o óleo deste *taxon* tem teores mais elevados de *E*-metiliso Eugenol e β bisaboleno do que a subespécie *halophilus*.

Embora *Daucus carota* subsp. *halophilus* possa ser diferenciado das outras subespécies, de acordo com algumas características morfológicas, pelo tamanho do genoma e alguns constituintes químicos dos óleos essenciais, estas diferenças não são suficientemente robustas para separar a subsp. *halophilus* numa categoria taxonómica diferente.

Também não foi possível usar dados citológicos, morfológicos e genómicos para apoiar a separação das subsp. *carota* e subsp. *gummifer*, nem entre eles, nem em relação à subsp. *halophilus*.

A avaliação das populações estudadas, recorrendo à caracterização taxonómica, análise microscópica e morfométrica dos frutos, estimativa de nível de ploidia e à caracterização dos óleos essenciais, permitiram separar *D. carota* L. subsp. *maximus* (Desf.) Bal, de entre as 4 subespécies nativas em Portugal.

Desta forma, e considerando a quantidade razoável de subespécies de *Daucus* existentes (cerca de 10), o *taxon* *Daucus carota* subsp. *maximus* deve ser considerado, na nossa opinião, uma espécie diferente, como foi sustentado por René Desfontaines (*D. maximus* Desf.) (Desfontaine, 1798). Pelo contrário, e de acordo com Pujadas Salvá (2003), os três outros *taxa* devem manter-se na mesma categoria taxonómica:

Daucus maximus Desf.

Daucus carota L. subsp. *carota*

Daucus carota L. subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas

Daucus carota L. subsp. *gummifer* Syme

No entanto, mais estudos devem ser desenvolvidos para aprofundar a caracterização destes *taxa*, em particular do endemismo português, *Daucus carota* L. subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas, que já foi considerado por Brotero uma espécie (*D. halophilus* Brot.) (Castroviejo *et al.*, 2003)

Por outro lado, este *taxon* pela sua tolerância à salinidade, apresenta não apenas interesse fisiológico mas também do ponto de vista do melhoramento de plantas uma vez que esta característica pode vir a ser transferida para a subespécie cultivada, criando assim variedades de *D. carota* subsp. *sativus* tolerantes à salinidade.

4.1.1.2. Quimiotaxonomia das duas subespécies de *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss. em Portugal

Tal como *Daucus* L., também o género *Eryngium* L. apresenta uma ampla distribuição geográfica, conforme já referido, e uma grande diversidade morfológica e química das espécies, relativamente à altura, estrutura e composição dos óleos essenciais, o que parece apontar para uma origem muito antiga deste *taxon* (Berenbaum, 2001; Bylebyl *et al* 2008; Fidelis *et al.*, 2008; Perthuy *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2011).

A comparação da caracterização morfológica das diferentes populações estudadas de *Eryngium duriaei* revelou não haver diferenças entre as três populações de altitudes mais baixas (inferiores a 1.700 m). No entanto, quando essas populações foram comparadas com as populações que crescem acima de 1.700m algumas diferenças morfológicas foram encontradas. Assim, as plantas que crescem em altitudes mais elevadas eram geralmente herbáceas de folhas coreáceas, de 30-60 cm de altura, folhas basais pecioladas, linear-lanceoladas a oblongo-obovadas, pinatífido-dentadas, sendo as caulinares sésseis a ligeiramente pecioladas. As plantas que crescem em altitudes mais baixas eram herbáceas, de folhas membranáceas, muitas vezes atingindo 100 cm, possuindo as folhas basais quase sésseis, espatuladas, denticuladas para inciso-dentadas, sendo as caulinares amplexicaules.

Baseado principalmente nessas diferenças morfológicas, Lainz considerou dois *taxa* diferentes (Lainz 1966; Lainz 1967), ao nível específico (Lainz 1966): *E. juresianum* (M. Lainz) M. Lainz e *E. duriaei* J. Boiss Gay ex. Noutro trabalho, o mesmo autor estabeleceu duas subespécies de *E. duriaei*: *E. duriaei* subsp. *juresianum* e *E. duriaei* subsp. *duriaei* (Lainz 1969). Esta classificação tem sido seguido por outros autores (Pinto da Silva e Teles, 1999; Jansen *et al.*, 2000). Os nossos dados parecem indicar que as populações de *Eryngium duriaei* de altitudes mais elevadas (Serra da Estrela) correspondem a *E. duriaei* subsp. *duriaei* enquanto os as outras pertencem a *E. duriaei* subsp. *juresianum*.

A citometria de fluxo e a análise do cariótipo e do tamanho do genoma das 4 populações de *Eryngium duriaei* foi estimada utilizando citometria de fluxo. A variação nesse carácter entre indivíduos da mesma população foi muito baixa e não significativa; diferenças no tamanho do genoma foram detetadas entre as populações que crescem em altitudes mais baixas e da população da Serra da Estrela. Plantas desta última área mostraram um teor de DNA nuclear significativamente maior ($2C = 6,21 \pm 0,05$ pg / DNA) do que as outras populações ($2C = 5,68 \pm 0,07$ pg / DNA). Esta diferença ($\gg 9\%$) foi confirmada como sendo fiável, com dois picos claramente distintos e que foi repetidamente observada na análise simultânea de ambas as populações. Apesar das diferenças estudadas no tamanho do genoma, as análises citológicas de indivíduos de duas populações de diferentes altitudes, apresentaram o mesmo número de cromossomas, $2n = 2x = 16$, que é o número mais comum dentro do género (Nieto Feliner, 2003).

Considerando os dados citológicas e as diferenças morfológicas observadas, parecem existir duas entidades homoplóides distintas, isto é, dois *taxa* com o mesmo número de cromossomas, mas diferentes quantidades de DNA nuclear.

Só recentemente, com o avanço da citometria de fluxo, começou a ser possível resolver a taxonomia de grupos homoplóides. Um dos exemplos mais notáveis de grupos homoplóides com alguma relevância taxonómica é o género *Helleborus* (Zonneveld, 2001). As espécies deste género têm 32 cromossomas, mas o maior genoma é quase duas vezes tão grande como o do menor, e, assim, o tamanho do genoma pode ser uma ferramenta de diagnóstico para distinguir várias espécies.

Se existem numerosos exemplos ao nível do género (por exemplo, Zonneveld *et al.*, 2003; Zonnevel e van Jaarsveld, 2005; Leong-Skornickova *et al.*, 2007), a um nível inferior ao da espécie, como parece ser este caso, são menos os exemplos que se podem encontrar na literatura. Por exemplo, Loureiro *et al.*, (2007a) distinguiram *Festuca ampla* subsp. *ampla* de subsp. *transtagana* devido ao seu genoma 5% menor, apesar de ter o mesmo número de cromossomas. Diferenças no tamanho do genoma são conhecidos por serem em grande parte causadas por diferentes quantidades de DNA não codificante repetitivo, para os quais podem contribuir elementos transponíveis, DNA satélite, intrões e pseudogenes (Bennett e Leitch, 2005).

A caracterização química dos óleos essenciais de indivíduos das quatro populações corrobora a distinção de *Eryngium duriaei* em duas subespécies: subps. *duriaei* para

populações acima de 1.700 m (Serra da estrela) e subsp. *juresianum* para as restantes, de altitude inferiores.

Não obstante em todas as amostras os derivados de cariofileno serem compostos importantes dos óleos essenciais, predominantemente formados por hidrocarbonetos sesquiterpénicos e por sesquiterpenos oxigenados, foram encontradas diferenças significativas nos constituintes principais dos óleos das duas subespécies nas populações de diferentes altitudes. Os óleos obtidos a partir de plantas colhidas em menores altitudes foram caracterizados pela presença de quantidades elevadas de α -neocalitropseno, enquanto que o óleo de populações da Serra da Estrela (acima 1.700m) foi caracterizado por níveis elevados de óxido de cariofileno.

Também se concluiu que em *E. duriaei* subsp. *juresianum*, α -neocalitropseno é o composto principal do óleo e que não está presente no óleo da outra subespécie, podendo por isso ser considerado um marcador quimiotaxonómico que ajuda a distinguir os dois *taxa*. Além disso, tanto quanto sabemos, este composto não foi previamente identificado noutras espécies de *Eryngium* e num estudo recente de *Eryngium aquifolium* de Espanha não foi possível usar compostos específicos como marcadores quimiotaxonómicos para este *taxon* (Pala-Pául *et al.*, 2010). No material de *Eryngium duriaei* da Serra da Estrela (acima de 1.700 m) não houve variação na composição do óleo entre as populações desta região, sendo o óleo sempre caracterizado por altos níveis de óxido de cariofileno. Vários estudos sobre as espécies de *Eryngium* puderam sinalizar a presença deste composto nos óleos essenciais, embora em menores quantidades (Rodriguez *et al.* 2002; Pala-Paul *et al.*, 2005; Capetanos *et al.*, 2007; Pala-Pául *et al.*, 2006; Pala-Pául *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2011). Algumas outras espécies de *Eryngium* também têm demonstrado composições dominados por sesquiterpenos, alguns deles pouco comuns, como murol-9-en-15-al, cadina-9-en-15-al e cadina-9-en-15-ol no óleo de *E. maritimum* (Darriet *et al.*, 2012), e eryng-9-en-15-al no óleo de *Eryngium creticum* (Ayoub *et al.*, 2003). Teores muito elevados de sesquiterpenos não são muito comuns na família Apiaceae (Picman, 1986).

Correlacionando todos os dados obtidos, confirma-se a observação de Lainz (1966; 1969) que dividiu a espécie *E. duriaei* na subespécie *duriaei* e *juresianum*, conforme já referimos. Na verdade, os nossos dados indicam que as populações estudadas correspondem a duas subespécie diferentes, não apenas pelas características morfológicas, mas também pelo tamanho do genoma e pela composição dos óleos essenciais, ocupando

ecossistemas diferentes: *E. duriaei* subsp. *duriaei* vegetando em altitudes mais elevadas (Serra da Estrela) e *E.* subsp. *juresianum* crescendo em altitudes mais baixas. O modo como essas diferenças surgiram durante a evolução e sua importância ecológica, são questões que precisam ser esclarecidas por outros estudos, envolvendo cruzamento e análise de descendentes entre as duas subespécies. Este trabalho também evidencia a relevância das técnicas modernas de análise química e genómica enquanto auxiliares nos estudos taxonómicos.

4.2. CULTURA *IN VITRO* – MICROPROPAGAÇÃO

Embora os métodos de propagação *in vitro* tenham sido usados principalmente nas espécies cultivadas (Engelmann, 1999; Chawla, 2002; Baranski, 2008; Atia *et al.*, 2011; Jana e Shekhawat, 2011) tem havido um interesse crescente sobre sua aplicabilidade para propagar espécies raras ou ameaçadas para fins de conservação (Jaramillo e Baena, 2002; Engels, 2003; Sarasan *et al.*, 2006; Divakaran e Babu, 2009; *RBGKew*).

Como parte da estratégia para a conservação das quatro Apiaceae ibéricas e endémicas mais vulneráveis da flora portuguesa utilizaram-se diferentes métodos de micropropagação, desde a proliferação de rebentos à indução de embriogénese somática, tornando possível a adoção de diferentes técnicas de multiplicação *in vitro*, de acordo com o tipo de explantes disponíveis e os objetivos do trabalho. De facto, enquanto a proliferação de rebentos caulinares será mais indicada para obter o mesmo tipo de plantas, a embriogénese somática direta ou a partir de calos, preservados a longo prazo, é muitas vezes responsável pela regeneração de plantas que exibem algum tipo de variabilidade, característica que pode ser usada para aumentar a diversidade genética de uma população (Larkin, 1981; Canhoto, 2010).

A metodologia foi idêntica em todos os protocolos de micropropagação. Estas experiências demonstraram que estes endemismos, tal como outras Apiaceae (Eikert 2000; Pant e Manadhar 2007), têm um forte potencial para a propagação *in vitro*, uma condição favorável para a sua conservação, multiplicação e aplicação sustentável, dada a sua distribuição geográfica muito restrita (Parker, 1981; Castroviejo *et al.*, 2003; Gimenez *et al.*, 2004).

Nesta parte da discussão serão mencionados apenas os nomes dos quatro géneros, *Daucus*, *Angelica*, *Distichoselinum* e *Seseli*, para facilitar a referência aos *taxa* estudados, respetivamente, *Daucus carota* subsp. *halophilus*, *Angelica pachycarpa*, *Distichoselinum tenuifolium* e *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*.

4.2.1. Proliferação de meristemas e organogénese

Nas experiências de micropropagação, não só *Daucus* (Tavares *et al.*, 2010a), como *Angelica* (Tavares *et al.*, 2009-2010), *Distichoselinum* (Tavares *et al.*, 2009) e *Seseli* (Tavares *et al.*, 2011b) foram, pela primeira vez, propagados *in vitro* utilizando como explante inicial os ápices caulinares de plântulas provenientes de sementes germinadas *in vitro*.

Na realidade, esta técnica tem sido aplicada para a propagação de um grande número de culturas e espécies ameaçadas de extinção (Engelmann 1990; Chawla, 2002), dado que este método permite taxas de multiplicação elevadas e as plantas regeneradas são geneticamente uniformes (George e Debergh, 2008) relativamente ao explante inicial. As plântulas foram obtidas sendo clones provenientes de sementes e não clones produzidos pela cultura de plantas adultas, garantindo a diversidade genética das plântulas propagadas. A variabilidade genética é particularmente importante para a conservação de plantas já que, neste caso, o objetivo principal não é clonar um genótipo particular, mas assegurar que a diversidade genética seja mantida ou aumentada (Graudal *et al.*, 2001).

O número médio de rebentos produzidos a partir de ápices caulinares foi baixo e semelhante em *Distichoselinum* e *Angelica*, nas concentrações de BA testadas, após uma primeira e uma segunda inoculação de 30 dias. Na verdade, nem a utilização de diferentes concentrações de BA (1 e 2 mg/L), nem uma segunda inoculação dos explantes em meios com as mesmas dosagens de BA, promoveram a produção de mais plantas *in vitro* em *Distichoselinum* e em *Angelica*.

Estes dados diferem dos obtidos com *Daucus* e *Seseli*, em que a média do número de gemas produzidas na segunda inoculação aumentou com o aumento da concentração de BA (0-2mg/L), tendo quase duplicado para a concentração maior de BA, observando-se resultados muito próximos nos dois *taxa*. Em *Daucus* produziram-se em média 7,9 rebentos/ápice caulinar na segunda inoculação e 4,4 rebentos/explante na primeira,

enquanto que em *Seseli* a média dos valores correspondentes nos dois ciclos de cultura foi de 7,2 e 4,45 rebentos foliares, respetivamente.

Tem sido considerado que a formação dos órgãos foliares é um processo autónomo que não depende de fatores ambientais. Contudo, Yoshida *et al.* (2009) verificaram que a luz atua como um sinal morfogénico que controla o início da formação dos órgãos laterais no meristema apical, pela regulação do nível de auxinas e de citocininas. A citocinina será necessária para a proliferação do meristema e sob o efeito da luz, a auxina redireciona a produção de citocinina para a indução da proliferação do meristema na formação dos órgãos vegetais.

O papel das citocininas na proliferação de rebentos caulinares é bem conhecido (van Staden *et al.*, 2008; Chandrika *et al.*, 2011), o tipo e as concentrações mais eficazes variam muito em diferentes espécies e as auxinas e citocininas promovem o desenvolvimento das gemas e a regulação do crescimento vegetal (Jones *et al.*, 2010). Este efeito pode ser atribuído à interação complexa entre os conteúdos originais dos explantes e as dosagens que são ministradas no meio de cultura, como reportado para *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Poir., (Daffalla *et al.*, 2011). Tal como esta espécie, a *Daucus* é também uma planta resistente ao stresse hídrico, nativa e exclusiva de regiões costeiras em Portugal Continental. Nas plantas adaptadas a este tipo de habitat, outros autores verificaram um aumento do conteúdo endógeno de citocininas para níveis elevados como resposta ao stresse hídrico (Zhang e Ervin, 2004). Assim, as citocininas endógenas atuam como um sistema de defesa antioxidante e diminuem os efeitos nocivos dos baixos níveis de água (Yordanov *et al.*, 2000). Também é referido para culturas *in vitro* de ananás que o nível endógeno e a produção de citocininas aumenta com a formação de gemas nos tecidos de explantes de folhas cultivados *in vitro* na presença de NAA ou de BA no meio de cultura (Mercier *et al.*, 2003).

O maior aumento na proliferação de rebentos que observámos na segunda inoculação do explante poderá ser explicado por variações nos níveis endógenos de citocininas ou de outras hormonas. Uma habituação à citocinina (Geneve *et al.*, 2007), ou um aumento no número de gemas adventícias formadas a partir de organogénese pontual nos calos originados na base dos explantes, podem também ter contribuído para este incremento (Ebrahimie *et al.*, 2006; Tawfik and Mohamed, 2006). Jones *et al.* (2010)

demonstraram que a redução dos níveis endógenos de citocinina conduz à redução na biossíntese de auxina, sugerindo uma indução direta da citocinina na biossíntese da auxina.

As diferenças de comportamento e resposta entre os 4 *taxa* poderão ser explicados por variações de concentração endógena das fitohormonas em função do genótipo dos diferentes *taxa*. O mesmo fundamento poderá explicar que apenas em *Distichoselinum tenuifolium* se tenha verificado o processo de organogénese direta, com a produção de rebentos caulinares diretamente de segmentos foliares. Na verdade, após 2 meses de cultura em meios com BA 1 e 2 mg/L, a formação de rebentos caulinares foi favorecida nos meios com a maior concentração, resposta morfogenética que não se observou nos outros *taxa*, *Daucus*, *Angelica* e *Seseli*, sujeitos às mesmas condições de cultura.

Ebrahimie *et al.* (2007) estudaram a organogénese direta utilizando embriões de *Cuminum cyminum*, uma Apiaceae, verificando que este tipo de morfogénese ocorria na zona meristemática.

Uma vantagem importante da organogénese direta é a de possibilitar a estabilidade genética das plantas regeneradas, enquanto que se for por via indirecta a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal aumenta (Tang e Guo, 2001).

4.2.2. Enraizamento

O enraizamento dos rebentos caulinares obtidos *in vitro* é uma etapa essencial para o sucesso da regeneração de plantas (Németh, 1986; Bennett *et al.*, 1994). Neste trabalho, verificou-se que o número de rebentos formadas e a taxa de formação de raízes foram suficientes para garantir a obtenção de um número considerável de plântulas enraizadas. De facto, à exceção de *Angelica* em que os rebentos caulinares enraizaram em meio com 0,1 mg/L de IBA, os rebentos caulinares dos outros 3 *taxa* puderam enraizar sem tratamento com auxina, tendo-se observado que os rebentos de *Daucus* enraizaram nas duas situações, em meios com e sem a auxina.

Daffallan *et al.* (2011) referem que a formação de raízes num meio de cultura sem auxina poderá ser devido à disponibilidade de auxina endógena nos rebentos caulinares *in vitro*. Este facto pode também explicar que a presença de IBA não tenha aumentado a taxa de formação de raízes. A fase de alongamento radicular é muito sensível à concentração de auxina e é inibida por elevadas concentrações desta hormona no meio de enraizamento

(Baker e Wetzstein, 1994). No entanto, concentrações mais elevadas de NAA (5,0 mg/L) não foram benéficas e resultaram na formação de calos na base do explante (Daffallan *et al.*, 2011). Noutros casos ainda, a concentração de IBA será maior que a ótima conduzindo ao decréscimo no número e no comprimento de raízes formadas por explante. Taiz e Zeiger (2002) e Chaturvedi e Razdan (2004) referiram que as raízes podem requerer uma menor concentração de auxina para crescer, porque o crescimento das raízes é fortemente inibido por níveis mais elevados, em que a auxina induz a produção de etileno, uma hormona vegetal inibidora do crescimento radicular. Na verdade, é reconhecido que o crescimento contínuo das raízes, desde a atividade pós-embrionária das células no meristema radicular, é controlado pela ação coordenada de várias fitohormonas, incluindo a auxina e o etileno (Zhao e Hasenstein, 2009) e outros compostos químicos (Pelagio-Flores *et al.*, 2011). Ruzicka *et al.* (2007) concluíram ainda que o etileno aciona o local de ativação da auxina e regula o crescimento da raiz, quer pela estimulação da biossíntese da auxina quer pela modulação do transporte. Mais ainda, Baker e Wetzstein (1994) referiram que concentrações mais elevadas de auxina induzem um nível alto de metabolitos degradativos nos tecidos, bloqueando o processo regenerativo.

Contudo, foi demonstrado também que IBA é muito eficiente no processo de enraizamento em várias espécies de árvores tropicais (Chaturvedi *et al.*, 2004; Rajeswari e Paliwal, 2008; Rai *et al.*, 2009; Siddique e Anis, 2009; citados em Daffalla *et al.*, 2011), havendo muitas descrições de tentativas para aumentar a taxa de rebentos enraizados pela aplicação de choques auxínicos (Gomes e Canhoto, 2009). Na verdade, o tratamento com outras concentrações de IBA e/ou outras auxinas é um procedimento de rotina usado em muitas espécies e poderá também ser explorado não só para o enraizamento de rebentos caulinares *in vitro* como para a produção de raízes em grande quantidade (Nandagopal e Kumari, 2007). Parece que neste processo de rizogénese a auxina atua predominantemente através da superfície de corte ou por absorção nas aberturas resultantes da excisão dos explantes (Guan e Klerk, 2000). A transferência para meio líquido é uma alternativa utilizada para a cultura de raízes, em suspensão, contudo esta técnica tem sido mal sucedida nalguns casos, como referido por Pandey *et al.*, (2010). Esta situação poderá ser devida à produção de metabolitos que se acumularam no meio líquido exercendo um efeito inibitório no desenvolvimento da raiz, hipótese a confirmar futuramente.

No caso de *Seseli*, uma planta que vegeta em solos serpentínicos, na região de solos ultrabásicos de Trás-os-Montes, os rebentos caulinares só enraizaram depois de transferidos para meio MS base com o pH aumentado para 6,0-6,4. Não é claro se esta situação tem alguma relação com as condições naturais onde a planta normalmente se encontra. No entanto, como é sabido, as condições de pH condicionam o crescimento das plantas, embora os estudos sobre o efeito do pH em culturas *in vitro* sejam muito limitados e não permitam conclusões definitivas sobre o papel deste fator na micropropagação.

Os nossos dados também mostraram que a formação de raízes não foi condicionada pelos níveis de BA utilizado no meio de indução de *Daucus* (Tavares *et al.*, 2010a). No entanto, outros autores têm apontado que as citocininas parecem interferir negativamente na formação de raízes (Ruzicka e Vujovic, 2008; van Staden *et al.*, 2008). É possível que as concentrações utilizadas no presente estudo não sejam suficientemente elevadas para induzir esse efeito inibitório.

4.2.3. Embriogénese somática

Desde os trabalhos pioneiros de Reinert (1958) e Steward *et al.* (1958) na embriogénese somática da cenoura (*Daucus carota* subsp. *sativus*), que a embriogénese somática é aplicada para a propagação de um grande número apiáceas (Brown *et al.*, 1995; Ekiert 2000; Thorpe e Stasolla 2001; Karuppusamy *et al.*, 2007; Tanavat *et al.*, 2011).

Tanto quanto se sabe, os estudos anteriores sobre a cultura *in vitro* de *D. carota* foram concretizados por Imani *et al.* (2001) e Thi e Pleschka (2005). Em ambos os casos, a embriogénese somática foi a técnica utilizada, mas não foram apresentados dados sobre as taxas de regeneração de plantas e aclimação. Imani *et al.* (2001) avaliaram o potencial de seis espécies de *Daucus* e seis subespécies de cenoura para indução de embriogénese somática, concluindo que *D. carota* subsp. *halophilus* foi uma das subespécies com maior capacidade para formar embriões somáticos. Estes dados foram obtidos a partir da cultura de explantes do pecíolo utilizando duas etapas, em que calos embriogénicos foram primeiramente induzidos na presença de IAA, enquanto o desenvolvimento do embrião ocorreu em meio sem auxina. Thi e Pleschka (2005) mostraram que a capacidade de várias espécies e subespécies *D. carota* na embriogénese somática foi fortemente correlacionada com os níveis endógenos de ABA na cultura dos pecíolos. Explantes com menor

concentração de ABA endógeno foram os mais eficazes para a indução de embriogénese somática.

Além da organogénese, já referida, Ebrahimie et al. (2007) estudaram também a embriogénese direta em embriões de cominhos (*Cuminum cyminum* L.). De acordo com Singh e Kumar (2009), a principal diferença entre organogénese e embriogénese tem a ver com o facto de no primeiro processo morfo genético existir uma origem multicelular e a estrutura unipolar ser formada por divisões procambiais, e mantida a ligação com o tecido vascular pré-existente no calo ou no tecido do explante. Na embriogénese, o embrião somático é uma estrutura bipolar que se forma de uma única célula, sem conexão vascular com o explante.

Nos estudos com embriões de cominhos, os autores verificaram que o alto nível de citocinina endógena, juntamente com a sua produção secundária, em resposta à adição exógena de auxina, acelerou a formação de calos e o padrão de regeneração indireto, enquanto que a aplicação exógena de citocininas, como BA, foi suficiente para acionar o padrão direto de regeneração (Ebrahimie et al., 2006, 2007; Tawfik e Mohamed, 2006).

Tal como os cominhos, muitos membros da família das Apiaceae contêm elevados níveis de metabolitos secundários, em particular terpenos, e elevados níveis de hormonas endógenas (Krens et al., 1997). Baseado nesta propriedade têm sido largamente utilizadas como espécie modelo *in vitro*, como se verifica com a cenoura, enquanto modelo para a o estudo da embriogénese somática (Thomas et al., 1989) e a alcarávia (*Carum carvi* L.), como um modelo para o estudo do metabolismo secundário (Krens et al., 1997).

No trabalho desenvolvido para o estudo de embriogénese com 2,4-D, foram utilizados diferentes explantes, segmentos de raízes, de folhas e de pecíolo (este só em *Daucus*), provenientes de sementes germinadas *in vitro*, sendo os melhores resultados obtidos com segmentos foliares no caso de *Distichoselinum* e de *Seseli*, de segmentos de raízes em *Angelica* e de segmentos peciulares em *Daucus*.

As condições utilizadas nas nossas experiências foram diferentes das descritas em *Daucus* spp. por Imani et al. (2001) e Thi e Pleschka (2005), que utilizaram o pecíolo como explante. A indução de embriões somáticos até atingirem o estágio cotiledonar de desenvolvimento ocorreu no meio original, contendo 2,4-D. Este processo, que contempla apenas uma etapa para a indução de embriogénese somática, reduz o tempo de formação e de germinação do embrião somático.

No que diz respeito ao processo de indução de embriogénese, as concentrações testadas não foram as mesmas em cada *taxon*, mas nas condições ensaiadas a melhor taxa de produção de embriões somáticos foi conseguida utilizando 0,1 mg/L de 2,4-D, nas culturas de *Seseli* e de *Angelica* e de 1mg/L de 2,4-D nos ensaios com *Distichoselinum* e com *Daucus*. Nas condições testadas nos meios de indução com 2,4-D, a presença de concentrações mais elevadas de 2,4-D, não aumentou a produção de embriões somáticos em *Angelica*, nem em *Seseli*, nem em *Distichoselinum*; pelo contrário, as culturas com menor concentração (0,1 mg/L para os dois primeiros *taxa*) e de 1mg/L para *Distichoselinum*, apresentaram os melhores resultados. Embora o meio base sem hormona não tenha sido testado nos outros *taxa*, verificou-se em *Distichoselinum* que a auxina não é absolutamente necessária para a indução da embriogénese somática pois a formação de embriões somáticos também ocorreu em meio base MS. Em *Daucus*, verificámos que a produção de calo embriogénico era semelhante em segmentos radiculares e foliares e um terceiro explante foi ensaiado, os segmentos peciolares.

Em todos os casos observou-se embriogénese indireta, ocorrendo a formação de um calo, mais ou menos desenvolvido, precedendo a formação de embriões somáticos. A morfologia dos embriões somáticos seguiu o padrão habitual, sendo observado, em todos os *taxa*, todas as fases (globular, torpedo, cotiledonar), que são morfologicamente semelhantes às da embriogénese zigótica (Vila *et al.*, 2010).

O desenvolvimento do embrião somático foi bastante variável entre os diferentes explantes e até no mesmo explante. A quantidade de embriões formados por explante era, em geral, elevada, sendo em muito casos difícil de contabilizar. Para além disso, verificou-se que os embriões formados por explante apresentavam diferentes fases de desenvolvimento, sendo frequente a germinação precoce. Ambos os parâmetros, quantidade de embriões formados e sincronismo do estágio de desenvolvimento, são essenciais para melhorar as taxas de regeneração de plantas e a eficácia do processo (Canhoto *et al.*, 2005. Na tentativa de avaliar a capacidade embriogénica de *Daucus* e *Seseli*, os dois *taxa* em que essa produção foi maior e se tornava também por isso difícil determinar o potencial embriogénico dos explantes, procedeu-se a uma estimativa da quantificação de embriões, à semelhança de outros autores (Becwar *et al.*, 1987). Utilizando como explante porções de pecíolos de *Daucus*, explante já utilizado por outros autores (Imani *et al.*, 2001; Thi e Pleschka 2005), com base no peso dos calos

embriogénicos verificou-se que 1 g de calo embriogénico produziu 32 plantas para envasamento. Tal como se observou nos resultados de formação de rebentos caulinares pela cultura de ápices caulinares, também na embriogénese os resultados encontrados para *Seseli* foram muito próximos dos de *Daucus*, sendo quantificados em *Seseli* 28 plantas a partir de uma amostra calosa embriogénica.

Em *Angelica sinensis*, uma planta medicinal muito interessante e utilizada na China como analgésico, ansiolítico e estimuladora da circulação sanguínea (Tsay e Huang, 1998; Nalawade *et al.* 2003; Agnihotri *et al.* 2004; Chen *et al.* 2004) a embriogénese foi conseguida em 1998 utilizando 2,4-D (0,5 a 1 mg/L) em células derivadas de embriões imaturos cultivadas em suspensões (Tsay e Huang 1998; Eeva *et al.*, 2003). Nos nossos resultados, os calos embriogénicos de *Angelica* foram produzidos em maior quantidade a partir das porções radiculares em 0,1 mg/L 2,4-D, e puderam ser mantidos *in vitro* mais de um ano, após repicagens mensais para meio de igual constituição. Estes embriões germinaram em meio base embora se observasse a produção de novas massas calosas e de novos embriões somáticos neste meio sem 2,4-D. Resultados de outros autores indicam que a subcultura em meios com 2,4-D pode originar malformações morfológicas, como reportado Yang *et al.* (2011) na embriogénese somática de *Schizandra chinensis*.

O 2,4-D é o PGR mais importante para a indução de embriogénese somática (Jain *et al.*, 2000; Jiménez, 2005), embora alguma evidência aponte para que promova o desenvolvimento de cotilédones anómalos o que resulta em atrasos na germinação (Hussain *et al.*, 2009). O nível endógeno de hormonas pode ser diferente consoante os explantes usados, da mesma planta e entre espécies diferentes e são fator determinante para o seu potencial embriogénico (Jiménez 2005; Jones *et al.*, 2010; Bathoju e Giri, 2012) e é conhecido que tanto as folhas maduras como jovens têm capacidade para a biossíntese de IAA (Jager *et al.*, 2007). As Apiaceae têm um nível endógeno elevado de fitohormonas (Krens *et al.*, 1997) o que poderá ser influente para uma concentração supraótima quando adicionado o 2,4-D às concentrações já elevadas de auxinas endógenas nos tecidos.

Liu *et al.* (1993) referem que a auxina é sintetizada no meristema apical do caule e que o transporte polar (Lee e Cho 2006) da auxina é crucial para a regulação de desenvolvimento normal dos cotilédones; se interrompido este transporte polar pode causar malformações no desenvolvimento dos cotilédones do embrião somático. Tal pode também explicar que a eliminação do 2,4-D do meio de cultura mesmo no meio inicial de indução

pode ser vantajoso para o desenvolvimento normal dos embriões e conversão em plântulas (Yang *et al.*, 2011), tal como observado em *Distichoselinum* onde observou embriogênese somática na ausência de 2,4-D.

No entanto, seguindo um padrão de desenvolvimento da embriogênese *in vitro* convencional (Canhoto 2010; Sarasan *et al.*, 2006), quando houve transferência do material vegetal do meio com 2,4-D para o meio base MS os embriões somáticos evoluíram para plântulas, em todos os *taxa*.

Tanto quanto sabemos, esta é a primeira abordagem sobre a micropropagação de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lainz, um endemismo restrito em Portugal aos solos ultrabásicos de Trás-os-Montes. Esta Apiaceae ibérica é um parente silvestre (CWR) de *Seseli libanotis*, uma espécie com propriedades medicinais comprovadas (Hawkins *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2009). Aliado ao potencial medicinal e farmacológico, os habitats ameaçados de espécies como *Seseli* impõem uma maior urgência e prioridade para estudos e experiências de conservação (Hawkins *et al.*, 2008).

As regiões serpentínicas são caracterizadas por solos ultrabásicos e alojam um tipo de flora específico, sendo no geral mais depauperadas em comparação com regiões vizinhas. O "síndrome serpentínico" é um termo que ilustra o conjunto de diferentes componentes químicos, físicos e bióticos e seus efeitos cumulativos, que caracterizam os fatores edáficos a que as plantas nestes habitats se têm de adaptar (Ornduff *et al.*, 2003).

Essas exigências peculiares de adaptação das plantas serpentínicas podem, eventualmente, contribuir para explicar a resposta *in vitro* da cultura de *Seseli*. Numa análise comparativa dos nossos resultados em experiências com outras Apiaceae endêmicas cultivadas nas mesmas condições *in vitro* (Tavares *et al.*, 2010a), os explantes de *Seseli* foram os mais recalcitrantes e demonstraram diferentes respostas *in vitro*: - um período de tempo mais longo para a germinação das sementes, bem como dos embriões somáticos; - os rebentos foliares apenas enraizaram em meio com pH 6,2-6,4; as plântulas formadas *in vitro* apenas superaram a fase de aclimação após 3-4 meses; a maioria apresentava uma estrutura morfológica muito débil, e facilmente entravam em senescência e morriam. No entanto, a produção de embriões somáticos e de rebentos caulinares, quando otimizadas as condições para a cultura *in vitro* de *Seseli*, atingiu valores muito próximos dos de *Daucus*, o *taxon* que melhor respondeu *in vitro*.

Em todos os quatro *taxa* estudados, a embriogénese somática foi a técnica com a maior *taxa* de plântulas produzidas, mas os dados avaliados sobre as taxas de regeneração de plantas e sua aclimação foram inferiores aos obtidos por proliferação de rebentos.

Este processo de apenas uma etapa para a indução da embriogénese somática é interessante porque reduz o tempo de formação de embriões somáticos e de regeneração de plantas. No entanto, parece potenciar a formação de anomalias morfológicas, como também referido em *Melia azederach* (Vila *et al.*, 2010), bem como a embriogénese secundária e dificulta a separação e a quantificação dos embriões.

Pesquisas laboratoriais anteriores mostraram que a manipulação dos meios de cultura pode aumentar tanto a taxa de indução da embriogénese somática, bem como a tipologia morfológica dos embriões (Canhoto e Cruz, 1994; Brito e Santos, 2009).

4.2.4. Estabilidade do teor de DNA *in vitro* e nas plantas micropropagadas

As culturas *in vitro* podem, por vezes, gerar variabilidade genética (Prado *et al.*, 2010; Hassawi *et al.*, 2012). Leva e Petruccelli (2012) referem que de acordo com a estabilidade genética que proporcionam, as técnicas de propagação podem ser ordenadas (da maior estabilidade para a menor) do seguinte modo: proliferação de rebentos caulinares, organogénese e embriogénese. A micropropagação a partir de meristemas axilares é considerada de baixo risco em termos de instabilidade genética, uma vez que os meristemas organizados são geralmente mais resistentes a alterações genéticas que os tecidos calosos.

As alterações cromossómicas nas plantas micropropagadas podem ser detetadas por citometria de fluxo, utilizando o fluorocromo iodeto de propídio (Loureiro *et al.*, 2007a; 2007b; Yang *et al.*, 2010). Esta metodologia foi utilizada para analisar a ploidia dos explantes e do material vegetal resultante das culturas *in vitro*, nas diferentes amostras de *Daucus*. Assim, avaliado o tecido vegetal de diferentes explantes utilizados (ápices caulinares, segmentos foliares e pecíolos) e das estruturas vegetais resultantes da respetiva cultura *in vitro* em 2,4-D e em BA, verificou-se que o nível de ploidia estimada nos explantes iniciais, no tecido caloso e nas plantas regeneradas era idêntico, não ocorrendo variação, como também reportado para outras espécies e por outros autores (Loureiro *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007; Marum *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011).

Poder-se-á concluir que o tecido embriogénico deste *taxon* é estável nas condições testadas. No entanto, pequenas alterações podem ocorrer e precisam de ser avaliadas recorrendo a outras tecnologias (Brito *et al.*, 2010).

4.2.5. *Floração in vitro*

Neste trabalho foi obtida, pela primeira vez, a floração *in vitro* de *Daucus*. Os rebentos caulinares produzidos *in vitro* progrediram para a fase de floração, uma via morfogenética que tem sido observada *in vitro* em diferentes espécies (Handro e Floh, 2001; Lin *et al.*, 2005; Jana e Shekhawat, 2011).

Das várias combinações ensaiadas nos meios de cultura a proporção de concentrações de 1:3 entre auxina/citocinina (0,5 mg/L de IAA para 1,5 mg/L de BA) foi a que produziu melhores resultados na indução de floração. Durante as 4 semanas de cultura, em que o ciclo de floração se completa, foi no meio com os dois PGRs que se observaram quer a maior quantidade de flores, quer a evolução pelas 4 fases de desenvolvimento floral definidas (fechada; pétalas enroladas verdes; pétalas enroladas brancas; flor aberta). Concluiu-se dos resultados observados em culturas com os PGRs isolados, que a BA produz mais flores quando combinada com IAA, mas a maioria delas não estão totalmente abertas após 4 semanas de cultura. BA isolado produz menos flores e a maioria delas ainda permaneciam fechadas após o mesmo tempo de cultura. IAA isolado produz menor número de flores do que em conjunção com BA, mas parece acelerar a maturação das flores.

Destes dados pode concluir-se que a hormona IAA não só promove a indução de flores como será indispensável neste processo; na verdade, IAA isolado produziu a maior quantidade de inflorescências em todos os meios testados (tratamentos 1 e 2), mas parece existir um efeito sinérgico quando em combinação com BA, condições em que maior quantidade de inflorescências foi formada, no conjunto de todos os meios testados (tratamentos 1 e 2).

É conhecido que o tipo e a concentração de PGRs afeta a indução de floração *in vitro* em muitas espécies (Lin *et al.*, 2005; Vu *et al.*, 2006; Franklin *et al.*, 2011). Na verdade, resultados de outros autores também indicam que BA isolado ou em combinação com IAA na indução floral parecem ter um papel importante na formação de meristemas

florais/inflorescenciais e no seu funcionamento. O efeito combinado da auxina e citocinina na indução floral *in vitro* foi relatado em estudos anteriores em espécies de diferentes famílias (Meeks-Wagner *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 2006; Yadav e Singh, 2011; Pratheesh e Kumar, 2012; Sharma *et al.*, 2012). Estes autores descrevem que estas fitohormonas afetam a floração mediando as mudanças de crescimento das células do meristema apical e que as citocininas, em particular, têm um papel chave na iniciação da mitose e na regulação da divisão celular e na formação de órgãos. Um número de estudos relata a utilização de citocininas na floração *in vitro* em diferentes espécies, como *Murraya paniculata*, em que é igualmente indicado um efeito benéfico da BA na indução de floração (Taha e Haron, 2008). Na verdade, BA terá um papel importante não só como um regulador do crescimento, mas também como um fator de regulação da formação de órgãos florais nas plantas regeneradas (Yadav e Singh, 2011). Em concordância com os nossos resultados foi referido por outros autores que a citocinina será indispensável para a floração *in vitro*, pois promove a transição da fase vegetativa de algumas plantas superiores para a sua fase reprodutiva, sendo BA amplamente utilizada para a floração *in vitro* em muitas rosáceas e noutras espécies vegetais (Scorza e Janick 1980; Sudarshana *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Pratheesh e Kumar, 2012).

Um protocolo *in vitro* para a rápida multiplicação e floração *in vitro* foi também descrito para *Eryngium foetidum* (Chandrika *et al.*, 2011) com a adição de citocininas (BA e cinetina); Ignacimuthu *et al.* (2004) conseguiram a floração *in vitro* com suplemento de citocinina e auxina em conjunto, e a embriogénese somática, em 1993, pela cultura de explantes foliares com 2,4-D (Ignacimuthu *et al.*, 1993).

Tal como observado noutros estudos de floração *in vitro* (Taha e Haron, 2008), a morfologia das flores de *Daucus in vivo* e produzidas *in vitro* é muito semelhante. As observações ao microscópio ótico permitiram concluir que a partir dos 4 dias da cultura *in vitro* do explante começam a diferenciar-se na região periférica células meristemáticas, com núcleo evidente e conteúdo citoplasmático denso, tal como referido em estudos noutras espécies (Lin, 1987; Sudarshana *et al.*, 2008). Embora as flores produzidas *in vitro* fossem semelhantes às produzidas *in vivo*, não foi possível obter a germinação do pólen formado *in vitro*. Esta situação poderá estar relacionada com o facto das elevadas condições de humidade existentes nas culturas *in vitro* não permitirem uma eficaz dessecação do pólen. No entanto, o facto do pólen produzido *in vivo* também não ter

germinado sugere que outros fatores podem estar envolvidos na inibição da maturação e germinação e que o pólen formado *in vitro* poderá ter potencial de germinação.

Ao contrário do que acontece noutras *taxa*, como *Arabidopsis*, em que a floração ocorre *in vitro* (Wang *et al.*, 2002; Jana e Shekhawat, 2011), não foi possível obter sementes de *Daucus* nestes ensaios, o que sugere que a fecundação não ocorre. Esta ausência de formação de semente poderá ser resultante de vários fatores como sejam as já referidas deficiências no desenvolvimento do pólen, mecanismos de autoincompatibilidade, ou deficiências na parte feminina da flor.

O processo descrito no presente estudo para a indução controlada da floração *in vitro*, além de constituir um modelo para os estudos de biologia fundamental do desenvolvimento floral, pode ter valor prático no melhoramento vegetal e em estudos de fertilização *in vitro*. É especialmente pertinente em espécies raras, pouco disponíveis, anuais e bienais, como o caso de *Daucus carota*, visto este processo poder ser induzido em qualquer altura do ano, o que permite encurtar o ciclo de vida de plantas. Para além disso, sendo uma planta produtora de metabolitos secundários, esta tecnologia permitirá uma produção mais alargada e rentável, com base numa utilização sustentável, sem devastação dos recursos naturais, conforme referido por outros autores para outras espécies igualmente produtoras de compostos exclusivos de uso farmacêutico, alimentar, ornamental e outros (Singh 2002; Yadav e Singh, 2011).

À semelhança de outros estudos de floração *in vitro* (Janowska *et al.*, 2009; Yadav e Singh, 2011) nomeadamente em *Arabidopsis* (Koonneef *et al.*, 1998) foi avaliado o efeito do ácido giberélico (GA₃) e da sacarose no controlo da floração *in vitro* de *Daucus*, observando-se um efeito estimulador em todas as concentrações testadas de GA₃ e apenas na concentração de 6% de sacarose, relativamente à resposta observada no meio base, em que o processo também se verificou. Algumas referências indicam que GA₃ provavelmente desempenha um papel importante no processo de floração não só como um regulador do crescimento de plantas, mas também como um fator de regulação da formação de órgãos florais em plantas regeneradas (Tang, 2000). A sacarose é conhecida por ser a principal fonte de carbono para a cultura *in vitro* em estudos de floração e pela sua disponibilidade, na parte aérea da planta, promover a floração da *Arabidopsis thaliana*. A sacarose e as citocininas parecem interagir no processo de indução floral em *Sinapis alba* (cit. in Yadav e Singh, 2011).

4.2.6. Avaliação geral da resposta *in vitro*

A propagação de espécies ameaçadas é importante não só para fins de conservação, mas também porque os *taxa* silvestres são uma fonte de diversidade genética que pode ser usada para melhorar ou desenvolver culturas com novas características genéticas através de hibridação (sexual ou somática) ou de transformação genética de plantas (Bajaj 1994; Pellegrineschi, 2005; Maxted *et al.*, 2006; Baranski, 2008).

De todas as Apiaceae ibéricas endêmicas, *D. carota* subsp. *halophilus* revelará maior interesse e merecerá atenção acrescida visto ser um endemismo exclusivamente português. Para além disso, é também um *taxon* tolerante à salinidade que pode ser usado para transferir essa característica para cultivares de cenoura - *D. carota* subsp. *sativus* - (Baranski, 2008) e também para utilização em estudos de agricultura biosalina (Öztürk *et al.*, 2006), idênticos aos de *Crithum maritimum* (Atia *et al.*, 2011), outra Apiaceae halófita e que se encontra com facilidade nas zonas costeiras de norte a sul de Portugal continental. Ao estudar os usos tradicionais e de fitoquímica, verificámos também que os óleos essenciais produzidos em *D. carota* subsp. *halophilus*, que serão descritos na seção correspondente, têm propriedades antifúngicas (Tavares *et al.*, 2008).

Como se sabe, são múltiplos os fatores que influem no sucesso da micropropagação, do qual depende a produção em larga escala e em menos tempo e custos. Mais estudos sobre a propagação *in vitro* destas Apiaceae podem melhorar a otimização de protocolos, principalmente nas condições necessárias para aumentar o rendimento e a qualidade do processo embriogénico, nomeadamente pela redução da germinação precoce dos embriões e tentativas de melhorar as taxas de germinação de embriões somáticos e a sua conversão em plântulas.

No entanto, é possível selecionar as técnicas consoante o objetivo da micropropagação com estes quatro *taxa*. Para a produção de rebentos caulinares em maior quantidade deve utilizar-se 2mg/L de BA nos meios de cultura dos 4 *taxa*, utilizando segmentos foliares em *Distichoselinum* e o ápice caulinar para os restantes três. A embriogénese somática é mais eficaz utilizando segmentos foliares e 0,1mg/L 2,4-D em *Seseli* e a mesma concentração em segmentos de raiz em *Angelica*; a concentração de 1mg/L 2,4-D foi a que produziu melhor resposta na embriogénese em segmentos foliares *Distichoselinum* e no pecíolo de *Daucus*. Neste *taxon*, para o processo repetitivo de

floração *in vitro*, devem usar-se os meristemas axilares (de plantas silvestres ou estabelecidas *in vitro*) com a adição conjunta de BA (1,5 mg/L) e de IAA (0,5 mg/L).

4.2.7. Aclimação e conservação *ex situ* e *in situ*

As plantas dos quatro *taxa*, obtidas quer pela proliferação de gemas axilares ou por embriogénese somática foram aclimatadas com sucesso e estão integradas nas coleções do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. No entanto, as plantas produzidas por embriogénese apresentavam-se, no geral, mais finas e menos vigorosas do que as produzidas pela proliferação de meristemas. Talvez a exposição à BA explique a maior biomassa das plantas originadas neste meio de cultura relativamente às plantas produzidas por embriogénese, sob a ação de 2,4-D. Na verdade, tem sido observado que plantas derivadas de cultura *in vitro* sob a ação de citocininas se apresentam mais vigorosas do que as plantas resultantes de reprodução vegetativa convencional (Lin *et al.*, 2007). Também os meristemas apicais contêm menor contaminação endofítica e são mais vigorosos durante a fase inicial de crescimento rápido (Aazami, 2010).

Esta tecnologia permite reduzir a pressão sobre as populações selvagens possibilitando mais estudos sustentáveis deste *taxon* e a avaliação da sua diversidade genética, através de marcadores moleculares, e o estudo e a comparação entre os óleos essenciais de plantas produzidas *in vitro* e colhidas no campo.

A morfologia das plântulas produzidas *in vitro* por embriogénese somática e por proliferação de rebentos é idêntica à das plantas silvestres, nos 4 *taxa* testados; de referir, no entanto que, a *Daucus* apresentava maior porte, maior altura, menor tamanho das umbelas e maior desenvolvimento das folhas quando cultivada em condições *ex situ*. Talvez esta situação possa ser explicada pelas condições edafoclimáticas *ex situ*, de Coimbra, serem mais amenas relativamente ao cabo S. Vicente. Neste habitat, de onde a planta é nativa, as condições são mais extremas, de mais secura, maior salinidade, temperatura e vento, que obrigará a planta a adaptar a sua morfologia em função do ambiente mais agreste.

Seseli, apesar de vegetar em solo de rochas ultrabásicas, apresentou uma morfologia *in vitro* idêntica à das plantas nativas, e respondeu bem, quer ao meio de cultura *in vitro*, com pH de 6,2-6,4, quer nas culturas em viveiro do jardim botânico.

Embora esteja no primeiro ano da instalação nos viveiros do jardim, o *Seseli* já floriu e frutificou uma planta nos canteiros da escola médica, resultante da micropropagação pela cultura de ápices caulinares. Tudo indica que o grupo de plantas resultante da micropropagação por embriogénese somática e atualmente no viveiro, para o ano completa o ciclo de vida, com a produção de flores e sementes viáveis, à semelhança do que se observou nos outros dois *taxa* instalados *ex situ* no jardim botânico (*Daucus* e *Angelica*). *Distichoselinum* foi já integrado na escola médica pela propagação por organogénese, estando plantas micropropagadas por embriogénese somática, em fase de floração avançada, começando a formar-se os primeiros frutos, no viveiro do jardim botânico

Foi igualmente bem sucedida a adaptação de *Daucus in situ*, no habitat natural, Cabo S. Vicente, demonstrando assim o potencial desta metodologia para a sua conservação. Pelo contrário, fatores não diretamente relacionados com a metodologia para a instalação da plantas na ilha Berlenga, provenientes de embriogénese de *Angelica*, condicionaram o sucesso da transferência.

Na fase de aclimação em estufa, e em exterior dos quatro *taxa* testados, apenas variou o tempo de instalação das diferentes plantas, sendo *Daucus* a planta mais facilmente adaptável e mais rápida a completar o ciclo de vida e *Seseli* a mais difícil pelo tempo que demorou a desenvolver-se *in vitro*. Certamente estas características refletem as das plantas em habitat natural: a floração de *Daucus* começa em abril e termina em junho no Cabo S.Vicente; a floração de *Angelica* começa em maio e termina em junho; a floração de *Distichoselinum* começa em junho e termina em agosto em Moncarapacho, em Loulé; a floração de *Seseli* começa em setembro e termina em outubro no Samil e Alimonde, em Bragança. De referir ainda que dos quatro *taxa*, *Daucus* é a única bienal – floresce apenas no segundo ano do ciclo de vida, tal como verificado nos ensaios com as plantas micropropagadas e *in situ* bem como nas plantas micropropagadas e instaladas no jardim botânico. Os outros três *taxa* são plantas rizomatosas, pelo que vivazes, podendo cada planta vegetar anualmente. A referida característica da *Daucus* apresenta uma desvantagem, pela conseqüente menor taxa de sobrevivência e, também por isso, a maior exigência em cuidados de preservação. Por outro lado, talvez explique a rápida resposta *in vitro* quando comparada com as Apiaceae estudadas, sendo a *Daucus carota* um modelo comumente utilizado e desde longa data (Reinert, 1958; Steward *et al.*, 1958).

Mais uma vez se reconhece que o conhecimento do ciclo de vida e das condições edafoclimáticas do habitat natural são aspetos muito importante para entender e poder gerir com maior eficácia as condições, os resultados e as aplicações das culturas *in vitro*.

A conservação *ex situ* completou-se ainda com a integração de sementes de onze taxa conforme referimos na Tabela 8 e em bancos de sementes nacionais e internacionais, como o *Millenium Seed Bank*.

4.3. CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

De 420.000 plantas com flor do mundo inteiro mais de 50.000 são utilizadas para fins medicinais e cerca de 80% da população que habita em países desenvolvidos depende dos recursos vegetais para os cuidados de saúde, sendo cerca de 2.500 plantas pertencentes a 1.000 géneros utilizadas na medicina tradicional (Goyal, 2011). Estes indicadores mundiais recentes atestam bem a importância das plantas enquanto matéria prima para fins medicinais, bem como a dependência do Homem relativamente aos recursos naturais.

Nos últimos anos, a pesquisa em plantas aromáticas e medicinais tem sido crescente, particularmente o estudo dos óleos essenciais e outros metabolitos secundários, pelas suas propriedades biológicas com potencial terapêutico, recorrendo, em grande parte, ao conhecimento empírico baseado na sua utilização tradicional ao longo dos séculos (Burt, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Edris, 2007; Machado, 2010; Goyal, 2011; Zuzarte *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais são misturas complexas que possuem boatividade como antifúngicos, antioxidantes, anti-inflamatórios e outras atividades, com interesse na indústria alimentar e cosmética, bem como no campo da saúde humana (Machado, 2010; Miguel, 2010; Zuzarte *et al.*, 2011).

As plantas silvestres, ou cultivadas *in vitro*, podem ser usadas para a extração de OE ou de outros metabolitos secundários. No entanto, por razões ecológicas, deve ser acautelada a recolha de grandes quantidades de plantas em habitat natural, pois pode ameaçar a preservação da espécie e reduzir a biodiversidade. Portanto, o desenvolvimento de protocolos eficazes para a propagação de plantas em grande quantidade e extração de produtos químicos de interesse e aplicações variadas podem, assim, evitar a sobre-

exploração das populações nativas, com a vantagem acrescida de permitir a propagação em grande escala e em condições controladas em qualquer altura do ano.

Muitos investigadores têm demonstrado o enorme potencial destes produtos naturais como agentes antifúngicos. Por exemplo, Zuzarte *et al.* (2011) reportaram a atividade antidermatofítica de vários óleos essenciais em modelos *in vitro* e *in vivo*, bem como o mecanismo de ação envolvido.

O conhecimento da modalidade e do mecanismo de ação dos OE é crucial para garantir a sua utilidade na prática terapêutica (Lahlou *et al.*, 2004); em geral, os compostos antifúngicos mais ativos dos OE são principalmente os terpenos fenólicos tais como carvacrol e timol. Estes compostos provaram ser capazes de atuar nas paredes celulares e nas membranas afetando a permeabilidade e a libertação de constituintes intracelulares (Bajpai *et al.*, 2009). Muitas vezes a atividade antifúngica dos OE não será devida a um só mecanismo de ação, mas resultará do efeito em vários alvos celulares (Zuzarte *et al.*, 2011).

A composição química e a atividade antifúngica de óleos essenciais dos géneros de Apiaceae, que têm representantes endémicas ibéricas, presentes em Portugal, têm sido atualizadas por vários autores. Por exemplo, os OEs de umbelas de *Daucus carota* da Sardenha ricos em β -bisaboleno e 11- α -(H)-himachal-4-en-1- β -ol, evidenciaram uma boa atividade antifúngica, particularmente para dermatófitos e *Cryptococcus neoformans*, com valores de CMI de 0,16-0,64 μ L/mL (Maxia *et al.*, 2009). Em *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* são constituintes maioritários do óleo o α -neocalitropseno, isocariofileno-14-al, 14-hidroxi- β -cariofileno, óxido de cariofileno e o *E*- β -cariofileno e foi demonstrada boa atividade contra dermatófitos (Cavaleiro *et al.*, 2011) e *Ferula hermonis* apresentou como constituintes principais dos óleos essenciais, α -pineno, α -bisabolol e 3,5-nonadieno e boa atividade antifúngica (Al-Ja'fari *et al.*, 2011).

Seguidamente discutem-se os principais resultados obtidos com os óleos essenciais das Apiaceas endémicas em Portugal.

4.3.1. *Daucus carota* subsp. *halophilus*

A caracterização e a atividade antifúngica do óleo essencial de *Daucus carota* subsp. *halophilus* foram pela primeira vez analisadas neste trabalho (Tavares *et al.*, 2008).

No que respeita ao óleo obtido das umbelas de *Daucus carota* subsp. *halophilus* observou-se uma grande variabilidade na composição química do óleo durante a ontogénese, particularmente na quantidade de elemicina que aumenta significativamente com a maturação das umbelas (5,9% vs. 31,0%). Resultados semelhantes foram obtidos para o óleo de *Daucus carota* da Córsega (Gonny *et al.*, 2004) em que o conteúdo em fenilpropanóides, particularmente o de *E*-metilisoegenol, aumentou significativamente nas umbelas maduras. A partir desses resultados, podemos inferir que em *Daucus carota* os fenilpropanóides ocorrem em maior quantidade durante a fase de amadurecimento das sementes.

O óleo obtido das umbelas maduras de *Daucus carota* subsp. *halophilus* é diferente dos óleos obtidos de outras subespécies de *Daucus carota* nativas de Portugal (conforme desenvolvemos na seção 3.3.5.1.) e de outras subespécies presentes noutros países.

Por exemplo, o óleo da subespécie cultivada, *Daucus carota* subsp. *sativus*, na China, tem carotol e α -pineno (Wu *et al.*, 2006) e o óleo das sementes de *Daucus carota* subsp. *gummifer* em Espanha caracteriza-se por ter teores elevados de acetato de geranilo (Pinilla *et al.*, 1995).

Os óleos das sementes da subsp. *maximus* do Líbano têm metilisoegenol, α -bisaboleno e α -asarona como principais componentes (Saad *et al.*, 1995).

O óleo obtido a partir das umbelas com frutos de plantas silvestres de *Daucus carota* subsp. *carota* na Polónia (Góra *et al.*, 2002; Staniszevska *et al.*, 2005) e Lituânia (Mockute e Nivinskiene, 2004) foi caracterizado por altos teores α -pineno e sabineno. O constituinte principal do óleo das umbelas floridas e maduras de *Daucus carota* L. subsp. *carota* na Sardenha é o β -bisaboleno (17,6-51,0%) e 11- α -(H)-himachal-4-en-1- β -ol (9,0-21,6%); os óleos de amostras portuguesas desta subespécie caracterizam-se por terem acetato de geranilo (5,2-65,0%) e α -pineno (3,5-37,9%) como principais compostos (Maxia *et al.*, 2009). Mais recentemente Marzouki *et al.* (2010) analisaram os óleos de umbelas de *D. carota* em dois locais diferentes na Tunísia. Encontraram como principais componentes o sabineno (12,0-14,5%), 1-selineno-(7,4-8,6) e 11- α -(H)-himachal-4-en-1- β -ol (12,7-17,4%) na localidade de *Sejnane*, enquanto que os óleos de *Tunis* foram predominantemente constituídos por carotol (48,0-55,7%) e elemicina (31,5-35,3%).

A maioria dos trabalhos em *Daucus carota* não menciona a subespécie, pelo que alguma da variabilidade química encontrada pode dever-se ao facto de não se tratar do

Discussão

mesmo *taxon*, bem como pelas plantas não terem sido colhidas todas no mesmo estágio vegetativo.

Tendo em conta que a taxonomia de *Daucus carota* é bastante complexa, a ausência de indicação da subespécie em estudo pode por em causa os resultados obtidos.

No que respeita aos resultados por nós obtidos com *taxa* nativos de Portugal, podemos concluir que as quantidades elevadas de elemicina nos óleos das sementes de *Daucus carota* subsp. *halophilus* permite distingui-los das outras subespécies.

Os óleos essenciais são conhecidos por possuir atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos e os óleos de algumas subespécies de *Daucus carota* provaram ter atividade antibacteriana (Kilibarda *et al.*, 1996; Staniszewska *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2007a; 2007 b; Marzouki *et al.*, 2010). Os nossos resultados demonstraram que o óleo de *Daucus carota* subsp. *halophilus* apresentou atividade antifúngica eficaz contra dermatófitos, sendo o óleo rico em elemicina nas umbelas maduras provenientes do Cabo de S. Vicente e Arrifana, o mais ativo com valores de CMI e CML que variam de 0,16-0,64 $\mu\text{L/mL}$. Numa outra publicação, a elemicina revelou também uma marcada atividade antimicrobiana contra *Campylobacter jejuni* (Rossi *et al.*, 2007a).

Variações das percentagens dos principais componentes de óleos essenciais e também da sua atividade antimicrobiana, em função do estado de maturação da planta e da localização geográfica foram observados em diferentes fase de maturação das umbelas de *Smyrniium olusatrum* em Portugal e Itália (Marongiu *et al.*, 2012), bem como nos óleos das umbelas de *D. carota* subsp. *carota* em duas localidades da Tunísia (Marzouki *et al.*, 2010).

Estes resultados, mostram que estes *taxa* apresentam interessantes atividades antimicrobianas, o que justifica o uso tradicional destas plantas, sendo, no entanto, necessário uma investigação mais aprofundada para avaliar a adequação dessas propriedades antifúngicas em aplicações práticas.

Observações de cortes histológicos do pedicelo das flores *in vitro* mostraram canais secretores associados com os feixes fibrovasculares em linha radial com os feixes condutores apresentando camadas de células concêntricas a envolver o lúmen. As características histológicas destas estruturas secretoras formadas *in vitro* são típicas das Apiaceae para a produção e circulação dos óleos essenciais (Corsi e Biaci 1998; Veter, 2004), sendo assim a morfologia *in vitro* semelhante à das plantas nativas.

A avaliação da composição química do óleo das umbelas maduras das plantas micropropagadas, instaladas nos viveiros do jardim botânico, revelou ser muito semelhante ao óleo das plantas nativas. Resultados idênticos foram reportados para outras plantas aromáticas também propagadas *in vitro* (Zuzarte *et al.*, 2010).

4.3.2. *Distichoselinum tenuifolium*

Os óleos de *Distichoselinum tenuifolium* foram caracterizados por um alto teor em mirceno (> 48%) e não se verificaram variações significativas na composição química durante a ontogênese das umbelas. *Distichoselinum tenuifolium* (= *Elaeoselinum tenuifolium*) (Castroviejo *et al.*, 2003) é a única espécie do género taxonomicamente relacionado com *Elaeoselinum*, em que o óleo é rico em mirceno. Na verdade, na maioria das espécies de *Elaeoselinum*, o pineno é o principal componente dos óleos (Ortega *et al.*, 1986; Pala-Paul *et al.*, 2001). Estes resultados suportam a separação dos dois *taxa* (*Elaeoselinum* e *Distichoselinum*), apoiada não só por estes estudos fitoquímicos como também por caracteres taxonómicos (Grande *et al.*, 1986; 1991a; 1991b).

Os nossos resultados demonstraram que o óleo de *Distichoselinum tenuifolium* demonstrou atividade antifúngica eficaz contra *Cryptococcus neoformans* e estirpes de dermatófitos, com valores de CMI e CML variando de 0,32 µL/mL e 1,25 µL/mL. Na maioria dos casos, o CMI foi equivalente ao CML, indicando um efeito fungicida do óleo. Esses resultados destacam a possibilidade de utilização do óleo *Distichoselinum tenuifolium* em dermatomicoses, infeções comuns causadas por fungos filamentosos e leveduras, que podem revelar-se de muita gravidade especialmente em pacientes imunocomprometidos. A maior suscetibilidade dos óleos para os dermatófitos foi também relatada para óleos essenciais de outras famílias botânicas (Figueiredo *et al.*, 2008; Zuzarte *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2009).

A maior atividade antifúngica do óleo de *Distichoselinum tenuifolium* comparada com a do seu principal composto (mirceno), quando analisado individualmente, é presumivelmente devida ao efeito sinérgico entre os diferentes compostos presentes no óleo. Não foi previamente observada citotoxicidade para mirceno, o composto principal do óleo *Distichoselinum tenuifolium*, em linfócitos humanos e fibroblastos de pulmão de hamster (Kauderer *et al.*, 1991). Globalmente, os resultados fornecem evidências

consistentes de que o óleo de *Distichoselinum tenuifolium* tem atividades anti-inflamatórias e antifúngicas (Tavares *et al.*, 2010b). Este estudo também justifica e reforça o uso desta planta na medicina tradicional na Península Ibérica, principalmente no tratamento de dermatite de contato, caracterizada por uma forte componente inflamatória, e em infeções de pele. Experiências adicionais devem ser exploradas com maior profundidade, para fundamentar melhor a utilização dos EOs deste *taxon* no tratamento de doenças inflamatórias e de infeções causadas por fungos.

4.3.3. *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*

Tanto quanto sabemos não há informações sobre o óleo essencial de *S. montanum* subsp. *peixotoanum*. Há apenas um trabalho que relata a composição do óleo de *S. montanum* subsp. *tommasinii*, e que demonstra quantidades importantes de β -pineno (30,2%), germacreno D (10,1%), sabineno (8,0%), α -pineno (7,2%) e limoneno (6,6%) (Siljegović *et al.*, 2011). De acordo com os nossos resultados, as quantidades de germacreno D e sabineno podem ajudar a distinguir esta subespécie da subsp. *peixotoanum*.

Os óleos de *S. tortuosum*, outra espécie portuguesa (Gonçalves *et al.*, 2012b) que foi também por nós caracterizada, apresenta teores elevados de α -pineno e β -pineno (% > 45) como *S. montanum* subsp. *peixotoanum*. No entanto, o óleo *S. tortuosum* tem grandes quantidades de Z- β -ocimeno, enquanto *S. montanum* subsp. *peixotoanum* possui quantidades importantes de limoneno e β -elemeno. Da mesma forma, elevados teores de pinenos também foram observados nos óleos de *S. tortuosum* da Turquia (> 42%) (Kaya *et al.*, 2003), Irão (> 35%) (Zohreh *et al.*, 2003) e Itália (> 31%) (Bader *et al.*, 2003). Também as espécies *S. campestre* da Anatólia (Kaya *et al.*, 2010) e *S. rigidum* da Sérvia (Savikin-Fodulovic *et al.*, 2006; Stojkovic *et al.*, 2009) apresentam altos teores de pinenos (> 52%)

Os nossos dados demonstraram que o óleo de *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* mostrou ser pouco ativo contra leveduras e fungos filamentosos. Contrariamente, a outra espécie portuguesa (*S. tortuosum*) demonstrou ser ativa especialmente para dermatófitos e *Cryptococcus neoformans*.

4.3.4. *Thapsia minor*

O género *Thapsia* L. é amplamente distribuído em toda a área do Mediterrâneo e Península Ibérica, onde está representado por seis espécies (Castroviejo, 2003). Algumas destas espécies são consideradas fontes naturais de tapsigarginas. Tanto quanto é do nosso conhecimento não há qualquer informação sobre a composição química do óleo essencial de *Thapsia minor* Hoffmanns & Link, nem da sua atividade biológica, embora a atividade antimicrobiana do seu principal constituinte, o acetato de geranilo, tenha sido já relatada (Humeirah *et al.*, 2010).

Os nossos resultados permitem concluir que o óleo deste *taxon* pode constituir uma fonte importante de acetato de geranilo (> 80%) e que a planta apresenta um alto rendimento em óleo essencial, o que lhe confere boas aplicabilidades industriais. Por outro lado observámos que o óleo essencial de *Thapsia minor* tem atividade antifúngica contra dermatófitos, *C. neoformans* e *C. guillermondii*.

O uso potencial de óleos essenciais de *Thapsia minor* como agentes antimicrobianos, não tinha ainda sido descrito. Na verdade, existem apenas poucos trabalhos que relatam o papel antimicrobiano de acetato de geranilo, o principal constituinte do óleo essencial de *Thapsia minor*. Um trabalho recente de Zore *et al.* (2010) demonstra que o acetato de geranilo revelou muito boa atividade contra candidíases, tendo ação sinérgica significativa com fluconazol, em concentrações que não afetam a viabilidade das células humanas. Além disso, o acetato de geranilo demonstrou ter atividade bactericida contra *Campylobacter jejuni* (Friedman *et al.*, 2002) e *E. coli* (Van Zyla *et al.*, 2010).

Discussão

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS



Recorrendo a diferentes estratégias foi concretizada a conservação *ex situ* de 13 *taxa* de Apiaceae ibéricas endémicas e presentes em Portugal: *Eryngium galioides* Lam.; *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss.; *Daucus carota* subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas; *Conopodium subcarneum* (Boiss. & Reut.) Boiss.; *Conopodium majus* (Gouan) Loret subsp. *marizianum* (Samp.) López-Udias & Mateo; *Seseli montanum* L. subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lainz; *Angelica major* Lag.; *Angelica pachycarpa* Lange; *Ferula communis* subsp. *catalaunica* (Pau ex C. Vicioso); *Ferulago capillaris* (Link ex Spreng.) Cout.; *Distichoselinum tenuifolium* (Lag.) García Martín & Silvestre; *Laserpitium eliasii* subsp. *thalictrifolium* (Samp.) P. Monts; *Thapsia minor* Hoffmanns. & Link.

Plantas vivas e coleções de sementes destes *taxa* foram preservados no Jardim Botânico de Coimbra (banco de sementes e em coleções vivas) e em instituições congéneres, incluindo o *Millenium Seed Bank*. Mais de 150 exemplares-testemunho estão incluídos no Herbário COI.

Em resultado das análises efetuadas no campo e da análise da literatura foram estabelecidos os critérios de prioridade de conservação dos *taxa*. O *taxon* *Bunium macuca* subsp. *macuca* é o único dos 14 endemismos ibéricos desta família em Portugal, referidos na Flora Ibérica, que não foi localizado nem de que obtivemos referências. Constitui também por isso um estímulo para que possa ser esclarecida a sua distribuição em Portugal e para isso sejam desenvolvidos trabalhos de investigação entre especialistas de Portugal e Espanha, de modo a ser concretizada a necessária atualização deste e de todos os endemismos ibéricos.

Recorrendo a metodologias complementares (morfometria, microscopia ótica e de *scanning*, citometria de fluxo e caracterização dos óleos essenciais) avaliou-se a quimiotaxonomia de alguns *taxa* de morfologia mais complexa, *Daucus carota* subsp. *halophilus* e *Eryngium duriaei*. Com base neste estudo foi possível separar *D. carota* L. subsp. *maximus* (Desf.) Bal das outras três subespécies nativas em Portugal continental (*D. carota* subsp. *carota*; *D. carota* subsp. *gummifer* (Syme) Hook. e *D. carota* subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas), bem como fundamentar a separação em duas subespécies de *Eryngium duriaei* (*E. duriaei* J. Gay ex Boiss., a subsp. *duriaei* e a subsp. *juresianum* (M. Lainz) M. Lainz).

Para os quatro *taxa* considerados mais vulneráveis (*Daucus carota* subsp. *halophilus*, *Distichoselinum tenuifolium*, *Angelica pachycarpa* e *Seseli montanum* subsp.

peixotoanum) foram desenvolvidos protocolos de micropropagação que permitem a multiplicação destas espécies em larga escala, por meio de embriogénese somática ou por proliferação de meristemas. As plantas micropropagadas dos 4 *taxa* completaram o ciclo de vida em condições *ex situ* produzindo sementes viáveis. Do ponto de vista da conservação estes protocolos são importantes pois permitem evitar a recolha exagerada de plantas no campo em *taxa* que se encontram ameaçados. As análises de citometria efetuadas, permitiram concluir que, pelo menos no caso de *Daucus carota* subsp. *halophilus*, as plantas produzidas *in vitro* apresentam o mesmo nível de ploidia que as plantas nativas, situação que não exclui a possível ocorrência de outros tipos de variabilidade genética que poderão ser detetados fazendo uso de marcadores moleculares. Embora os ensaios efetuados tenham permitido a multiplicação dos diferentes *taxa*, os meios de cultura testados, em particular em termos das concentrações e combinações de reguladores de crescimento, foram limitadas pelo considerável número de *taxa* analisados. Nesta perspetiva, torna-se necessário testar outros meios de cultura, com outros reguladores de crescimento para otimizar as respostas conseguidas.

No caso particular de *Daucus carota* subsp. *halophilus*, um endemismo exclusivo de Portugal, estabeleceu-se um protocolo para a indução floral *in vitro* em condições controladas. A formação de flores *in vitro* é um tipo de morfogénese relativamente raro. Protocolos deste tipo são importantes para o estudo dos fatores envolvidos no controlo da floração e, no caso concreto deste *taxon*, a floração *in vitro* assume também importância sob a perspetiva da conservação, pois abre a possibilidade de conseguir o ciclo de propagação completo desta planta em condições laboratoriais. Sendo este um *taxon* bienal maior pertinência assume esta hipótese. Tentativas de conseguir este objetivo estão atualmente em curso.

A valorização de seis *taxa* (*Eryngium duriaei* subsp. *duriaei*, *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum*, *Daucus carota* subsp. *halophilus*, *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum*, *Distichoselinum tenuifolium* e *Thapsia minor*) foi conseguida através da caracterização dos óleos essenciais e avaliação da atividade antifúngica de alguns deles contra agentes patogénicos como leveduras e fungos filamentosos. Os dados experimentais permitiram concluir que *Daucus carota* subsp. *halophilus* é o *taxon* com maior potencial antifúngico, em especial contra dermatófitos e *Cryptococcus neoformans*. O óleo é particularmente rico em elemicina, obtido das umbelas com sementes maduras, e é

particularmente eficaz contra estes microrganismos. Também *Distichoselinum tenuifolium* e *Thapsia minor* revelaram ter propriedades antifúngicas, sendo mirceno e acetato de geranilo o constituinte maioritário do óleo, respetivamente. Estes resultados suportam o uso destas plantas na medicina tradicional, em especial no tratamento de infeções dérmicas. No entanto, estudos mais detalhados sobre o efeito destes metabolitos devem ser efetuados antes da sua utilização no tratamento de algumas doenças. Para além disso, utilizando as metodologias descritas poderão vir a ser estudados e, simultaneamente, preservados, outros *taxa* de entre os endemismos portugueses desta família, dando continuidade à valorização e utilização sustentada de recursos naturais.

Apesar do ensaio da instalação *in situ* de plantas micropropagadas de *D. carota* subsp. *halophilus* ter sido bem sucedido, o que atesta a possibilidade de replicação do protocolo utilizado, e dos esforços desenvolvidos para a instalação das plantas micropropagadas de *Angelica pachycarpa* na ilha Berlenga, ressalta deste trabalho a dificuldade encontrada para apoiar e monitorizar as experiências de campo. A instalação *in situ* de plantas raras deve ser o objetivo primordial de qualquer trabalho de conservação que sem um suporte logístico, institucional e técnico competente dificilmente se conseguirá. Apesar disso, não só as experiências de micropropagação dos *taxa* estudados deverão ser objeto de mais pesquisa, como constituem um estímulo para ampliar o estudo de conservação a todas as Apiaceae endémicas portuguesas.

CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Referências bibliográficas

- Aazami MA. (2010) Effect of some growth regulators on “in vitro” culture of two *Vitis vinifera* L. cultivars. *Romanian Biotechnological Letters*, 15:5229-5232.
- Adams M, Berset C, Kessler M, Hamburger M. (2009) Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders - A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 121:343-359.
- Adams RP. (1995) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Agarwal SG, Kichlu SK, Paul R, Kaul MK. (2005) Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flavour and Fragrance Journal*, 20:403-406.
- Agnihotri VK, Thappa RK, Meena B, Kapahi BK, Saxena RK, Qazi GN, Agarwal SG. (2004) Essential oil composition of aerial parts of *Angelica glauca* growing in North-West Himalaya (India). *Phytochemistry*, 65:2411-2413.
- Aguiar C, Capelo C, Carlos Costa JC, Fontinha S, Espirito-Santo D, Jardim R, Lousa M, Rivas-Martinez S, Mesquita S, Sequeira M, de Sousa J. (2004) A paisagem vegetal da Ilha da Madeira. *Quercetea*, 6: 3-200. ALFA, Lisboa. Portugal.
- Aguiar C, Honrado JJ, Alves P, Caldas FB, Nepomucen H, Jansen J, Sequeira J. (2001) *Terceira aproximação à lista da flora rara e a proteger no Norte de Portugal Continental: II Gimnospermas e Angiospermas*. 2º Congresso Nacional de Conservação da Natureza. Lisboa.
- Aguiar C. (1996) *Distribuição geográfica e estatuto de ameaça das espécies da flora a proteger*. Relatório final. Escola Superior Agrária de Bragança. (http://www.icn.pt/prsn2000/caract_flora.htm) (acedido em 24/5/2006).
- Aguiar C. (2001) Flora e vegetação da Serra de Nogueira e do Parque Natural de Montesinho. *Tese de doutoramento*. Universidade de Lisboa.

Referências bibliográficas

- Aguiar C. (2012) Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente Volume III • Sistemática. Instituto Politécnico de Bragança. Pp. 87-88. (<http://hdl.handle.net/10198/6970>) (acedido em 25/7/2012).
- Aguilar R, Quesad M, Ashworth L, Herrerias DY, Lobo J. (2008) Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, 17: 5177-5188.
- Ahuja A, Bakshi SK, Sharma SK, Thappa RK, Agarwal SG, Kichlu SK, Paul R, Kaul MK. (2005) Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flavour and Fragrance Journal*, 20:403-406.
- Alcaraz-Melendez L, Delgado-Rodriguez J, Real-Cosio S. (2004) Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*, 75:696-701.
- ALFA (Associação Lusitana de Fitossociologia) (2007-2010) *Checklist* da Flora de Portugal (Continental, Açores e Madeira). Coordenação: M. Sequeira, D. Espírito-Santo, C. Aguiar, J. Capelo & J. Honrado. (http://www3.uma.pt/alfa/checklist_flora_pt.html) (acedido em 15/5/2011).
- Al-Ja'fari A-H, Vila R, Freixa B, Tomi F, Casanova J, Costa J, Cañigueral S. (2011) Composition and antifungal activity of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*. *Phytochemistry*, 72:1406-1413.
- Almeida J. (2005) Catálogo florístico das Serras Beira-Durienses. *Revista de Biologia*, 23:85-112.
- Almeida J. (2006) Adiciones corológicas a Flora Ibérica X: Umbelliferae. *Botánica Complutensis*, 30:147-151.
- Almeida J. (2009a) Flora e Vegetação das Serras Beiras-Durienses. *Tese de Doutoramento*. Universidade de Coimbra.

- Almeida J. (2009b) Flora of the Beira-Duriense mountains (Portugal). *Bocconeia*, 23:317-336.
- Almeida R, Gonçalves S, Romano A. (2005) *In vitro* micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boisson & Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodiversity and Conservation*, 14:1059-1069.
- Almeida J, Matos A, Tavares AC. (2007) Iberian Endemic Species in the 2007 *Index Seminum* of the Botanical Garden of Coimbra. IX Simpósio da Associação Ibero-Macaronésica de Jardins Botânicos. Coimbra, Portugal. Pp:100.
- Amado A, Gafeira C, Teixeira A, Bártoło P, Fonseca H, Morais L. (2007) *Relatório do Plano de Ordenamento da Reserva Natural das Berlengas*. Instituto da Conservação da Natureza. Lisboa.
- Amaral Franco J. (1974-2003). *Nova Flora de Portugal: Continente e Açores*. I-III, Lisboa.
- Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. (2006) Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4364-4370.
- Anwar J, Ali M, Hussain AI, Shadi M. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds of Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal*, 24:170-176.
- APA (Agência Portuguesa do Ambiente) (2007) Relatório do Estado do Ambiente. Agência Portuguesa do Ambiente, Lisboa.
- APA (Agência Portuguesa do Ambiente) (2008) Atlas do Ambiente. APA. (<http://www2.apambiente.pt/atlas/est/index.jsp>) (acedido em 01/12/2011).

Referências bibliográficas

- Arikat NA, Jawad Redha FM, Karam NS, Shibli RA. (2004) Micropropagated and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 100:193-202.
- Arnoldi L, Ballero M, Fuzzati N, Maxia A, Mercalli E, Pagni L. (2004) HPLC-DAD-MS identification of bioactive secondary metabolites from *Ferula commuis* roots. *Fitoterapia*, 75:342-354.
- Atia A, Barhoumi Z, Mokded R, Abdelly C, Smaoui A. (2011) Environmental eco-physiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 3564-3571.
- Avato P, Fortunato IM, Ruta C, D'Elia R. (2005) Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science*, 169:29-36.
- Ayoub N, Al-Azizi M, Konig WA, Kubeczka KH. (2006) Essential oils and a novel polyacetylene from *Eryngium yuccifolium* Michaux. (Apiaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 21:864-868.
- Ayoub N, Kubeczka KH, Nawwar MAM. (2003) An unique n-propyl sesquiterpene from *Eryngium creticum* L. (Apiaceae). *Pharmazie*, 58: 674-676.
- Bacchetta G, Bueno Sánchez A, Ueno Sánchez A, Fenu G, Jiménez-Alfaro B, Mattana E, Piotto B, Virevaire M (EDS.) (2008) *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias/La Caixa. 378 Pp.
- Bader A, Caponui C, Cioni PL, Flamini G, Morelli I. (2003) Acorenone in the essential oil of flowering aerial parts of *Seseli tortuosum* L. *Flavour and Fragrance Journal*. 18:57-58.
- Bajaj YPS. (1994) Somatic hybridization-a rich source of genetic variability. In: Bajaj Y. P. S. (EDS.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 27. Somatic hybridization in crop improvement I. Springer, Berlin, Pp. 3-32.

- Bajpai VK, Yoon JI, Kang SC. (2009) Antifungal potential of essential oil and various organic extracts of *Nandina domestica* Thunb. against skin infectious fungal pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83:1127-1133.
- Baker CM, Wetzstein HY. (1994) Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36:361–368.
- Bakkali FA, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils - a review. *Food Chemistry and Toxicology*, 46: 446-75.
- Bansod S, Rai M. (2008). Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences*, 3:81-88.
- Baranski R. (2008) Genetic transformation of carrot (*Daucus carota*) and other Apiaceae species. *Transgenic Plant Journal. Global Sciences Books*, 1-21.
- Barra A. (2009) Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Natural Products for Community*, 4:1147-54.
- Bathoju G, Giri A. (2012) Production of stigmasterol and hecogenin from in vitro cultures of *Chorophytum borivilianum*. *Journal of Pharmacognosy*, 3:101-103.
- Becwar MR, Noland TL, Wann SR. (1987) A method for quantification of the level of somatic embryogenesis among Norway spruce callus lines. *Plant Cell Reports*, 6:135-38.
- Bennett IJ, McComb JA, Tonkin CM, McDavid DAJ. (1994) Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. *Annals of Botany*, 74:53–58.
- Bennett MD, Leitch IJ. (2005) Genome size evolution in plants. – In: Gregory T. (ed.), *The evolution of the genome*. Elsevier Academic Press, Amsterdam. Pp. 89-162.
- Benson EE. (1999) Cryopreservation. In: Benson, E.E. (ED.) *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor and Francis, Ltd, London.

Referências bibliográficas

- Berenbaum MR. (2001) Chemical Mediation of Coevolution: Phylogenetic Evidence for Apiaceae and Associates. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88:45-59.
- Bergmann J, Pompe S, Ohlemüller R, reiberg M, Klotz S, IKühn I. (2010) The Iberian Peninsula as a potential source for the plant species pool in Germany under projected climate change. *Plant Ecology*, 207:191-201.
- BGCI (*Botanic Garden Conservation International*) (www.bgci.org/plant_search.php) (acedido em 10/3/2010).
- BGCI (*Botanic Garden Conservation International*) (2003) Global Strategy for Plant Conservation Botanic Gardens Conservation International.
- Bilz M, Kell SP, Maxted N, Lansdown RV. (2011) European Red List of Vascular Plants. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Bodhipadma K, Leung DWM. (2003) *In vitro* fruiting and seed set of *Capsicum annuum* L. cv. Sweet banana. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39:536-539.
- Botanic Gardens Conservation International (BGCI) (2000) In: Cheney J, Navarro JN, Wyse Jackson (Eds) *Action plan for botanic gardens in the European Union*. National Botanic Gardens of Belgium, Meise.
- Bradeen JM, Bach IC, Briard M, Le Clerc V, Grzebelus D, Senalik DA, Simon PW. (2002) Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and wild *Daucus* populations reveals a genetically nonstructured composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127:383-391.
- Brehm JM, Kell S, Maxted N, Ford-Lloyd BV, Martins-Loução MA. (2011) CWR prioritization at national level: case studies and lessons learnt. Joint PGR Secure/ECPGR workshop: Conservation strategies for European CWR and LR diversity. 7–9 September 2011, Palanga, Lithuania.

- Brito G, Lopes T, Loureiro J, Rodriguez E, Santos C. (2010) Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. *Trees Structure and Function*, 24:723-732.
- Brito G, Santos C. (2009) Basal medium improvement for routine micropropagation of *Olea maderensis*: physiological comparative studies. *Canadian Journal of Forest Research*, 39:814-822.
- Brown DCW, Finstad KI, Watson EM. (1995) Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In: Thorpe T. A. (ED.). *In vitro embryogenesis in plants, vol. 1*. Kluwer, Dordrecht. Pp. 345-415.
- Burt SA. (2007) Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food. *Ph.D. thesis*. Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Veterinary Public Health. Utrecht University. The Netherlands.
- Bylebyl K, Poschlod P, Reisch C. (2008) Genetic variation of *Eryngium campestre* L. (Apiaceae) in Central Europe. *Molecular Ecology*, 17: 3379-3388.
- Calviño C, Martínez S, Downie S. (2008) The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 1129-1150.
- Calviño C, Martínez S, Downie S. (2010) Unraveling the taxonomic complexity of *Eryngium* L. (Apiaceae, Saniculoideae): Phylogenetic analysis of 11 non-coding cpDNA loci corroborates rapid radiations. *Plant Diversity and Evolution*, 128:137-149.
- Canhoto JM, Cruz GS. (1994) Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae) by manipulation of culture media composition. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 30:21-25.
- Canhoto JM, Lopes ML, Cruz GS. (2005) Protocol of somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn). In: S.M. Jain et al. (EDs), *Protocols for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer, Dordrecht. Pp. 379-389.

Referências bibliográficas

- Canhoto JM. (2010) *Biotecnologia Vegetal. Da clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Capetanos C, Saroglou V, Marin PD, Simi A, Skalsai HD. (2007) Essential oil analysis of two endemic *Eryngium* species from Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72: 961-965.
- Carretero Accame ME, Gómez-Serranillos C, Hernández-Agero MP, Palomino MT, Ruiz-Poveda OM. (2011) Ethnomedicinal Plants -revitalizing of traditional knowledge of herbs. *Chapter 13 - Medicinal plants used in folk medicine for digestive diseases in central Spain*. Edit. M. Rai, D. Achava and J.L Rios. Pp: 361-387.
- Casado JP, Navarro MC, Utrilla MP, Martínez A, Jiménez J. (2002) Micropropagation of *Santolina canescens* Lagasca and *in vitro* volatiles production by shoot explants. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, 69:147-153.
- Castroviejo S, Laínz M, López González G, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L. (2003) *Flora Ibérica, Plantas vasculares de la Península Ibérica, e Islas Baleares, vol. X, Araliaceae-Umbelliferae*. Eds. Real Jardín Botánico, C.S.I.C. Madrid.
- Cavaleiro C. (2001) Óleos essenciais de *Juniperus* de Portugal. *Tese de doutoramento*. Universidade de Coimbra, Portugal.
- Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Serra D, Santoro G, Tomi F, Bighelli A, Salgueiro L, Casanova J. (2011) Composition of a volatile extract of *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* (M. Laínz) M. Laínz, signalised by the antifungal activity. *Journal of Pharmacology and Biomedics Annals*, 54: 619-22.
- Cavaleiro C, Pinto E, Gonçalves MJ, Salgueiro L. (2006) Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 100:1333-1338.
- CBD (1992) Convention on Biological Diversity. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, Quebec, Canada.

- CBD (2002) Global Strategy for Plant Conservation. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, Quebec, Canada.
- Chandrika R, Vyshalip P, Saraswathi KJ, Kaliwal B. (2011) Rapid multiplication of mature flowering of *Eryngium foetidum* L. by *in vitro* technique. *International Journal of Biotechnology Applications*, 3:114-117.
- Chao W-W, BI-Fong Lin B-F. (2011) Bioactivities of major constituents isolated from *Angelica sinensis* (Danggui). *Chinese Medicine*, 6:29.
- Chaturvedi MK, Razdan S, Bhojwani SS. (2004) *In vitro* morphogenesis in zygotic embryo cultures of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Plant Cell Reports*, 22:801-809.
- Chawla HS. (2002) *Introduction to plant biotechnology*. 2nd Ed. Science, Enfield.
- Chen SW, Min L, Li WJ, Kong WX, Li JF, Zhang YJ. (2004) The effects of angelica oils in three murine tests of anxiety. *Pharmacology and Biochemical Behaviour*., 79:377-382.
- CI, 2012 (Conservação Internacional) Identificação dos reservatórios de plantas e animais e dos *hotspots* do planeta. (<http://www.conservation.org.br/>; <http://www.biodiversityhotspots.org/xp>) (acedido em 15/3/2012).
- CIB, 2010 (*Cork Information Bureau*.) Cortiça-importância ambiental. (<http://www.apcor.pt/>) (acedido em 6/1/2012).
- Clemente A, Cotrim H, Brehm J, Dis S, Costa C, Martins-Loução MA. (2012) As colecções da flora portuguesa ameaçada no banco de germaplama do Jardim Botânico do MHN da Universidade de Lisboa. *El/O Botânico*, 6: 18-19.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2008a) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. Approved standard document. M27- A3. Wayne, USA.
- CLSI (2008b) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*; third informational supplement M27-S3. Wayne, USA.

Referências bibliográficas

- CLSI (2008c) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*; Approved standard document M38-A. Wayne, PA, USA.
- Conselho da Europa (1977) List of Rare, Threatened and Endemic Plants in Europe. Nature and Environment, nº 14. Strasbourg.
- Conselho da Europa (1983) List of Rare, Threatened and Endemic Plants in Europe. Nature and Environment, nº 27. Strasbourg.
- Constance L. (1971) History of the classification of Umbelliferae (Apiaceae). In: V.H. Heywood (Ed.), *The biology and chemistry of the Umbelliferae*, Pp. 1–8. Academic Press, London, UK.
- Cordeiro J, Rodrigues WA. (2007) Caracterização Fitossociológica em um remanescente de Floresta Ombrofila Mista em Guarapuava. PR. *Revista Árvore*, 31:545-554.
- Corsi G, Biasci D. (1998) Secretory Structures and Localization of Alkaloids in *Conium maculatum* L. (Apiaceae). *Annals of Botany*, 81:157-162.
- Corvelo DAF. (2010) Estatuto de Conservação das Plantas Vasculares Endêmicas dos Açores segundo os critérios da IUCN. *Dissertação de mestrado*. Universidade dos Açores. repositorio.uac.pt/bitstream/10400.3/460/1/DissertMestradoRodolfoAFCorvelo (acedido em 15/5/2011).
- Council of Europe (1997) *European Pharmacopoeia*, 3rd edn. Strasbourg: Council of Europe.
- Cox PA. (1990) Ethnopharmacology and the search for new drugs. *Ciba Found Symposium*, 154:40-47.
- Crespi A, Santos R, Cabral I, Silva A. (2012) O jardim botânico da UTAD e a conservação e divulgação da flora portuguesa. *El/O Botânico*, 6:32-33.
- Cruz GS, Canhoto JM, Abreu MA. (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Science*, 66:263-270.

- Daffalla HH, Abdellatef E, Elhadi EA, Khalafalla MM. (2011) Effect of Growth Regulators on *In Vitro* Morphogenic Response of *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Poir. Using Mature Zygotic Embryos Explants. *Biotechnology Research International*. Volume 2011 (1-8), Article ID 710758. Academic Editor: Maxim Golovkin.
- Daily GC, Polasky S, Goldstein J, Kareiva PM, Mooney HA, Pejchar L, Ricketts TH, Salzman J & Shallenberger R. (2009) Ecosystem services in decision making: time to deliver. *Ecology and Environment*, 7:21-28.
- Darlington CD, La Cour LF. (1976) *The Handling of Chromosomes*, 6th Ed., George Allen & Unwin Ltd, London.
- Darriet F, Bendahou M, Desjobert JM, Costa J, Muselli A. (2012) Bicyclo (4.4.0)decane oxygenated sesquiterpenes from *Eryngium maritimum* essential oil. *Planta Medica*, 78:386-389.
- Davies NW. (1990) Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography*, 503:1-24.
- Davis M, Shaw RG. (2001) Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. *Science*, 292:673-679.
- Delgado FMG. (2010) Conservação e valorização de *Asphodelus bento-rainhae* P.Silva e *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas -Martínez da Beira Interior. *Doutoramento em Engenharia Agronómica*. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Delgado LF. (2006) Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. *Mestrado em Biodiversidade e Meio Ambiente*. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, Brasil.

Referências bibliográficas

- Demirci B, Kosar M, Demirci F, Dinc M, Baser KHC. (2007) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. Et Kotschy. *Food Chemistry*, 105:1512-1517.
- Denchev PD, Kuklin AI, Atanassov AI, Scragg AH. (1993) Kinetic studies of embryo development and nutrient utilization in an alfalfa direct somatic embryogenic system. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 33:67-73.
- Denizot F, Lang R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunology Methods*, 89:217-277.
- Desfontaine (1798) *Flora Atlantica*, 1:241.
- Di Pasqua R, De Feo F, Villani F, Mauriello G. (2005) In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against food borne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*, 55:139-143.
- Díaz S, Fargione J, Chapin FS III, Tilman D. (2006) Biodiversity Loss Threatens Human Well-Being. *PLoS Biology*, 4:277.
- Dijoux N, Guingand Y, Bourgeois C, Durand S, Fromageot C, Combe C, Ferret PJ. (2006) Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicology In Vitro*, 20:480-489.
- Dioscorides, De Materia Medica. *Codex Neapolitanus Graecus 1 of the National Library of Naples*. pp. 215, Militos Press, Athens.
- Diretiva Habitats (1992) Ministério do Ambiente - Decreto-Lei 92/43/CEE do Conselho de 21 de Maio de 1992- relativa à preservação dos habitats naturais e da fauna e da flora selvagens.
- Diretiva Habitats (1999) Ministério do Ambiente - Decreto-Lei n.º 140/99 de 24 de Abril – normas de conservação; tipologia de habitats.

- Diretiva Habitats (2005) Ministério do Ambiente e do ordenamento do Território - Decreto-Lei nº 49/2005 de 24 de Fevereiro – âmbito da Rede Natura e zonas de proteção especial (ZPE).
- Divakaran M, Babu KN. (2009) Micropropagation and In Vitro Conservation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Methods in Molecular Biology*, 547:129-138.
- Dobson AP. (1998) *Conservation and biodiversity*. Scientific American Library, New York.
- Dogan E, Duman H, Tosun A, Kurkcuoglu M, Base KHC. (2006) Essential Oil Composition of the Fruits of *Seseli resinosum* Freyn et Sint. and *Seseli tortuosum* L. Growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 18:57-59.
- Dolezel J, Greilhuer J, Suda J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2:2233-2244.
- Dolezel J, Sgorbati S, Lucretti S. (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 625-631.
- Dominguez, XA. (1973) *Metodos de Investigacion Fitoquimica*. Editorial Limusa.
- Domingos T, Valada TR, Teixeira RF, Rodrigues O, Aguiar C, Belo C. (2009) Ecossistemas e Bem-estar Humano: Avaliação para Portugal do *Millennium Ecosystem Assessment*. Editora Escolar.
- Draper D, Martins-Loução MA, Iriondo JM. (2004) Ecogeographical-survey based germplasm collection: Towards a national strategy of seed collecting for *ex situ* conservation in Portugal. 2nd World Botanic Gardens Congress. Barcelona. (<http://www.bcn.es/medciencies/botanicgardens2004/abstracts/>) (acedido em 3/4/2010).
- Ebrahimie E, Habashi AA, Mohammadie-Dehcheshmeh M, Ghannadha M, Ghareyazie B, Yazdi-Amadi. (2006) Direct shoot regeneration from mature embryo as a rapid and

- genotype-independent pathway in tissue culture of heterogeneous diverse sets of cumin (*Cuminum cyminum* L.) genotypes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42:455-460.
- Ebrahimie E, M. R. Naghavi MR, Hosseinzadeh A. (2007) Induction and comparison of different *in vitro* morphogenesis pathways using embryo of cumin (*Cuminum cyminum* L.) as a model material. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(3):293-311.
- Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L (Eds) (2004) *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA. Argentina.
- Edris AE. (2007) Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21:308-23.
- Eeva M, Ojala T, Tammela P, Galambosi B, Vuorela H, Hiltunen R, Fagerstedt K, Vuorela P. (2003) Propagation of *Angelica archangelica* Plants in an Air-Sparged Bioreactor from a Novel Embryogenic Cell Line, and their Production of Coumarins. *Biologia Plantarum*, 46:343-347.
- Eftekhari F, Yousefzadi M, Borhani K. (2004) Antibacterial activity of the essential oil from *Ferula gummosa* seed. *Fitoterapia*, 75:758-759.
- Ekiert H. (2000) Medicinal plant biotechnology: Apiaceae family as example of rapid development. *Pharmazie*, 55:561-567.
- El Amine DM, Djabou N, Desjobert J, Allali H, Tabti B, Museli A, Costa J. (2010) Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation. *Chemical Journal*, 4:16.
- Elless MP, Blaylock MJ, Huang JW, Gussman CD. (2000) Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements. *Food Chemistry*, 71:181-188.

- Ellis RH, Roberts EH. (1980) Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45:13-30.
- Engelmann F. (1999) *In vitro* conservation of horticultural genetic resources: review of the state of the art. *Acta Horticulturae*, 495:245-250.
- Engelmann F. (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40:427-433.
- Engels JMM. (2003) Plant genetic resources management and conservation strategies: problems and progress. *Acta Horticulturae*, 623:179-191.
- ENSCONET (2009a) Curation Protocols & Recommendations. Royal Botanic Gardens, Kew (Eds.).
- ENSCONET (2009b) Seed Collecting Manual for Wild Species. Royal Botanic Gardens, Kew (Eds.).
- Erdurak CS, Coskun M, Demirci B, Baser KHC. (2006) Composition of the essential oil of fruits and roots of *Ferulago isaurica* Pesmen and *F. syriaca* Boiss. (Umbelliferae) from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 21:118-121.
- Espinel-Ingroff A, Canton E, Peman J. (2009) Updates in antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Current Fungal Infection Reports*, 3:133-141.
- Euro-Med PlantBase (2006–2011) The information resource for Euro-Mediterranean Plant Diversity. (<http://www.emplantbase.org/home.html>) (acedido em 15/3/2011).
- European red list of vascular plants. (<http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/RL-4-016>) (acedido em 15/3/2011).
- Fabian D, Sabol M, Domaracká K, Bujnáková D. (2006) Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology In Vitro*, 20:1435-1445.

Referências bibliográficas

- Fabio A, Cermelli C, Fábio G, Nicoletti P, Quaglio P. (2007) Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytotherapy Research*, 21:374-377.
- FAO/IPGRI (1994) Genebank standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. (1985) Medicinal plants in therapy. *Bulletin WHO*, 63: 965-981.
- Fay, M.F. (2003) Using genetic data to help guide decisions about sampling. In Smith R.D., Dickie J.B., Linington S.H., Pritchard H.W., Probert R.J. (Eds.), *Seed Conservation: turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 89-96.
- Feliner N. (2003) *Eryngium* L. In: Nieto Feliner, G., S. L. Jury & A. Herrero (eds.), *Flora Ibérica* 10: 36-60. CSIC, Madrid.
- Fernandes R. (1952) Notas sobre Flora de Portugal III. *Boletim da Sociedade. Broteriana*, 18:21.
- Ferrari B, Tomi F, Casanova J. (2005) Composition and chemical variability of *Ferula communis* essential oil from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 20:180-185.
- Ferri E, Giordani G, Padula E, Bellini E (2008) Viability and *in vitro* germinability of pollen grains of olive cultivars and advanced selections obtained in Italy. *Advance Horticultural Science*, 22:116-122.
- Fidelis A, Gerhard A, Overbeck A, DePatta VP, Pfadenhauer J. (2008) Effects of disturbance on population biology of the rosette species *Eryngium horridum* Malme in grasslands in southern Brazil. *Plant Ecology*, 195:55-67.
- Figueiredo AC, Barroso J, Pedro L, Salgueiro L, Miguel MG, Faleiro ML, (2008) Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. *Current Pharmaceutical Design*, 14:3120-3140.

- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC (2008) Factors affecting secondary metabolites production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23:213-226.
- Fischlin A, Midgely GF, Price J, Leemans R, Gopal B, Turley C, Rounsevell M, Dube O, Tarazona J, Velichko A. (2007) *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, chapter Ecosystems, their properties, goods and services, pages 211–272. Cambridge University Press, Cambridge.
- Franklihn G, Oliveira AL, Dias ACP. (2011) *In vitro* flowering and viable seed setting of transgenic lettuce. *Plant Biotechnology*, 28:63-68.
- Frese L, Nothangel T. (2008) *Daucus* species promise a glossy future in carrot production. *Crop wild relative*, 6:4-6.
- Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Products*, 65:1545-1560.
- Furnari G, Guglielmo A, Longhitano N, Pavone P, Salmeri C, Fabrizio Scelsi (2012) *Tabla de Botánica Sistemática*. Universidad de Catania. Departamento de Botánica. Centro Universitario para la Tutela y la Gestión del Ambiente y del Agro-Ecosistema. (http://www.dipbot.unict.it/sistematica_es/Apiaceae_fam.html) (accedida em 15/2/2012).
- Garcia EC, Solis CH. (2007) *Manual de Fitoterapia*. Elsevier Masson. Barcelona, Espanha.
- Garozzo A, Timpanaro R, Bisignano B, Furneri PM, Bisignano G, Castro A. (2009) *In vitro* antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential Oil. *Letters in Applied Microbiology*, 1-3.

Referências bibliográficas

- Gaudeul M, Naciri-Graven Y, Gauthier P, Pompanon F. (2002) Isolation and characterization of microsatellites in a perennial Apiaceae, *Erygium alpinum* L. *Molecular Ecology*, 2:107.
- Geneve RL, Kester ST, Pomper KW. (2007) Cytokinin habituation for autonomous shoot initiation in pawpaw. *Acta Horticulturae*, 738:371-374.
- George EF, Debergh PC. (2008) Micropropagation: uses and methods. In: George E. F.; Hall M. A.; De Klerk G.-J. (EDS) *Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed. Springer, Dordrecht. Pp. 29-64.
- Giancarlo S, Rosa LM, Nadjafi F, Francesco M. (2006) Hypoglycaemic activity of two spices extracts: *Rhus coriaria* L. and *Bunium persicum* Boiss. *Natural Products Research*, 20:882-886.
- Gimenez E, Melendo M, Valle F, Gómez-Mercado F, Cano E. (2004) Endemic flora biodiversity in the south of the Iberian Peninsula: altitudinal distribution, life forms and dispersal modes. *Biodiversity and Conservation*, 13:2641-2660.
- Glauert AM, Lewis PR. (1998) *Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy - Practical Methods in Electron Microscopy*. Vol 17. Publi. Portland Press. Pp. 344.
- Gomes F, Canhoto JM. (2009) Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45:72-82.
- Gomez-Campo y colaboradores (EDS.) (1987) *Libro Rojo de especies vegetales amenazadas de España Peninsular e islas Baleares*. Edit. Icona. Publicaciones del Ministerio de agricultura, Pesca Y Alimentacion. Instituto Nacional para a Conservacion de la Naturaleza. Madrid.
- Gonçalves MJ, Cruz MT, Tavares AC, Cavaleiro C, Lopes M., Canhoto JM, Salgueiro L (2012a) Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Industrial Crops and Products*, 35: 166-171.

- Gonçalves MJ, Tavares, AC, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes, MC, Canhoto JM, Salgueiro L (2012b) Composition, antifungal activity and cytotoxicity of of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lainz from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 39:204-209.
- Gonçalves S, Romano A. (2005) Micropropagation of *Drosophyllum lusitanicum* (Dewy pine), an endangered West Mediterranean endemic insectivorous plant. *Biodiversity and Conservation*, 14:1071-1081.
- Gonny M, Bradesi P, Casanova J. (2004) Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal*, 19:424-433.
- Góra J, Lis A, Kula J, Staniszevska M, Woloszyn A, (2002) Chemical composition variability of essential oils in the ontogenesis of some plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 17:445-451.
- Goyal M, Sasmal D, Nagori BP. (2011) Review on medicinal plants used by local community of jodhpur district of Thar Dese. *International Journal of Pharmacology*, 7: 333-339.
- Grande M, Segura M, Mancheño B. (1986) New Kaurane Diterpenoids from the Roots of *Elaeoselinum tenuifolium*. *Journal of Natural Products*, 49:259-264.
- Grande M, Mancheño B, Sanchez MJ. (1991a) Elasclepiol and other tetracyclic diterpenoids from *Elaeoselinum tenuifolium*. *Phytochemistry*, 30:1977-1982.
- Grande, M Mancheño B, Sanchez MJ. (1991b) New kaurane diterpenoids from the aerial parts of *Distichoselinum tenuifolium*. *Journal of Natural Products*, 54:866-869.
- Graudal L, Thomson L, Kjaer E. (2001) Selection and management of *in situ* gene conservation areas for target species. In: FAO, DFS, IPGRI (ed) Forest genetic resources conservation and management, vol 2. In managed natural forests and protected áreas (in situ). International Plant Genetic Resources Institute, Rome. Pp. 5-12.

Referências bibliográficas

- Grewal S. (1996) Microtubers from somatic embryos of *Bunium persicum*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 34:813-815.
- Guan H, De Klerk G-J. (2000) Stem segments of apple microcuttings take up auxin predominantly via the cut surface and not via the epidermal surface. *Scientia Horticulturae*, 86:23-32.
- Gurib-Fakim A. (2006) Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medecine*, 27:164-7.
- Gutiérrez L, Escudero A, Battle R, Nerín C. (2009) Effect of mixed antimicrobial agents and flavors in active packaging films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 8564-71.
- Habibi Z, Salehi P, Yousefi M, Hejazi Y, Laleh A, Mozaffarian V, Masoudi S, Rustaiyan A. (2006) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Ferula latisecta* and *Mozzaffariania insignis* from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 42:689-92.
- Hall JL. (1978) *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. Elsevier. New York.
- Handro W, Floh EIS. (2001) Neo-formation of flower buds and other morphogenetic responses in tissue cultures of *Melia azedarach*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 64:73-76.
- Harborne J. (1990) Role of secondary metabolites in chemical defence mechanism in plants. *Ciba Found Symposium*, 154:126-39.
- Hassawi DS, Abu-Mallouh SA, Al-Abadi AA, Shatnawi MA. (2012) Organelles genome stability of wheat plantlets produced by anther culture. *African Journal of Biotechnology*, 11:6018-6026.

- Hawkes JG, Maxted N, Ford-Lloyd BV. (2000) *The ex situ conservation of plant genetic resources*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Hawkins B, Sharrock S, Havens K. (2008) *Plants and climate changes: which future?* Published by Botanic Gardens Conservation International, Richmond, UK.
- Hayes AJ, Markovic B. (2002) Toxicity of Australian essential oil *Backhousia Citriodora* (Lemon Myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food Chemical Toxicology*, 40:535-543.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi A, Doble M. (2008) Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15: 639-52.
- Hernandez T, Canales M, Teran B, Avila O, Duran A, Garcia AM, Hernandez H, Angeles-Lopez O, Fernandez-Araiza M, Avila G. (2007) Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 111:137-141.
- Heyder U. (2010) Ecosystem integrity change as measured by biome change. World development report. Potsdam Institute for Climate Impact Research (PIK), Germany.
- Heywood VH, Dullo ME. (2005) *In Situ Conservation of Wild Plants a Critical Global Review of Good Practices*. FAO, IPGRI.
- Heywood VH. (1971) *Biology and Chemistry of the Umbelliferae*. Academic Press, London.
- Honrado J. (2003) Flora e vegetação do Parque Nacional da Peneda-Gerês. *Tese de Doutoramento*. Universidade do Porto.
- Huang X-L, Yang B, Hu C-G, Yao J-L. (2011) *In vitro* induction of inflorescence in *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99:209-215.
- Humeirah AGS, Azah MAN, Mastura M, Mailina J, Saiful A, Muhajir H, Puad AM. (2010) Chemical constituents and antimicrobial activity of *Goniothalamus*

Referências bibliográficas

macrophyllus (Annonaceae) from Pasoh Forest Reserve, Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 9:5511-5515.

Hussain SS, Rao AQ, Husnain T, Riazuddin S. (2009) Cotton somatic embryo morphology affects its conversion to plant. *Biologia Plantarum*, 53:307-311.

IA (Instituto do Ambiente) (2005) Relatório do Estado do Ambiente 2003, Portugal, Instituto do Ambiente, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, Amadora.

ICN (Instituto de Conservação da Natureza) (1996) Lista Nacional de Sítios- Continente. Diretiva Habitats (92/43/CEE). Proposta preliminar. Instituto da Conservação da Natureza, Direcção de Serviços da Conservação da Natureza, Lisboa.

ICN (2006a) Plano Sectorial da Rede Natura 2000. Sítios da Lista Nacional. Instituto da Conservação da Natureza, Direcção de Serviços da Conservação da Natureza, Lisboa.

ICN (2006b) Plano Sectorial da Rede Natura 2000. Flora. Instituto da Conservação da Natureza, Direcção de Serviços da Conservação da Natureza, Lisboa.

ICN (2007) Plano Nacional de Conservação Flora em Perigo (1ª fase). Relatório final do projeto Life-Natureza. IIP/8480. ICN, Lisboa.

ICNB (2007a) (Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade). Parques Naturais (<http://portal.icnb.pt/ICNPortal/vPT2007>) (acedido em 25/10/2007).

ICNB (2007b) (Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade). Rede Natura 2000. (<http://www.icnf.pt/ICNPortal/vPT2007/O+ICNB/Rede+Natura+2000+2010/>) (acedido em 25/10/2007).

Ignacimuthu S, Arockiasamy S, Antonysamy M, Ravichandran P. (1999) Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56:131-137.

- Imani J, Tran Thi L, Langen G, Arnholdt-Schmitt B, Roy S, Lein C, Kumar A, Neumann K-H. (2001) Somatic embryogenesis and DNA organization of genomes from selected *Daucus* species. *Plant Cell Reports*, 20:537-541.
- Index Seminum* do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. (http://www.uc.pt/jardimbotanico/index_seminum) (acedido de 2004 a 2012).
- Infarmed (2005) *Farmacopeia Portuguesa VIII* (8ª Ed). Lisboa.
- Iorizzo M, Senalik DA, Grzebelus D, Bowman M, Cavagnaro PF, Matvienko M, Ashrafi H, Allen Van Deynze AV, Simon PH (2011) *De novo* assembly and characterization of the carrot transcriptome reveals novel genes, new markers, and genetic diversity. *BMC Genomics*, 12:389.
- Iovene M, Grzebelus E, Carputo D, Jiang J, Simon PW. (2008) Major cytogenetics landmarks and karyotype analysis in *Daucus carota*. *American Journal of Botany*, 95:793-804.
- IPNI (International Plant Names Index) (2012) (<http://www.ipni.org/index.html>) (acedido de 2004 a 2011).
- Iranshahi M. (2006) Sulphur-containing compounds in the essential oil of the root of *Ferula persica* Willd. var. *persica*. *Flavour and Fragrance Journal*, 21:260-261.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature) (2001) Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org (acedido em 29/2/2007).
- IUCN (2011) Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas. Versão 2011. (<http://www.iucnredlist.org>) (acedido em 2/2/2012).
- Jager AK, Schottlinder B, Smitt UW, Nyman UF. (1993) Somatic embryogenesis in cell cultures of *Thapsia garganica*. Correlation between the state of differentiation and the content of thapsigargin. *Plant Cell Reports*, 12:517-520.

Referências bibliográficas

- Jager C, Symons GM, Glancy NE, Reid JB, Ross JJ. (2007) Evidence that the mature leaves contribute auxin to the immature tissues of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 226:361-368.
- Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (2000) *Somatic Embryogenesis* in Woody Plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Jahier J, Chevre AM, Delourme R, Eber F, Tanguy AM. (1992) *Techniques de cytogénétique végétale*. Paris: INRA.
- Jana S, Shekhawat GS. (2011) Plant growth regulators, adenine sulfate and carbohydrates regulate organogenesis and in vitro flowering of *Anethum graveolens*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33:305-311.
- Janowska B, Schroeter-Zakrzewska A, Rybus-Zajac M. (2009) Effect of benzyladenine and gibberelic acid on the growth and flowering of *Anemone coronaria* L. 'Sylphide', *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 12:8.
- Jansen J. (1998) Übersicht Der Silikatschutt vegetation in Den Hoheren Stufen der Serra da Estrela, Portugal. *Ber. D. Reinh. Tuxen-Ges.*, 10:95-124.
- Jansen J, van der Knapp WO, Paiva J. (2000) A short note on plant *taxa* from the Serra da Estrela new to Portugal. *Silva Lusitana*, 7:287-289.
- Jaramillo S, Baena M. (2002) *Ex situ conservation of plant genetic resources: training module*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Jardim Botânico de Coimbra da Universidade de Coimbra. (<http://www.uc.pt/jardimbotanico>) (acedido em 22/4/2012).
- Jarvis DI, Myer L, Klemick H, Guarino L, Smale M, Brown ADH, Sadiki M, Sthapit B, Hodgkin TA (2000) *A training guide for in situ conservation on-farm*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

- Javidnia K, et al. (2006) Constituents of the volatile oil of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 18:548-550.
- Jiménez VM. (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulators*, 47:91-110.
- Jones B, Gunnera SA, Petersson SV, Tarkowski P, Graham N, May S, Dolezal K, Sandberg G, Ljungb K. (2010) Cytokinin Regulation of Auxin Synthesis in *Arabidopsis* Involves a Homeostatic Feedback Loop Regulated via Auxin and Cytokinin Signal Transduction. *Plant Cell*, 22: 2956-2969.
- Joulain D, König WA. (1998) *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*. Hamburg: E. B. Verlag.
- Just JB, Santos CAF, Fonseca MEN, Boiteux LS, Oloizia BB, Simon PW (2007) Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 114:693-704.
- Kalemba D, Thiem B. (2004) Constituents of the essential oils of four micropropagated *Solidago* species. *Flavour and Fragrance Journal*, 19:40-43.
- Kareiva P, Marvier M. (2007) Conservation for the people. *Scientific America*, 297:50-57.
- Karuppusamy S, Aruna V, Kiranmai C, Pullaiah T. (2007) *In vitro* propagation of Endemic umbeliferae *Hydrocotyl conferta*. *Indian Journal*, 541-544.
- Katiki LM, Chagas ACH, Bizzo HR, Ferreira JFS, Amarante AFT. (2011) Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. *Veterinary Parasitology*, 183:103-108.
- Kauderer B, Zamith H, Paumgarten FJ, Speit G. (1991) Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells *in vitro*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18:28-34.

Referências bibliográficas

- Kaya A, Demirci B, Baser KHC. (2003) The essential oil of *Seseli tortuosum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 18:159-161.
- Kaya A, Demirci B, Baser KHC. (2010) Composition of the essential oil of *Seseli campestre* Besser. growing in the Northwest Anatolia. *Turkish Journal of Pharmacological Science*, 7:161-166.
- Kell S, Maxted N. (2011) Developing a European crop wild relative conservation strategy, University of Birmingham, UK. Palanga, Lithuania, 7–9 September 2011.
- Kho YO, Ba JR. (1968) Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica*, 17:298-302.
- Khoshbakht K, Hammer K, Pistrick K. (2007) *Eryngium caucasicum* Trautv. cultivated as a vegetable in the Elburz Mountains (Northern Iran). *Genetic Resources Crop Evolution*, 54:445-448.
- Kielkowska A, Adamus A. (2010) *In vitro* culture of unfertilized ovules in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 102:309-319.
- Kikuchi, A (2006) Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta*, 223:637-645.
- Kilibarda V, Nanusevic N, Dogovic N, Ivanic R, Savin K. (1996) Content of the essential oils of the carrot and its antibacterial activity. *Pharmazie*, 51:777-778.
- Kjær E, Amaral W, Yanchuk A, Graudal L. (2004) Strategies for conservation of forest genetic resources. In: FAO, DFS, IPGRI (ed) *Forest genetic resources conservation and management, vol 1. Overview, concepts and some systematic approaches*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome. Pp 5-24.
- Koonneef M, Alono-Blanco C, Peeters AJM, Soope W. (1998) Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49:345-370.

- Kosalec I, Pepeljnjak S, Kustrak D. (2005) Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharmaceutica*, 55:377-385.
- Krens FA, Keizer LCP, Capel IEM. (1997) Transgenic caraway, *Carum carvi* L.: a model species for metabolic engineering. *Plant Cell Reports*, 17:39-43.
- Kristensen M. et al (2005). Micropropagation of Bois papaye, *Badula balfourniana*; a critically endangered plant, endemic to Rodrigues, Mascarenhas Islands, western Indian Ocean. *Botanical Garden Conservation International Journal*, 2:25-26.
- Kula J, Tosun A, Yesilada E. (2006) Chemical composition of carrot umbels oils from *Daucus carota* susp. *sativus* cultivated in Poland. *Flavour and Fragrance Journal*, 21:667-669.
- Küpeli E, Tosun A, Yesilada E. (2006) Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Seseli* L. species (Apiaceae) growing in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 104:310-314.
- Kutchan T. (2001) Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*, 125:58-60.
- Kylin M . (2010) *Angelica archangelica* L. BSc in Horticulture programme. Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten, SLU Alnarp. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Lahlou M. (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 1:435-448.
- Laín CS. (1981) Research on *Daucus* L. (Umbelliferae). *Actas III Congr. ÓPTIMA. Anales Jardin Botanic de Madrid*, 37:481-534.
- Laínz M. (1966) Aportaciones al conocimiento de la flora gallega IV, *Anales del Instituto Nacional de Investigación Florestal*, 10:299-332.
- Laínz M. (1967) Aportaciones al conocimiento de la flora gallega V, *Anales del Instituto Nacional de Investigación Florestal*, 34:1-51.

Referências bibliográficas

- Lainz M. (1969) Floram Europaeam animadversiones, *Candollea*, 24:253-262.
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation. A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60:197-214.
- Lawrence BM. (1995a) *The isolation of aromatic materials from natural plant products*. In S.K.T., *A manual on the essential oil industry*. Viena, Áustria: United Nations Industrial Developmental Organization.
- Lawrence BM. (1995b) Progress in essential oils. *Perfumer and Flavorist*, 20:47-54.
- Lee SH, Cho H-T. (2006) PINOID Positively Regulates Auxin Efflux in Arabidopsis Root Hair Cells and Tobacco Cells. *The Plant Cell*, 18:1604-1616.
- Leong-Skornickova J, Sida O, Jarolimova V, Sabu M, Fer T, Travnicek P, Suda J. (2007) Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae). *Annals of Botany*, 100:505-526.
- Leva AR, Petruccelli R. (2012) Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. *Biologia Plantarum*, 56:373-376.
- Liao Z, Chen M, Sun X, Tang K. (2008) *Micropropagation of Endangered Plant Species*. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F, eds. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 318. Plant Cell Culture Protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc. Pp. 179-185.
- Lin C-C. (1987) Histological observations on *in vitro* formation of protocorm-like bodies from a talk internodes of *Phalanopsis*. *Lindleyana*, 2:58-65.
- Lin CS, Chen CT, Hsiao WW, Chang WC. (2005) Effects of growth regulators on direct flowering of isolated ginseng buds in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 83:241-244.

- Lin CS, Kalpana K, Chang WC, Lin NA. (2007) Improving Multiple Shoot Proliferation in Bamboo Mosaic Virus-free *Bambusa oldhamii* Munro Propagation by Liquid Culture. *Hortscience*, 42:1243-1246.
- Liu CM, Xu ZH, Chua NH. (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5:621-630.
- Lobo JM, Castro I, Moreno JC. (2001) Spatial and environmental determinants of vascular plant species richness distribution in the Iberian Peninsula and Balearic Islands. *Biological Journal of the Linnean Society*, 73:233-253.
- Lopes MCR (2001) A Flora e Vegetação das Terras de Sicó. *Tese de Doutoramento*. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- Loureiro J, Pinto G, Lopes T, Dolez J, Santos C. (2005) Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta*, 221:815-822.
- Loureiro J, Kopecky D, Castro S, Santos C, Silveira P. (2007a) Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Peninsula Festuca spp. *Plant Systematic Evolution*, 269:89-105.
- Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C. (2007b) Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Annals of Botany*, 100:875-888.
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE, Navarro C. (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, 95:255-273.
- Lucaccioni F, Denayer R, Tilquin B. (1993) Por une analyse des huiles essentielles. *Chimie Nouvelle*, 11:1253-1257.
- Lynch PT. (1999) Tissue culture techniques in *in vitro* plant conservation. In: Bennisson E.E. (ED.). *Plant conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, Ltd.

Referências bibliográficas

- MA (Millenium Ecosystem Assessment) (2003) *Millenium Ecosystem Assessment: Ecosystem and Human Wellbeing. A framework for assessment*. Island Press, London.
- Machado SMR. (2010) Actividade parasiticida e caracterização fitoquímica de extractos e metabolitos secundários de espécies aromáticas. *Tese de Doutoramento*. Universidade de Coimbra.
- Makunga NP, Jäger AK, van Staden J. (2003) Micropropagation of *Thapsia garganica* - a medicinal plant. *Plant Cell Reports*, 21:967-973.
- Makunga NP, Jäger AK, van Staden J. (2005) An improved system for the in vitro regenerating of *Thapsia garganica* L. via direct organogenesis – influence of auxins and cytokinins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82:271-280.
- Malcom JR, Canru L, Neilson RP, Hansen L, Hannah L. (2006) Global warming and extinctions of endemic species from biodiversity hotspots. *Conservation Biology*, 20:538-548.
- Mariz J. (1895) As Umbellíferas. Subsídios para o estudo da Flora Portuguesa. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 12:171-256.
- Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Maxia A. (2006) Isolation of *Seseli bocconi* Guss. subsp. *praecox* Gamisans (Apiaceae) volatile oil by supercritical carbon dioxide extraction. *Natural Product Research*, 20:820-826.
- Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Falconieri D, Frau MA, Maxia A, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L. (2012) Antifungal activity and chemical composition of essential oils from *Smyrniium olusatrum* L. (Apiaceae) from Italy and Portugal. *Natural Products Research*, 26:993-1003.
- Marriot P, Shellie R, Cornwell C. (2001) Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 936:1-22.
- Marris E. (2006) Gardens in full bloom. *Nature*, 440:860-863.

- Marston A, Hostettmann K. (2009) Natural product analysis over the last decades. *Planta Medica*, 75:672-682.
- Martin FG, Silvestre S. (1983) *Distichoselinum* Garcia Martin & Silvestre género nuevo de Umbelliferae. *Lagasalia*, 12:99-107.
- Martin KP. (2004a) Efficacy of different growth regulators at different stages of somatic embryogenesis in *Eryngium foetidum* L. - A rare medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 40:459-463.
- Martin KP. (2004b) *In vitro* propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO₂ enrichment. *Scientia Horticulturae*, 102:277-282.
- Martin, FW. (1971) *In Vitro* Measurement of Pollen Tube Growth Inhibition. *Plant Physiology*, 49:924-925.
- Marum L, Loureiro J, Rodriguez E, Santos C, Oliveira M, Miguel C. (2009) Flow cytometric analysis of *Pinus pinaster* somatic embryogenesis. *Journal of Biotechnology*, 143:288-95.
- Marzouki H, Khaldi A, Falconieri D, Piras A, Marongiu B, Mollicotti P, Zanetti S. (2010) Essential oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia obtained by supercritical carbon dioxide extraction. *Natural Products Communication*, 5:1955-8.
- Masoudi S, Khalilzadeh MA, Rustaiyan A, Tajbakhsh M. (2006) Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Semenovia dichotoma*, *Johreniopsis seseloides* and *Bunium cylindricum*, three Umbelliferae herbs growing wild in Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 17:691-694.
- Mateo Sanz G, Lopez Udías S. (2000) Comentários sobre los géneros *Conopodium* Koch e *Bunium* L., en las últimas floras españolas. *Flora Montiberica*, 14:27-30.
- Maxia A, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L. (2009) Chemical characterization and biological activity of essential oils

Referências bibliográficas

- from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. *Fitoterapia*, 80:57-61.
- Maxted, N, Dulloo E. (2008) *Crop wild relative*. University of Birmingham. Published on behalf of the IUCN/SSC.
- Maxted, N, Kell SP. (2009) Establishment of a Global Network for the In Situ Conservation of Crop Wild Relatives: Status and Needs. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Rome, Italy. Pp. 266.
- Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG. (1997a) *Plant genetic conservation: the in situ approach*. Chapman & Hall, London. Pp. 451.
- Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG. (1997b) Complementary conservation strategies. In Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG. (Eds.) *Plant Genetic Conservation: the In Situ Approach*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Pp.15-39.
- Maxted N, Kell S, Brehm J M. (2011) Options to promote food security: on-farm management and in situ conservation of plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Maxted N, van Slageren NW, Rihan JR. (1995) Ecogeographic surveys. In Guarino, L., Ramanatha Rao, V. and Reid, R. (eds.) *Collecting Plant Genetic Diversity, Technical Guidelines*. Wallingford: CAB International. Pp. 255-285.
- Maxted N, Dulloo E, Ford-Lloyd BV, Iriondo JM, Jarvis A. (2008) Gap analysis: a tool for complementary genetic conservation assessment. *Diversity and Distributions*, 14:1018-1030.
- Maxted N, Ford-Lloyd BV, Jury SL, Kell SP, Scholten MA. (2006) Towards a definition of a crop wild relative. *Biodiversity and Conservation*, 15: 2673-2685.
- Mazzoni V, Tomi F, Casanova J. (1999) A daucane-type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 14:268-272.

- Meeks-Wagner DR, Elizabeth S, Dennis K, Tran Thanh Van, W. James Peacock WJ. (1989) Tobacco Genes Expressed during in Vitro Floral Initiation and Their Expression during Normal Plant Development. *Plant Cell*, 1:25-35.
- Mercier H, B. M. Souza, J. E. Kraus, R. M. Hamasaki, Sotta B. (2003) Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured in vitro. *Brasilian Journal of Plant Physiology*, 15:107-112.
- Meyers N, Mittermeier A, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403:853-858.
- Miguel MG. (2010) Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 15: 9252-9287.
- Miguel, MG, Cruz C, Faleiro L, Simões MTF, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG (2010) *Foeniculum vulgare* essential oils: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Communications*, 5:319-328.
- Miller SL, Villanueva HE, Palazzo MC, Wright BS, Setzer WN. (2009) Seasonal variation and bioactivity in the leaf oil of *Liriodendron tulipifera* growing in Huntsville, Alabama. *Natural Product Communications*, 4:839-43.
- Milosavljević S, Tešević V, Vučković I, Jadranin M, Vajs V, Soković M, Janačković P, Jovanović A. (2007) Composition and antifungal activity of the essential oil of *Seseli annuum* wild-growing in Serbia. *Fitoterapia*, 78:319-322.
- Min L, Chen SW, Li WJ, Wang R, Li YL, Wang WJ, Mi XJ. (2005) The effects of angelica essential oil in social interaction and hole-board tests. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 81:838-42.
- Misic D, Grubisic D & Konjevic R. (2006) Micropropagation of *Salvia brachydon* through nodal explants. *Biologia Plantarum*, 50:473-476.
- Mittermier RA, Gil PR, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermier CG, Lamoreux J, Fonseca GAB. (2004) Hotspots revisited: earth's biologically richest and most

Referências bibliográficas

- endangered terrestrial eco-regions. CEMEX & Agrupacion Sierra Madre, Cidade do México.
- Mlambo, MC. (2012) The urgent need for human well-beings elements in biodiversity research. *Biodiversity and Conservation*. (<http://www.citeulike.org/article/10280445>) (acedido em 23/2/2012).
- Mockute D, Nivinskiene O. (2004) The sabinene chemotype of essential oil of seeds of *Daucus carota* L.ssp. *carota* growing wild in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research*, 16:277-281.
- Monteiro-Henriques T, Espírito-Santo MD. (2010) Climate change and outdoor regional living plant collections: an example from mainland Portugal. *Biodiversity and Conservation*, 20(2). (acedido em 23/2/2012).
- Moreno JC, coord. (2008). *Lista Roja 2008 de la flora vascular española*. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas), Madrid. Pp. 86.
- Morillas-Sánchez L, Fernández-López C. (2006) Plantas útiles en el valle del Guadiana Menor (Jaén, Sur de la Península Ibérica). *Blancoana*, 22:65-103.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth improved *in vitro* rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, 86:77-86.
- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.
- Nalawade S M, Sagare AP, Lee CY, Kao CL, Tsay HS. (2003) Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Botany Bulletin of Academia Sinica*, 44:79-98.

- Nandagopal S, Ranjitha Kumari BD. (2007) Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. *Journal of Central European Agriculture*, 8:73-80.
- Narvaes IS, Brenda DA, Longhi SJ. (2005) Estrutura da regeneração natural em Floresta Ombrófila Mista na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS. *Ciência Florestal*, 15:331-342.
- Németh E. (2005) Changes in Essential Oil Quantity and Quality Influenced by Ontogenetic Factors. Proc. Wocmap III, Vol. 1: *Bioprospecting & Ethnopharmacology*. Eds. J. Bernáth, É. Németh, L.E. Craker and Z.E.Gardner. Acta Hort, 675, ISHS.
- Németh G. (1986) Induction of rooting. In: Bajaj Y. P. S. (Ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 1*. Springer, Berlin. Pp. 49-64.
- Neves H, Freitas A. (1996) *Introdução à cromatografia gás-líquido de alta resolução*. Póvoa de Santa Iria: Dias de Sousa.
- Newman D, Cragg G, Snader K. (2003) Natural Products as Sources of New Drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 6:1022-37.
- Nieto Feliner G. (2003) *Eryngium* L. In: Castroviejo et al. (Eds.) *Flora Iberica*, 10:36-60. CSIC Madrid.
- Nogueira T, Marcelo-Curto MJ, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Rubiolo P, Bicchi C. (2008) Chemotaxonomy of *Hypericum* genus from Portugal: Geographical distribution and essential oils composition of *Hypericum perforatum*, *Hypericum humifusum*, *Hypericum linarifolium* and *Hypericum pulchrum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36:40-50.
- Nokwanda P, Makunga1, Anna K, Jager L, van Staden J. (2005) An improved system for the *in vitro* regeneration of *Thapsia garganica* via direct organogenesis - influence of auxins and cytokinins. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 82:271-280.

Referências bibliográficas

- O'Leary N, Calviño C, Greizerstein E, Martinez S, Poggio L. (2004) Further cytogenetical studies on diploid and polyploid species of *Eryngium* L. (Saniculoideae, Apiaceae) from Argentina. *Hereditas*, 140:129-133.
- Ornduff R, Fabbe PM, Keeler-wolff FF. (2003) *Introduction to California Plant Life - these species are obligatory serpentine species*. Regents of the University of California. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California.
- Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M, Bassami MR. (2010) Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 120:765-770.
- Ortega HA, Carretero T, Bermejo ME, Pardo P. (1986) Aceites esenciales en Umbelíferas. Estudio del aceite esencial de *Elaeoselinum asclepium* subsp. *asclepium*. *Anales del Jardim Botanico de Madrid*, 43:121-124.
- Oxkhan A et al. (2007) Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Ferulago longistylis* Boiss. fruits. *Panta Medica*, 73:880.
- Ozcan M, Chalchat JC. (2007) Chemical composition of carrot seeds cultivated in Turkey: characterized of the seed oil and essential oil. *Grasas y aceites*, 58:359-363.
- Ozcan M, Chalchat JC, Arslan D, Ates A, Unver A. (2006) Comparative Essential Oil Composition and Antifungal Effect of Bitter Fennel (*Foeniculum vulgare* ssp. *piperitum*) Fruit Oils Obtained During Different Vegetation. *Journal of Medicinal Food*, 9:552-561.
- Öztürk M, Waisel Y, Khan MA, Görk G. (Eds.) (2006) *Biosaline Agriculture and Salinity Tolerance in Plants*. V, XVI. Birkhäuser Basel. Pp. 205.
- Pála-Paúl J, Perez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A. (2001) Contribution to the knowledge of the oil of *Elaeoselinum gummiferum* (Desf.) Tutin. *Journal of Essential Oils Research*, 13:362-363.

- Palá-Paúl LM, Copeland JJ, Brophy Y, Goldsack RJ. (2006) Essential oil composition of *Eryngium rosulatum* P.W. Michael ined.: A new undescribed species from eastern Australia. *Bioch. Systematics and Ecology*, 34:768-801.
- Pála-Paúl J, Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Varadé J, Villa AM, Sanz J, Brophy JJ. (2005) Analysis of the essential oil composition from different parts of *Eryngium glaciale* Boiss. from Spain. *Journal of Chromatography A*, 1094:179-182.
- Pála-Paúl J, Usano-Aleman J, Brophy JJ, Pérez-Alonso MJ, Soria AC. (2010) Essential oil composition of the different parts of *Eryngium aquifolium* from Spain. *Natural Product Communications*, 5:817-821.
- Palmeira de Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Queiroz JA, Rodrigues AG. (2009) Anti-candida activity of essential oils. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9:1292-1305.
- Pandey VP, Cherian, E, Patani G. (2010) Effect of Growth Regulators and Culture Conditions on Direct Root Induction of *Rauwolfia serpentina* L. (Apocynaceae) Benth by Leaf Explants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9:27-34.
- Panis B, Swennen R, Engelmann F. (2001) Cryopreservation of plant germplasm. *Acta Horticulturae*, 560:79-86.
- Pant B, Manandhar S. (2007) *In vitro* propagation of carrot (*Daucus carota*) L. *Scientific World*, 5:5.
- Parker P. (1981) The endemic plants of metropolitan Portugal, a survey. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 2:943-994.
- Paul JHA, Seaforth CE, Tikasingh V. (2011) *Eryngium foetidum* L.: A review. *Fitoterapia*, 82:302-308.
- Pavia D, Lampman G, Kriz G. (1996) *Introduction to spectroscopy*. (2ª edição, ed., vol. Saunders Golgden Sunburst Series). Fourth Worth: Harcourt Brace College Publishers.

Referências bibliográficas

- Pelagio-Flores R, Ortíz-Castro R, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, Loópez-Bucio J. (2011) Serotonin, a Tryptophan-Derived Signal Conserved in Plants and Animals, Regulates Root System Architecture Probably Acting as a Natural Auxin Inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 52:490–508.
- Pellegrineschi A. (2005) The use of biotech for the introgression of new genetic variability in wheat varieties for developing countries. In: Tuberosa R.; Phillips R. L.; Gale M. (eds) *Proceedings of the international congress. "In the wake of the double helix: from the green revolution to the gene revolution"*, Bologna, May 2003. University of Bologna, Italy.
- Pence VC. (1999) The application of biotechnology for the conservation of endangered species. In: Benson E. E. (ed) *Plant conservation biotechnology*. Taylor and Francis, London. Pp. 227-241.
- Pereira Coutinho AX. (1939) *Flora de Portugal*, 2ª Ed., Bertrand Ltd. Lisboa.
- Pereira HM, Leadley PW, Proença P, Alkemade R, Scharlemann JPW, Fernandez-Manjarrés JF, Araújo MB, Balvanera P, Biggs R, Cheung WWL, Chini L, Cooper HD, Gilman EL, George GC, Hurtt GC, Huntington HP, Mace GM, Oberdorff T, Revenga C, Rodrigues P, Scholes RJ, Sumaila UR, Walpole M. (2010) Scenarios for Global Biodiversity in the 21st Century. *Science*, 330:1496-1501.
- Pérez-García F, González-Benito ME, Gómez-Campo C. (2008) Germination of fourteen endemic species from the Iberian Peninsula, Canary and Balearic Islands after 32-34 years of storage at low temperature and very low water content. *Seed Science and Technology*, 36:407-422.
- Perthuy GY, Martínez S, Greizerstein EJ, Poggio L. (2010) Genomic relationships among diploid and polyploid species of the genus *Eryngium* L. using genomic *in situ* hybridization. *Genome*, 53:824-31.
- Petrovic S. (2007). Composition and antimicrobial activity of *Laserpitium zernyi* Hayek essential oils. *Planta Medica*, 73:853-853.

- Phillipson J. (1999) Conservation of medicinal plants. *Phytotherapy Research*, 13:2-8.
- Picman AK. (1986) Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14:255-281.
- Pielou EC. (1975) *Ecological diversity*. New York: Wiley-Interscience. Pp.165.
- Pimenov MG, Leonov MV. (1993) *The genera of the Umbelliferae*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Pinilla M, Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A. (1995) Volatile constituents from fruits of *Daucus carota* L. subsp. *gummifer* Hooker Fil. *Journal of Essential Oils Research*, 7:433-435.
- Pinto da Silva AR, Teles NA. (1999) *A Flora e a Vegetação da Serra da Estrela - Parque Natural da Serra da Estrela*. Coleção Natureza e Paisagem. 14. 3ª Edição. Porto.
- Pinto E, Vale-da-Silva, Cavaleiro C, Salgueiro L. (2009) Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58:1454-1462.
- Pinto-Gomes CJ. (1998) Estudo fitossociológico do Barrocal algarvio (Tavira-Portimão). *Tese de doutoramento*. Universidade de Évora.
- Pinto-Gomes CJ, Paiva-Ferreira R. (2005) Flora e Vegetação do Barrocal Algarvio (Tavira-Portimão). Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Algarve. Pp. 354.
- Pinto-Gomes CJ, Paiva-Ferreira R, Quinto-Canas J, Pinto R, Meireles C, Redondo-Garcia MM. (2008) Guia Geobotânico ao Barrocal Algarvio. Monografia. *Quercetea*, 8. 143 pp. Associação Lusitana de Fitosociologia. Fédération Internationale de Phytosociologie. Evora (Portugal).
- Plant Search. Conserving Europe's threatened plants.
(<http://www.bgci.org/ourwork/threatenedeurope/>) (acedido em 15/3/2011).

Referências bibliográficas

- Pool PA, Bermawie N. (1987) Procedure for artificial cross pollination in clove (*Syzygium aromaticum*). *Euphytica*, 36:479-482.
- Popović V, Petrović S, Pavlović M, Milenković M, Couladis M, Tzakou O, Duraki S, Niketić M. (2010) Essential oil from the underground parts of *Laserpitium zernyi*: potential source of alpha-bisabolol and its antimicrobial activity. *Natural Product Communications*, 5:307-10.
- Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. (2006) In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *Complementary and Alternative Medicine*, 6:39.
- Prado M, Rodriguez E, Rey L, González M, Santos C, Rey M (2010) Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 103:49-59.
- Prashar A, Locke IC, Evans CS. (2004) Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*, 37:221-229.
- Pratheesh PT, Kumar MA. (2012) In vitro Flowering in *Rosa indica* L. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2:196-200.
- Primack RB. (2001) Causes of extinction. In Levin S.A. (Ed.) *Encyclopedia of Biodiversity. Volume 2*. San Diego: Academic Press. Pp. 697-713.
- Pritchard DJ, Harrop SR. (2010) A re-evaluation of the role of *ex situ* conservation in the face of climate change. *Botanical Garden Journal*, 7:3-6.
- Pritchard HW, Dickie JB. (2003) Predicting seed longevity: use and abuse of seed viability equations. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UKP. Pp. 653-722.
- PRNPortalICNB(<http://www.icnf.pt/ICNPortal/vPT2007/O+ICNB/Rede+Natura+2000+2010/>) (acedido em 22/10/2011).

- Probert C, Sharrock S, Ali N. (2011) *A REDD+ manual for botanic gardens*. Botanic Gardens Conservation International (BGCI), Richmond, United Kingdom & Royal Botanic gardens, Kew, London, United Kingdom.
- Proença-da-Cunha A. (2005) *Farmacognosia e Fitoquímica*. Edição Fundação Calouste Gulbenkian. Pp. 670.
- Proença-da-Cunha A, Pereira-da-Silva A, Roque OR. (2003) *Plantas e produtos vegetais em Fitoterapia*. Edição Fundação Calouste Gulbenkian. Pp. 701.
- Proença-da-Cunha A, Ribeiro JA, Roque OR. (2007) *Plantas aromáticas em Portugal, caracterização e utilizações*. Edição Fundação Calouste Gulbenkian. Pp. 328.
- Proença V, Queiroz CF, Araújo M, Pereira HM. (2009) Biodiversidade. In: Pereira, H.M., Domingos, T., Vicente, L. & Proença, V. (Eds) *Ecossistemas e Bem-Estar Humano. Avaliação para Portugal do Millennium Ecosystem Assessment*. Editora Escolar, Lisboa, Pp.127-179.
- Projeto INQUIRE. (<http://www.inquirebotany.org/pt/news/biodiversity-guardian-279.html>) (acedido em 22/4/2012).
- PSRN, 2000 (Plano Sectorial Da Rede Natura, 2000) Enquadrado pelo Artigo 8º do Dec. Lei n.º 140/99 de 24/4 com a redação dada pelo Dec. Lei n.º 49/2005 de 24/4, tendo sido aprovado em 2008, com a publicação da RCM nº 115-A/2008, de 21 de Julho.
- Pujadas Salvá AJ. (2000) Sobre la presencia de *Thapsia minor* Hoffmanns. & Link (Umbelliferae) en la Península Ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 57: 464-465.
- Pujadas Salvá AJ. (2002) El complejo de *Daucus carota* L (Apiaceae) en la flora Ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 59:368-375.
- Pujadas Salvá AJ. (2003a) *Daucus* L. In: Nieto Feliner G, Jury SL, Herrero A (Eds) *Flora Iberica, vol X. Real Jardín Botánico*. CSIC: Madrid.

Referências bibliográficas

- Pujadas Salvá AJ. (2003b) El complejo de *Daucus carota* L. (Apiaceae) en la Flora Ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 59:368-375.
- Qiu Y-X, Hong D-Y, Fu C-H, Kenneth M C. (2004) Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32:583-596.
- Queiroga H, Leão F, Coutinho M. (2008) *Candidatura das Berlengas a Reserva da Biosfera da UNESCO*. Instituto do Ambiente e Desenvolvimento. Aveiro.
- Rai MK, Jaiswal VS, Jaiswal U. (2009) Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 17:29-38.
- Rajeswari V, Paliwal K. (2008) *In vitro* adventitious shootorganogenesis and plant regeneration from seedling explants of *Albizia odoratissima* L.f. (Benth.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 44:78-83.
- Rands M RW, William MA, Bennun L, Stuart H, Butchart M,, Clements A, Coomes D, Abigail Entwistle A, Hodge⁷I, Kapos V , Scharlemann JPW, Sutherland WJ, Vira B. (2010) Biodiversity Conservation: Challenges Beyond 2010. *Science*, 10:1298-1303.
- Rates S. (2001) Plants as source of drugs. *Toxicology*, 39:603-13.
- RBGK (Royal Botanic Gardens of Kew) (2012) Unidade de conservação. (<http://www.kew.org/science/micropropagation.html>) (acedido em 2/2/2011 e 14/6/2012).
- Reinert J. (1958) Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonene an gewebeulturen aus karotten. *Planta*, 53:318-333.
- Ribeiro PMC. (2006) Caracterização da Flora Vascular e do Padrão da Dinâmica da Paisagem na Serra do Caramulo. Análise do Estado de Conservação de Taxa Prioritários. *Tese de Doutoramento*. Universidade de Coimbra.

- Ricketts TH. (2001) *Conservative biology and biodiversity*. In: Encyclopedia of life sciences. Wiley, New York. (<http://www.els.net>). *In Vitro Propagation of wild carrot*, 55.
- Rivaz-Martinez S, Díaz TE, Fernández-González F, Izco J, Loidi J, Lousã M, Penas A. (2002a) Vascular plant communities of Spain and Portugal. Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. Part II. *Itinera Geobotanica*, 15:433-922.
- Rivaz-Martinez S, Díaz TE, Fernández-González F, Izco J, Loidi J, Lousã M, Penas A. (2002b) Vascular plant communities of Spain and Portugal. Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. Part II. *Itinera Geobotanica*, 15:490 e 592.
- Robertson DP, Hull RB. (2000) Beyond Biology: toward a More Public Ecology for Conservation. *Conservation Biology*, 15:970-979.
- Rodriguez JL, Petre A, Spahn E, Casermeiro J, Lopez AG, Zygadlo JA. (2002) *Journal of Essential Oil Research*, 14:82-83.
- Rongl J, Janson S, Umehara M, Ono M, Vrieling K. (2010) Historical and contemporary gene dispersal in wild carrot (*Daucus carota* ssp. *carota*) populations. *Annals of Botany*, 106: 285-296.
- Ross JD, Sombrero C. (1991) Environmental control of essential oil production in Mediterranean plants. In: Harborne, J.B. and F.A. Tomahs-Barbera (Eds.), *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. Clarendon Press, Oxford. Pp. 83-94.
- Rossi PG, Bao L, Luciani A, Panighi J, Desjobert JM, Costa J, Casanova J, Bolla JM, Berti L. (2007a.) (*E*)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oils against *Campylobacter jejuni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:7332-7336.
- Rossi PG, Berti L, Panighi J, Luciani A, Maury J, Muselli A. (2007b) Antibacterial action of essential oils from Corsica. *Journal of Essential Oil Research*, 19:176-182.

Referências bibliográficas

- Rubiolo, P et al. (2006) Analytical discrimination of poisonous and nonpoisonous chemotypes of giant fennel (*Ferula communis* L.) through their biologically active and volatile fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:7556-7563.
- Ruzicka DV, Vujovic TI. (2008) The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). *Horticultural Science*, 35:12-21.
- Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorska R, Beeckman T, Friml, Benkova E. (2007) Ethylene Regulates Root Growth through Effects on Auxin Biosynthesis and Transport-Dependent Auxin Distribution. *Plant Cell*, 19: 2197-2212.
- Saad HEA, El-Sharkawy SH, Halim AF. (1995) Essential oils of *Daucus carota* ssp. *maximus*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70:79-84.
- Salgueiro L (1994) Os tomilhos portugueses e os seus óleos essenciais. *Tese de Doutoramento*. Universidade de Coimbra.
- Sampaio G. (1946) *Flora Portuguesa*. 2ª Ed. Instituto Nacional de Investigação Científica.
- Sampaio G. (1988) *Flora Portuguesa*. Fax-sim., 3ª Ed. Instituto Nacional de Investigação Científica. Lisboa.
- Samuoliene G, Duchovskis P, Urbonaviciute A, Sabajeviene G. (2008) Flowering initiation in carrot and caraway. *Lithuanian Institute of Horticulture*, Kauno, 27:17-24.
- Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34:3-21.
- Santos C, Loureiro J, Lopes T, Pinto G. (2007) Book Chapter: Genetic Fidelity Analyses of *In Vitro* Propagated Cork Oak (*Quercus suber* L.). IN: *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Part 1, Pp. 67-83.

- Sarasan VA, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK. (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 42:206-214.
- Savikin-Fodulovic KP, Zdunic GM, Tasic SR. (2006) Essential oil of *Seseli rigidum* Waldst. et Kit. var. *rigidum*. *Journal of Essential Oil Research*, 18:286-287.
- Scorza R, Jules Janick J. (1980) *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 105:892-897.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (2002) *Global Strategy for Plant Conservation*. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, Quebec, Canada.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (2010) *Updated Global Strategy for Plant Conservation 2011–2020*. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, Quebec, Canada.
- Sena Filho JG, Xavier HS, Barbosa Filho JM, Durringer JM. (2010) A chemical marker proposal for the *Lantana* genus: composition of the essential oils from the leaves of *Lantana radula* and *L. canescens*. *Natural Product Communications*, 5:635-40.
- Seo L, Che SW, Li WJ, Wang R, Li YL, Wang WJ, Mi XJ. (2005) The effects of angelica essential oil in social interaction and hole-board tests. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 81:838-842.
- Seo H-Y, Yang S-H, Shim S-L, No K.M, Park K-S, Song K-D, Kim K-S. (2007) Volatile organic compounds of *Angelica gigas* Nakai, Korean medicinal herb. *Natural Products Research*, 21:265-273.
- Sergio L, Gianni B. (2005) Molecular markers based analysis for crop germplasm preservation. Paper presented at the FAO Meeting on the role of biotechnology for the characterization and conservation of crops, forestry, animal and fishery genetic resources, Turin, Italy, 5–7 March.

Referências bibliográficas

- Sharma MM, Dhingra M, Dave A, Batra P. (2012) Plant regeneration and stimulation of *in vitro* flowering in *Eruca sativa* Mill. *African Journal of Biotechnology*, 11:7906-7911.
- Sharrock S. (2006) The role of botanic gardens in the conservation of crop wild relatives. *Botanical Garden Conservation International Journal*, 3:16-19.
- Sharrock S, Jones M. (2009) *Conserving Europe's threatened plants: Progress towards Target 8 of the Global Strategy for Plant Conservation*. Botanic Gardens Conservation International, Richmond, UK.
- Sharrock S, Jones M. (2011) Saving Europe's threatened flora: progress towards GSPC Target 8 in Europe. *Biodiversity and Conservation*, 20:325-333.
- Shehadeh AA. (2011) Ecogeographic, genetic and taxonomic studies of the genus *Lathyrus* L. *Ph-D Thesis*. Universidade de Birmingham, College of Life and Environmental Sciences. UK.
- Siddique I, Anis M. (2009) Direct plant regeneration from nodal explants of *Balanites aegyptiaca* L. (Del.): a valuable medicinal tree. *New Forests*, 37: 53-62.
- Siljegović J, Glamoclija, J., Soković, M., Vucković, I., Tesević, V., Milosavljević, S., Stesević, D., (2011). Composition and antimicrobial activity of *Seseli montanum* subsp. *tommasinii* essential oil. *Natural Product Communications*, 6:263-266.
- Silva-Pando (2008) Las plantas endémicas y subendémicas de Galicia. Boletín BIGA 3. 9-150. (acedido em 26/6/2007).
- Silveira PC. (2001) Contribuição para o conhecimento da flora vascular da serra do Açor e respectiva interpretação fitogeográfica. *Tese de Doutoramento*. Universidade de Coimbra.
- Silveira PC. (2007) A flora da Serra do Açor (Portugal). *Guineana*, 13:1-333.

- Simões M, Bennett R, Ross E. (2009) Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Products Reports*, 26:746-57.
- Simon PW. (2000) Domestication, historical, development, and modern breeding of carrot. *Plant Breed Review*, 19:157-190.
- Smith RD, Dickie JB, Linington SH, Pritchard HW, Probert RJ. (2003) *Seed Conservation: turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Singh B, Sharma S, Rani G, Virk G.S, Zaidi AA, Nagpal A. (2006) *In vitro* flowering in embryogenic cultures of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour ' *C. deliciosa* Tenora). *African Journal of Biotechnology*, 5:1470-1474.
- Singh G, Kapoor P, Pandey SK, Singh UK, Singh RK. (2002) Study on essential oils: part 10: Antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytotherapy Research*, 16:680-682.
- Singh MP, Kumar S. (2009). *Principles and Methodology in Plan Tissue Culture*. Cap.5. Pg. 265. (acedido em 22/maio/2010).
- Sork VL, Nason J, Campbell DR, Fernandez JF. (1999) Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 14:219-224.
- Souza MC, Siani AC, Ramos MF, Menezes-de-Lima OJ, Henriques MG. (2003) Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Pharmazie*, 58:582-586.
- Spurr AR. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*, 26:31-43.
- Srikishna A, Anebouselvy K. (2003) Enantiospecific first total synthesis of the optical antipoda of a natural thapsane isolated from *Thapsia villosa*. *Tetrahedon Letters*, 44:1031-1034.

Referências bibliográficas

- Staniszewska M, Kula J, Wieczorkiewicz M, Kusewicz D. (2005) Essential oils of wild and cultivated carrots-the chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*, 17:579-583.
- Stein M, Nothnagel T. (1995) Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota sativus* Hoffm.). *Plant Breeding*, 114:1-11.
- Steward FC, Mapes O, Mear, K. (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45:705-709.
- Stojkovic S, Petrovic J, Kukic A, Dzamic M, Ristic M, Milenkovic J, Glamoclija M, Sokovic D, Stojkovic D. (2009) Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Seseli rigidum* flower essential oil. *Chemistry of Natural Compounds*, 45:253–256.
- Strategic Research Agenda 2025: - Part II: Strategic Research Agenda (2005), European Technology Platform Plants for the Future. Pp. 1-102.
- Sudarshana MS, Niranjana S, Girisha T. (2008) *In vitro* flowering, somatic embryogenesis and regeneration in *Boerhaavia diffusa* Linn. - A medicinal plant. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3:83-86.
- Sunnucks P. (2010) Efficient genetic markers for population biology. *Tree*, 15:199-203.
- Tabanca N, Ma G, Pasco DS, Bedir E, Kirimer N, Baser KH, Khan IA, Khan SI. (2007) Effect of essential oils and isolated compounds from *Pimpinella* species on NF-kappaB: a target for antiinflammatory therapy. *Phytotherapy Research*, 21:741-745.
- Taha RM, Haron NW. (2008) Some morphological and anatomical studies of leaves and flowers of *Murraya paniculata* (Jack) Linn. *in vivo* and *in vitro*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11:1021-1026.
- Taiz L, Zeiger L. (2002) *Mineral Nutrition: Plant Physiology*. Sinauer Associates, 2nd Edition.

- Tanavat K, Puangepaka S, Noopamas S, Sompopop P. (2011) *In vitro* clonal propagation of *Centella asiatica* L. Urban using shoot tip explants pre-treated with thidiazuron. Medicinal plants. *International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 3:47-52.
- Tang W. (2000) High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis and *in vitro* flowering of regenerated plantlets in *Panax ginseng*. *Plant Cell Reports*, 19:727-732.
- Tang W, Guo Z. (2001) *In vitro* propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. *Plant Growth Regulators*, 33:25-31.
- Tauleigne GC, Draper D, Marques I, Rossello-Graell A. (2004) Componente Vegetal do Plano de Ordenamento da Reserva Natural das Berlengas. Museu História Natural de Lisboa.
- Tavares AC. (2010) Biodiversidade, extinção, sustentabilidade, conservação: que opções? *O/El Botânico*, 4:5-7.
- Tavares AC. (2011) Um programa educativo sustentável: Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (1997-2010). Monografia. Jardim Botânico de Coimbra. Departamento das Ciências da Vida, Jardim Botânico, FCTUC.
- Tavares AC, Pimenta MC, Gonçalves MT. (1996) Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots. *Plant Cell Reports*, 15:441-444.
- Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro L. (2008) Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 119:129-134.
- Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto J. (2009) Micropropagation of the Iberian endemism *Distichoselinum tenuifolium* (Lag.) García Martín & Silvestre through shoot proliferation and somatic embryogenesis. X Simpósio da Associação Ibero-

Referências bibliográficas

- Macaronésica de Jardins Botânicos, Jardim Botânico Histórico La Concepción, Málaga. Comunicação oral. Pg. 50.
- Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto JM (2009-2010) *In vitro* conservation of *Angelica pachycarpa*, an Iberian endemic *Apiaceae* of the Portuguese Berlenga Islands. *Revista del Jardín Botánico Nacional de Cuba*. 30-31:109-111.
- Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto J (2010a) *In vitro* propagation of the wild carrot *Daucus carota* L. subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas for conservation purposes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 46:47-56.
- Tavares AC, Gonçalves MJ, Cruz MC, Cavaleiro C, Lopes MC, Canhoto JM, Salgueiro L. (2010b) Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: Chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacol.*, 130:593-598.
- Tavares AC, Loureiro J, Figueiredo E, Lopes L, Salgueiro L, Canhoto JM. (2011a) *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss., a Portuguese endemic *Apiaceae*: characterization and distinction of two subspecies. XXXVI Jornadas Portuguesas de Genética. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Comunicação em painel. Pg. 55.
- Tavares AC, Salgueiro L, Canhoto JM. (2011b) *In vitro* conservation of *Seseli montanum* L. subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lánz, an Iberian serpentine endemism of Trás-os-Montes (Portugal). 7th International Conference on Serpentine Ecology, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Comunicação em painel. Pg. 135.
- Tavares AC, Zuzarte, M. R, Salgueiro L. (2010c) *Plantas Aromáticas e Medicinais da Escola Médica do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra* – Imprensa da Universidade de Coimbra. 2ª edição, 2010.
- Tavares AC, Loureiro J, Cavaleiro C, Salgueiro L, Canhoto JM, Paiva J. (2012) Characterization and distinction of two subspecies of *Eryngium duriaei* J. Gay ex

- Boiss., an Iberian endemic Apiaceae, using flow cytometry and essential oils composition. *Plant Systematics and Evolution*. (submetido).
- Tawfik AA, Mohamed MF. (2006) *In vitro* cloning of two cumin landrace lines via shoot-tip culture. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81:264-268.
- Templeton AR. (1986) Coadaptation and outbreeding depression. In M. E. Soulé, ed., *Conservation Biology: The Science and Scarcity of Diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Pp. 105-166.
- Thi LT, Pleschka E. (2005) Somatic embryogenesis of some *Daucus* species influenced by ABA. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 79:1-4.
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC, Erasmus BFN, Ferreira de Siqueira M, Grainger A, Hannah L, Hughes L, Huntley B, van Jaarsveld AS, Midgley GF, Lera M, Ortega-Huerta MA, Townsend Peterson A, Phillips OL, Williams SE. (2004) Extinction risk from climate change. *Nature*, 427:145-148.
- Thomas JC, Gultinan MJ, Bustos S, Thomas T, Nessler C. (1989) Carrot (*Daucus carota*) hypocotyls transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 8:354-357.
- Thorpe TA, Stasolla C. (2001) Somatic embryogenesis. In: Bhojwani S. S.; Soh W. Y. (eds) *Current trends in the embryology of angiosperms*. Kluwer, Dordrecht. Pp. 279-336.
- Tosun AM, Kurkçuoğlu E, Dogan H, Durman B, Baser KHC. (2006) Essential oil composition of *Seseli petraeum* M. Bieb. and *Seseli andronakii* Woron. growing in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 21:257-259.
- Truiller W, Albert C, Araújo MB. (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:8245-8250.

Referências bibliográficas

- Thuiller, W., Albert, C.H., Araújo, M.B., Berry, P.M., Cabeza, M., Guisan, G., Hickler, T., Midgley, G.F., Paterson, J., Schurr, F.M., Sykes, M.T., Zimmermann, N.E. (2008) Predicting global change impacts on plant species distributions: future challenges. *Perspectives in Plant Ecology. Evolution and Systematics*, 9:137-152.
- Tsay HS, Uang HL. (1998) Somatic embryo formation from immature embryo-derived suspension-cultured cells of *Angelica sinensis* (Oliv.) *Diels. Plant Cell Reports*, 17:670-674.
- Tutin TG, Heywood VH, Burgess NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds) (1968). *The Flora Europaea organization*. Vol. 2. Rosaceae to Umbelliferae. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 455.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., & Webb D.A. (1981) *Flora Europaea organization*, Vol 3. Cambridge University Press, Cambridge.
- van Staden J, Zazimalova E, George EF. (2008) Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: George E. F.; Hall M. A.; De Klerk G.-J. (Eds). *Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed. Springer, Dordrecht. Pp. 205-226.
- van Zyla RL, Seathlof ST, Van Vuuren SF, Viljoen A. (2010) Pharmacological interactions of essential oil constituents on the viability of micro-organisms. *Natural Product Communications*, 5:1381-1386.
- Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Pérez De Paz PL, Palá-Paúl J, Sanz J. (2005) Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oils from the aerial parts of *Pimpinella anagodendron* Bolle and *Pimpinella rupicola* Svent., two endemic species to the Canary Islands, Spain. *Journal of Chromatography A*, 1095:180-184.
- Vengadesan G, Pijut PM. (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 97:141-149.

- Veter J. (2004) Poison hemlock (*Conium maculatum* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 42:1373-1382.
- Vila S, Gonzalez A, Rey H, Mroginski M. (2010) Effect of morphological heterogeneity of somatic embryos of *Melia azedarach* on conversion into plants. *Biocell*, 34:7-13.
- Vitousek PM, Mooney HA, Luhchenco J, Melillo JM. (1997) Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 297:494-499.
- Vu NH, Panh PH, Nhut DT. (2006) The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. "First Prize". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 87:315-320.
- Way MJ. (2003) Collecting seed from non-domesticated plants for long-term conservation. In Smith R.D., Dickie J.B., Linington S.H., Pritchard H.W., Probert R.J. (Eds.), *Seed Conservation: turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Wei A, Shibamoto T. (2007) Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:1737-1742.
- Weiss EA. (1997) *Essential oil crops*. Cab International, New York.
- Wilkinson T, Wetten A, Prychid C, Fay MF. (2003) Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Annals of Botany*, 91:65-74.
- Will, M. (2008) *Promoting Value Chains of Neglected and Underutilized Species for Pro-Poor Growth and Biodiversity Conservation. Guidelines and Good Practices*. Global Facilitation Unit for Underutilized Species, Rome, Italy.
- Wink M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64:3-19.
- Wu Y, Xu ZL, Li HJ, Meng XY, Bao YL, Li YX. (2006) Components of essential oils in different parts of *Daucus carota* L. *Chemical Research Chinese University*, 22:328-334.

Referências bibliográficas

- Wyse Jackson P. (2004) Developing international targets for botanic gardens in conservation: a consultation document. *Botanic Garden Journal*, 1:4-6.
- Wyse Jackson PS, Sutherland LA. (2000) *Agenda Internacional para la Conservación en Jardines Botánicos*. Organizacion Internacional para la conservation en Jardines Botánicos (BGCI), UK.
- Yadav K, Singh N. (2011) *In vitro* flowering of shoots regenerated from cultured nodal explants of *Spilanthes acmella* Murr. - an ornamental cum medicinal herb. *Analele Universitatii din Oradea – Fascicula Biologie*, 18:66-70.
- Yang B, Huang X-L, Hu C-G. (2009) Factors of Flower Inducing and Histological Observation in *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright *in vitro*. *Plant Science Journal*, 27:318-322.
- Yang JL, Niu YD, Yang CP. (2011) Induction of somatic embryogenesis from female flower buds of elite *Schisandra chinensis* *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106:391-399.
- Yang JL, Seong ES, Kim MJ, Ghimire BK, Kang WH, Yu CY, Li CH. (2010) Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100:49-58.
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T. (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38:171-186.
- Yoshida S, Mandel T, Kuhlemeier (2011) Stem cell activation by light guides plant organogenesis. *Genes & Development*, 25:1439-1450.
- Young A, Boyle T, Brown T. (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11:413-418.
- Zar JH. (1996) *Biostatistical analysis*. 3rd Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Zhang T, Du JR, Wang J, Yu DK, Chen YS, He Y, Wang CY. (2009) Z-ligustilide extracted from Radix *Angelica sinensis* decreased platelet aggregation induced by

- ADP *ex vivo* and arterio-venous shunt thrombosis in vivo in rats. *Yakugaku Zasshi*, 129:855-9.
- Zhang T. (2007) *In vitro* flowering of *Perilla frutescens*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 43:91-94.
- Zhang X, Ervin EH. (2004) Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. *Crop Science*, 44:1737-1745.
- Zhao Y, Hasenstein KH. (2009) Primary Root Growth Regulation: The Role of Auxin and Ethylene Antagonists. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28:309-320.
- Zhao RJ, Koo BS, Kim GW, Jang EY, Lee JR, Kim MR, Kim SC, Kwon YK, Kim KJ, Huh T-I, Kim D-H, Shim I, Yang CH. (2005) The essential oil from *Angelica gigas* Nakai suppresses nicotine sensitization. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28:2323-2326.
- Zohreh H, Shiva M, Abdolhossein R. (2003) Chemical composition of the essential oil of *Seseli tortuosum* ssp. *Kiabii* Akhani. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*. 15:412-415.
- Zonneveld BJM. (2001) Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate between species and sectional divisions. *Plant Systematics and Evolution*, 229:125-130.
- Zonneveld BJM, van Jaarsveld EJ. (2005) Taxonomic implications of genome size for all species of the genus *Gasteria* Duval (Aloaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 251:217-227.
- Zonneveld BJM, Grimshaw JM, Davis AP. (2003) The systematic value of nuclear DNA content in *Galanthus*. *Plant Systematics and Evolution*, 241:89-102.
- Zore GB, Thakre AD, Rathod V, Karuppayil SM. (2010) Evaluation of anti-Candida potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans*

Referências bibliográficas

differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. *Mycoses* (Epub ahead of print) (acedido 20/12/2009).

Zuzarte M, Dinis AM, Cavaleiro C, Salgueiro L, Canhoto J. (2010) Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 32:580-587.

Zuzarte M, Gonçalves MJ, Canhoto J, Salgueiro L. (2011) Antidermatophytic activity of essential oils. *Formatex 2011*, 1167-1178. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A.Méndez-Vilas (Ed.).

Zuzarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Dinis A, Canhoto J, Salgueiro L. (2009) Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula pedunculata*. *Chemistry and Biodiversity*, 6:1283-1292.

ANEXOS

Anexo I – Material colhido (2005-2011)**1. *Eryngium galioides* Lam.**

Localidades: Algarve, Loulé, Lagoa da Nave, Nave do Barão, 28.05.2008, *A. C. Tavares* 85 (COI).

2. *Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss.***Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss. subsp. *duriaei***

Localidades: Beira Alta, Serra da Estrela, Cântaro Raso, 1700 m, 16.09.2008, *A. C. Tavares*, 112 (COI). Beira Alta, Serra da Estrela, Cântaro Raso, 1700 m, 11.07.2010.

***Eryngium duriaei* J. Gay ex Boiss. subsp. *piresianum* (M. Láziz) M. Láziz**

Localidades: Douro Litoral, Serra da Freita (Arouca), Frecha da Mizarela, 11.04.2005. Beira Litoral, Serra do Açor, entre Colcurinho e Senhora das Necessidades, 30.06.2005. *A. C. Tavares*, 8 (COI). Beira Litoral, Serra do Açor, entre Colcurinho e Senhora das Necessidades, 17.07.2006, *A. C. Tavares*, 54 (COI). Minho, Serra do Gerês, Mata da Albergaria, 26.07.2007, *A. C. Tavares*, 74 (COI). Beira Litoral, Serra do Açor, entre Colcurinho e Senhora das Necessidades, 20.09.2008, *A. C. Tavares*, 113 (COI). Beira Litoral, Serra do Açor, Colcurinho, 19.06.2010, *A. C. Tavares*, 136 (COI); Beira Litoral, Serra do Açor, Colcurinho, 21.09.2010. Minho, Serra do Gerês, Mata da Albergaria, caminho marginal do rio Homem, 04.10.2010. Beira Litoral, Arganil, Mata da Margaraça, 08.10.2010, *A. C. Tavares*, 143 (COI). Beira Litoral, Arganil, Mata da Margaraça, 20.08.2011, *A. C. Tavares*, 144 (COI). Beira Litoral, Serra do Açor, Colcurinho, 20.08.2011, *A. C. Tavares*, 145 (COI).

3. *Daucus carota* L.***Daucus carota* L. subsp. *carota***

Localidades: Trás-os-Montes e Alto Douro, Serra da Nogueira, Rebordões, 13.07.2005, *A. C. Tavares*, s/nº (COI). Beira Litoral, Serra do Açor, Piódão, 17.07.2006, *A. C. Tavares*, 53 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Serra da Nogueira, Rebordões, 25.07.2006, *A. C. Tavares*, 60 (COI). Beira Litoral, Cantanhede, Póvoa da Lomba,

13.07.2007, *A. C. Tavares*, 72 (COI). Beira Litoral, Cantanhede, Póvoa da Lomba, 29.07.2007, *A. C. Tavares*, 76 (COI). Beira Litoral, Cantanhede, Póvoa da Lomba, 22.06.2008, *A. C. Tavares*, 99 (COI). Beira Litoral, Coimbra, 16.10.2009, *A. C. Tavares*, 122 (COI); *A. C. Tavares*, 123 (COI). Cantanhede, Póvoa da Lomba, 30.05.2010. *A. C. Tavares*, 135 (COI). Beira Litoral, Coimbra, Tentúgal, Meãs-do-Campo, 20.06.2010, *A. C. Tavares*, 137 (COI). Beira Litoral, Coimbra, Tentúgal, Meãs-do-Campo, 20.07.2010, *A. C. Tavares*, 139 (COI).

***Daucus carota* L. subsp. *gummifer* (Syme) Hook.f. & G. Martens**

Localidades: Estremadura, Farol da Nazaré, 25.05.2005, *A. C. Tavares* 2 (COI). Estremadura, Farol da Nazaré, 26.06.2005, *A. C. Tavares* 6 (COI). Estremadura, Farol da Nazaré, 24.07.2005, *A. C. Tavares*, 12 (COI). Estremadura, Nazaré, Praia do Norte, 26.06.2005, *A. C. Tavares*, 5 (COI). Estremadura, Nazaré, Praia do Norte, 24.07.2005, *A. C. Tavares*, 13 (COI). Estremadura, Nazaré, Praia do Norte, 30.07.2005, *A. C. Tavares*, 15 (COI). Beira Litoral, Figueira da Foz, Cabo Mondego, 30.07.2005, *A. C. Tavares*, 14 (COI). Beira Litoral, Figueira da Foz, Vale das Pombas-Cabo Mondego, 10.08.2005, *A. C. Tavares* 16 (COI). Estremadura, Farol da Nazaré, 21.05.2006, *A. C. Tavares*, 38 (COI). Estremadura, Farol da Nazaré, 25.06.2006, *A. C. Tavares*, 44 (COI). Estremadura, Farol da Nazaré, 22.07.2006, *A. C. Tavares*, 57 (COI). Estremadura, Nazaré, Praia do Norte, 25.06.2006, *A. C. Tavares*, 45 (COI). Estremadura, Nazaré, Praia do Norte, 22.07.2006, *A. C. Tavares*, 56 (COI). Estremadura, S. Pedro de Moel, 21.05.2006, *A. C. Tavares*, 39 (COI). Estremadura, S. Pedro de Moel, 25.06.20056, *A. C. Tavares*, 40 (COI). Estremadura, S. Pedro de Moel, 22.07.2006, *A. C. Tavares*, 55 (COI). Estremadura, Farol da Nazaré, 29.05.2010, *A. C. Tavares*, 132 (COI). Estremadura, Nazaré, Praia do Norte, 29.05.2010, *A. C. Tavares*, 133 (COI). Estremadura, S. Pedro de Moel, 29.05.2010, *A. C. Tavares*, 134 (COI). Beira Litoral, Figueira da Foz, Cabo Mondego, 25.07.2010, *A. C. Tavares*, 140 (COI).

***Daucus carota* subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas**

Localidades: Algarve, Cabo S. Vicente, 24.04.2005, *A. C. Tavares*, 1 (COI). Algarve, Cabo de S. Vicente, 30.12.2005, *A. C. Tavares*, 17 (COI). Algarve, Cabo S. Vicente, 24.04.2006, *A. C. Tavares*, 19 (COI). Algarve, Cabo S. Vicente, 18.06.2006, *A. C.*

Tavares, 43 (COI). Algarve, Cabo S. Vicente, 01.07.2006, *A. C. Tavares*, 48 (COI). Algarve, Arrifana, 25.04.2006, *A. C. Tavares*, 20 (COI). Algarve, Arrifana, 17.06.2006, *A. C. Tavares*, 42 (COI). Baixo Alentejo, Zambujeira-do-Mar, 25.04.2006, *A. C. Tavares*, 21 (COI). Baixo Alentejo, Cabo Sardão, 27.04.2006, *A. C. Tavares*, 35 (COI). Baixo Alentejo, Cabo Sardão, 17.06.2006, *A. C. Tavares*, 41 (COI). Estremadura, Cabo Carvoeiro, 20.05.2006, *A. C. Tavares*, 36 (COI). Baixo Alentejo, Cabo Sardão, 07.06.2007, *A. C. Tavares*, 62 (COI). Algarve, Arrifana, 7.06.2007, *A. C. Tavares*, 63 (COI). Algarve, Cabo S. Vicente, 07.06.2007, *A. C. Tavares*, 64 (COI). Estremadura, Cabo Carvoeiro, 10.06.2007, *A. C. Tavares*, 65 (COI), Estremadura, Cabo Carvoeiro, 23.06.2007, *A. C. Tavares*, 67 (COI). Estremadura, Cabo da Roca, 07.06.2007, *A. C. Tavares*, 62 (COI). Estremadura, Cabo da Roca, 23.06.2007, *A. C. Tavares*, 68 (COI). Estremadura, Cabo Espichel, 23.06.2007, *A. C. Tavares*, 69 (COI). Baixo Alentejo, Cabo Sardão, 27.05.2008, *A. C. Tavares*, 80 (COI). Algarve, Arrifana, 27.05.2008, *A. C. Tavares*, 82 (COI). Estremadura, Cabo Carvoeiro, 01.06.2008, *A. C. Tavares*, 88 (COI). Algarve, Cabo de S. Vicente, 27.05.2008, *A. C. Tavares*, 83 (COI). Estremadura, Cabo Espichel, 10.06.2008, *A. C. Tavares*, 97 (COI). Estremadura, Cabo da Roca, 10.06.2008, *A. C. Tavares*, 98 (COI). Algarve, Cabo S. Vicente, 14.05.2010, *A. C. Tavares*, 124 (COI). Algarve, Arrifana, 14.05.2010, *A. C. Tavares*, 125 (COI). Baixo Alentejo, Cabo Sardão, 14.05.2010, *A. C. Tavares*, 126 (COI). Estremadura, Cabo Espichel, 16.05.2010, *A. C. Tavares*, 129 (COI). Estremadura, Cabo da Roca, 16.05.2010, *A. C. Tavares*, 130 (COI). Estremadura, Cabo Carvoeiro, 16.05.2010. *A. C. Tavares*, 131 (COI). Algarve, Cabo S. Vicente, *in vitro* propagated plants, 09.06.2008, *A. C. Tavares*, 90 (COI); 09.6.2008, *A. C. Tavares*, 91 (COI); 10.6.2009, *A. C. Tavares*, 116 (COI); *A. C. Tavares*, 117 (COI).

***Daucus carota* L. subsp. *maximus* (Desf.) Ball**

Localidades: Alto Alentejo, Évora, S. Bento de Castris, Convento de Cartuxa, 14.07.2006, *A. C. Tavares*, 52 (COI). Alto Alentejo, entre Évora e Arraiolos, 14.07.2007, *A. C. Tavares*, 73 (COI). Alto Alentejo, entre Évora e Arraiolos, Cartuxa, 14.05.2010, *A. C. Tavares*, 127 (COI). Alto Alentejo, Montemo-o-Novo. 16.05.2010, *A. C. Tavares*, 128 (COI); 18.7.2010, *A. C. Tavares*, 138 (COI).

***Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffm.) Schübl. & G. Martens**

Localidades: Beira Litoral, Jardim Botânico de Coimbra, viveiros, 17.07.2008, *A. C. Tavares*, 102 (COI).

4. *Bunium macuca* Boiss. subsp. *macuca*

G. Mateo e S. López Udias (Castroviejo, Flora Iberica, X:66, 2003) indicam *estetaxon* para o Alto Alentejo (AAL). O único espécimen (ver figura) que pudemos avaliar, em Herbário COI, foi recolhido perto de Setúbal, que está na Estremadura (E) e não no AAL. Até ao momento não conhecemos referências a este táxon e apesar de muitas tentativas em trabalho de campo, não o pudemos encontrar, nem próximo Setúbal, nem na Estremadura e Alto Alentejo, nem quaisquer outras localidades.

5. *Conopodium subcarneum* (Boiss. & Reut.) Boiss.

Localidades: Trás-os-Montes e Alto Douro, Tarouca, 01.07.2008, *A. C. Tavares*, 100 (COI). Beira Alta, S. Pedro do Sul, Serra da Arada, perto da Aldeia da Pena, 29.07.2008, *A. C. Tavares*, 103 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Serra da Nogueira, Bragança, Castelo, estrada para Rebordões, 09.09.2008, *A. C. Tavares* 107 (COI).

6. *Conopodium majus* (Gouan) Loret subsp. *marizianum* (Samp.) López-Udias & Mateo

Localidades: Beira Litoral, Serra de Montemuro, 27.06.2006, *A. C. Tavares* 46 (COI). Beira litoral, Serra da Lousã, 27.06.2007, *A. C. Tavares* 70 (COI). Beira Alta, Penedono, 03.07.2007, *A. C. Tavares*, 71 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Tabuaço, Serra de Chavães, 17.05.2009, *A. C. Tavares* 114 (COI). Beira Litoral, Serra da Lousã, próximo do Trevim, 18.05.2009, *A. C. Tavares* 115 (COI).

7. *Seseli montanum* L. subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Laínz - Fig. 8.

Localidades: Trás-os-Montes e Alto Douro, Bragança, Samil, Bragança, 17.06.2005, *A. C. Tavares* 4 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Bragança, entre Carrazede e Alimonde, 13.07.2005, *A. C. Tavares* 10 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Bragança, Izeda, 13.07.2006, *A. C. Tavares* 51 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro,

Bragança, Samil, 25.07.2006, *A. C. Tavares* 58 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Bragança, Alimonde, 25.7.2006, *A. C. Tavares* 59 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Bragança, Samil, 22.06.2007, *A. C. Tavares* 66 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Bragança, Alimonde, 11.09.2007, *A. C. Tavares* 78 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Bragança, Alimonde, 09.09.2008, *A. C. Tavares* 108 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Bragança, Samil, 09.09.2008, *A. C. Tavares* 109 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Bragança, Alimonde, 10.09.2009. Bragança, Samil, 11.9.2008.

8. *Angelica major* Lag.

Localidades: Beira Alta, Serra da Estrela, perto da Fonte de Jojoba, 1.100m, 2007.2005, *A. C. Tavares*, 11 (COI). Beira Alta, Serra da Estrela, entre a Fonte Paulo Martins e Covão da Vaca, 1700m, 01.08.2006. Beira Alta, Serra da Estrela, perto da Senhora da Pedra, túnel, 16.09.2010; 01.8.2009, *A. C. Tavares*, 118 (COI). Beira Alta, Guarda, Porto da Carne, 28.07.2010.

9. *Angelica pachycarpa* Lange

Localidades: Estremadura, Ilha Berlenga, 28.06.2005, *A. C. Tavares*, 7 (COI). Estremadura, Ilha Berlenga, 20.05.2006, *A. C. Tavares*, 37 (COI). Estremadura, Ilha Berlenga, 01.06.2008, *A. C. Tavares*, 87 (COI). Estremadura, Ilha Berlenga, 23.05.2008. Estremadura, Ilha Berlenga, 29.5.2008.

10. *Ferula communis* L. subsp. *catalaunica* (Pau ex Vicioso) Sánchez-Cuxart & Bernal

Localidades: Beira Alta, Guarda, Porto da Carne, estrada para a Guarda, 01.08.2006, *A. C. Tavares*, 61 (COI). Algarve, Espargal Loulé, Espargal, perto de Boliqueime, Alte, 28.05.2008, *A. C. Tavares*, 84 (COI). Estremadura, Óbidos, próximo do castelo, 01.06.2008, *A. C. Tavares*, 89 (COI); 29.6.2008.

11. *Ferulago capillaris* (Link ex Spreng.) Cout.

Localidades: Beira Alta, Porto da Carne, Celorico da Beira, 13.07.2005, *A. C. Tavares*, 9 (COI). Beira Alta, Celorico da Beira, 550m, 01.08.2006. Minho, Serra do Gerês, rio Homem, lado a lado com plantas de *Laserpitium*, 30.09.2007. Beira Alta,

Guarda, Porto da Carne, estrada para a Guarda, 16.09.2008, *A. C. Tavares*, 111 (COI). Beira Alta, Guarda, Porto da Carne, estrada para a Guarda, 01.08.2008, *A. C. Tavares*, 119 (COI). Minho, Gerês, Mata da Albergaria, leito seco do rio Homem, 16.09.2009, *A. C. Tavares*, 121 (COI). Beira Alta, Porto da Carne, Guarda, 28.07.2010.

12. *Distichoselinum tenuifolium* (Lag.) García-Martín & Silvestre

Localidades: Algarve, Lagos, EN 125, entre Bensafrim e Burgau, 01.7.2006, *A. C. Tavares*, 49 (COI). Algarve, Moncarapacho, Monte de S. Miguel, to Faro, km 2, 02.7.2006, *A. C. Tavares*, 50 (COI). Moncarapacho, Monte de S. Miguel, 11.8.2007. Moncarapacho, 29.5.2008, *A. C. Tavares*, 86 (COI); 09.6.2008, *A. C. Tavares*, 96 (COI). Lagos, Burgau, Alma Verde, EN 125, entre Bensafrim e Burgau, 09.6.2008, *A. C. Tavares*, 94 (COI); 10.8.2008, *A. C. Tavares*, 106 (COI). Olhão-Faro, Moncarapacho, 09.8.2009. Olhão-Faro, Moncarapacho, 11.8.2010.

13. *Laserpitium eliasii* Sennen & Pau subsp. *thalictrifolium* (Samp.) P. Monts.

Localidades: Minho, Serra do Gerês, entre Ribeira de Monção e Portela do Homem, caminho lateral do rio Homem, 720-740m, 26.07.2007, *A. C. Tavares*, 75 (COI). Minho, Gerês, Mata da Albergaria, leito seco do rio Homem, 30.09.2007, *A. C. Tavares*, 79 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Bragança, Capela de S. Lourenço, 09.09.2008, *A. C. Tavares*, 110 (COI). Minho, Gerês, Mata da Albergaria, leito seco do rio Homem, 16.09.2009, *A. C. Tavares*, 120 (COI).

14. *Thapsia minor* Hoffmanns. & Link - Fig. 15

Localidades: Beira Alta, Armamar, Vale de Tarouca, 825m, 27.06.2006, *A. C. Tavares*, 47 (COI). Beira litoral, Piódão, 17.07.2006. Tarouca, Pena, São Macário, 01.07.2008, *A. C. Tavares*, 101 (COI). Beira Litoral, Tarouca, Queimada, Capela de S. Lourenço, 29.07.2008, *A. C. Tavares*, 104 (COI). Trás-os-Montes e Alto Douro, Armamar, capela de S. Lourenço, Queimadela, 01.07.2010, *A. C. Tavares*, 141 (COI). Beira Litoral, Vila Nova-de-Poiães, Mucelão, rua do Carvalhal, próximo de S. Miguel de Poiães, 335 m, 01.07.2010, *A. C. Tavares*, 142 (COI).

Anexo II – Espécimes de subespécies de *Daucus carota* analisadas para o estudo dos frutos

Daucus carota subsp. *carota*. Portugal: Vale das Pombas, Figueira da Foz, 2005, Tavares 16. Portugal: Meãs do Campo, 2010, Tavares 139. Portugal: Póvoa da Lomba, 2011, Tavares s.n. (4 espécimes). Portugal: Meãs do Campo, 2011, Tavares s.n. (4 espécimens).

Daucus carota subsp. *gummifer*. Portugal: Praia do Norte, 2005, Tavares s.n.; 2006, Tavares 56. Portugal: Nazaré, 2005, Tavares 12 (3 espécimes); 2006, Tavares 44, Tavares 57. Portugal: S. Pedro de Moel, 2005 Tavares s.n.; 2006, Tavares 55. Portugal: Vale das Pombas, Figueira da Foz, 2005, Tavares s.n.

Daucus carota subsp. *halophilus*. Portugal: S. Vicente, 2006, Tavares 43; 2007, Tavares 64; 2008, Tavares 91; 2010, Tavares 124 (2 espécimes). Portugal: Cabo Sardão, 2006, Tavares 41. Portugal: Arrifana, 2007, Tavares 63. Portugal: Cabo da Roca, 2007, Tavares 68. Portugal: Espichel, 2007, Tavares 69.

Daucus carota subsp. *maximus*. Portugal: Cartuxa, 2006, Tavares 52; 2007, Tavares 73 (2 espécimes). Portugal: Montemor-o-Novo, 2010, Tavares 138.