

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

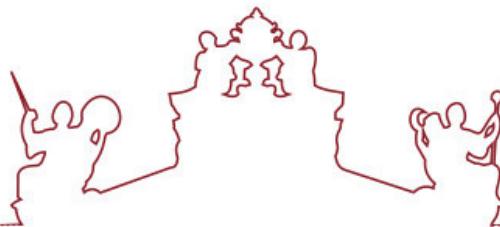
Dissertação

**Estudo do envolvimento dos fatores de transcrição
UPBEAT1 na formação de raízes adventícias em oliveira
(*Olea europaea L.*)**

Carolina Raquel Botelho Morais

Orientador(es) | Hélia Cristina Cardoso
Lénia Isabel Alfaiate Rodrigues

Évora 2024



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

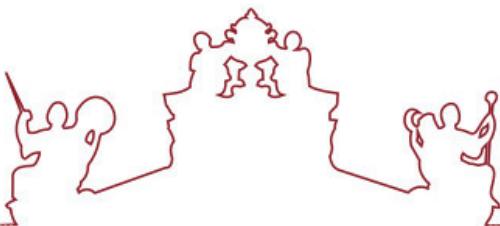
Dissertação

**Estudo do envolvimento dos fatores de transcrição
UPBEAT1 na formação de raízes adventícias em oliveira
(*Olea europaea L.*)**

Carolina Raquel Botelho Morais

Orientador(es) | Hélia Cristina Cardoso
Lénia Isabel Alfaiate Rodrigues

Évora 2024



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ana Vitória Dordio (Universidade de Évora)

Vogais | Catarina Campos (Universidade de Évora) (Arguente)
Hélia Cristina Cardoso (Universidade de Évora) (Orientador)

Évora 2024

Agradecimentos

Quero dedicar o meu sentido agradecimento à Universidade de Évora, por ter sido a minha instituição de acolhimento desde a licenciatura.

Às minhas orientadoras, Professora Hélia Cardoso e Lénia Rodrigues pela disponibilidade, dedicação, incentivo, orientação, compreensão e transmissão dos seus conhecimentos científicos muito importantes para a realização deste trabalho, assim como um agradecimento a toda a equipa do Laboratório de Biologia Molecular do Polo da Mitra da Universidade de Évora.

Quero agradecer também à assistente operacional, Felicidade Silva e à assistente operacional, Margarida Romão pelo apoio e ajuda no desenvolvimento desta dissertação.

De igual modo, agradeço também a todos os professores que me acompanharam ao longo da licenciatura e do mestrado e também a todos os que desde o início da minha vida escolar me transmitiram o seu precioso conhecimento, sempre que necessário aumentando assim o meu conhecimento e desenvolvimento pessoal.

À minha família pela ajuda, amor, compreensão demonstrado ao longo destes anos e por nunca deixarem de acreditar nos meus sonhos mesmo quando as coisas pareciam mais difíceis. Agradeço-vos pelo esforço que tem feito por mim, pela educação que me deram e por todo o apoio, até porque, sem vocês, as minhas conquistas seriam impossíveis.

Aos meus amigos e colegas por me acompanharem durante esta etapa da minha vida, agradecendo todo o suporte e amizade demonstradas.

Um muito, muito obrigado a todos.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Índice de Figuras	v
Índice de Figuras e Tabelas Suplementares	viii
Índice de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo.....	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
1.1. Taxonomia e caracterização morfológica da oliveira.....	1
1.2. Importância agronómica da oliveira	2
1.3. Propagação vegetativa da oliveira.....	3
1.4. O sistema radicular – origem e importância das raízes adventícias	6
1.5. Fatores envolvidos no processo de Enraizamento Adventício	8
1.5.1. Fatores exógenos	8
1.5.2. Fatores endógenos	10
1.6. Regulação molecular e bioquímica do enraizamento adventício	11
1.7. Fatores de transcrição (FT) – o seu papel na modulação do enraizamento adventício	11
1.8. Espécies reativas de oxigénio (ROS) enquanto moléculas sinalizadoras.....	13
1.9. O papel das peroxidases na gestão dos níveis de ROS durante o processo de enraizamento adventício.....	15
2. Objetivos	20
3. Materiais e Métodos	21
3.1. Identificação e caracterização dos genes <i>UPBEAT</i> (<i>UBP1</i>) em oliveira (<i>OeUPB1</i>)	
21	
3.2. Análise <i>in silico</i> da estrutura dos <i>OeUPB1</i> e identificação dos locais funcionais da proteína.....	22
3.3. Análise da expressão génica.....	22

3.3.1.	Estabelecimento do ensaio e preparação das amostras	22
3.3.2.	Extração de RNA e síntese de cDNA	24
3.3.3.	Análise da expressão génica por RT-qPCR (<i>Reverse Transcription quantitative - PCR</i>)	24
3.3.4.	Quantificação das Espécies Reativas de Oxigénio (ROS)	27
3.4.	Análise Proteica	27
3.4.1.	Preparação do extrato proteico.....	27
3.4.2.	Determinação da concentração proteica total.....	28
3.4.3.	Imunodetecção de proteínas - <i>Western Blot</i>	28
3.4.4.	Determinação da atividade enzimática	31
3.5.	Análise estatística.....	32
4.	Resultados e Discussão	34
4.1.	Expressão dos genes – RT-qPCR.....	38
4.2.	Quantificação de espécies reativas de oxigénio.....	48
4.3.	Estudo da expressão por <i>Western Blot</i>	51
4.4.	Atividade Enzimática da Catalase	54
5.	Conclusões e perspetivas futuras	60
6.	Tabelas e Figuras suplementares	63
7.	Bibliografia	68

Índice de Figuras

Figura 1 - Oliveira (<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i> var. <i>europaea</i> L.): (a) planta adulta; (b) folhas exibindo a página adaxial de tonalidade mais escura e a abaxial de tonalidade cinzento prateado; (c) inflorescências antes da floração; (d) frutos no final da maturação; (e) caule lenhoso (tronco)	2
Figura 2 – Multiplicação vegetativa de cultivares de oliveira por estacaria semi-lenhosa. (A) Recolha do material vegetal a partir da planta-mãe e preparação das estacas de 15-20 cm de comprimento; (B) submersão da parte basal das estacas (\pm 3cm) numa solução de IBA; (C) as estacas tratadas são colocadas em perlite; (D) estacas com formação de raízes adventícias; (E) plantas provenientes de enraizamento em estufa	4
Figura 3 - Multiplicação de microestacas de oliveira. (A) Explantes uninodais preparados para cultura <i>in vitro</i> ; (B) plântulas obtidas após 30 dias em meio de proliferação – fase de iniciação; (C) plântulas obtidas após 45-50 dias de subcultura em meio de proliferação – fase de alongamento; (D) plântula obtida após o período de alongamento utilizada para indução do enraizamento (D1: microestaca obtida da região apical da plântula) ou para propagação por cultura de segmentos uninodais (D2: segmentos uninodais obtidos da região basal preparados para novo ciclo de multiplicação); (E) microestacas inoculadas em meio de enraizamento após o tratamento com a auxina; (F) cultura dos segmentos uninodais em meio de proliferação	5
Figura 4 - Esquema representativo do processo de formação de raízes adventícias induzido em estacas. Encontram-se ilustradas as principais vias de sinalização envolvidas na indução de vias metabólicas essenciais ao processo de morfogénese, em particular associadas à síntese de carboidratos originando açúcares solúveis	8
Figura 5 - Esquema representativo da resposta celular contra as espécies reativas de oxigénio (ROS) formadas em condições de stresse. No início da reação, o anião superóxido (O_2^-) pode ser formado pela redução de um eletrão da molécula de oxigénio, sofrendo dismutação a peróxido de hidrogénio (H_2O_2) pela enzima Superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 resultante pode reagir com os iões metálicos, dando origem ao radical OH^{\cdot} . Como a SOD não é suficiente para a total eliminação do H_2O_2 , o mesmo pode ser eliminado pela catalase (CAT) ou outras peroxidases, como a ascorbato peroxidase (APX) ou a glutationa peroxidase (GPX), através da sua redução em H_2O	17
Figura 6 – Procedimento realizado na maceração das amostras vegetais de caule de cv. ‘Galega vulgar’	23

Figura 7 – Imagem representativa das etapas envolvidas na técnica do Western blot: (1) preparação de amostras, (2) SDS-PAGE, (3) transferência de proteínas, (4) bloqueio, (5) incubação com o anticorpo primário e (6) secundário e (7) revelação da membrana	31
Figura 8 - Dendrograma resultante da análise das cinco sequências identificadas como OeUPB1 utilizando o software MEGA v.11 (Tamura et al., 2021) após alinhamento das sequências pelo MUSCLE (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/) (Edgar, 2004) gerando um output no formato Pearson/FASTA. O dendrograma foi realizado segundo do método de Neighbor-Joining (NJ) (Tamura et al., 2004) e o dendrograma testado segundo o método bootstrap considerando 1000 réplicas, “number of differences” como “substitution model” e “pairwise deletion” para os “gaps/missing data”. O esquema foi criado no GSDS – Gene Structure Display Server (http://gsds.gao-lab.org/) (Hu et al., 2015). No esquema à direita está representada a estrutura do gene sendo possível verificar a ausência de intrôns	35
Figura 9 - Representação das relações filogenéticas entre as sequências deduzidas de UPBEAT1 de 17 espécies de plantas Magnoliopsida e as sequências de <i>Olea europaea</i> subsp. <i>Europaea</i> var. <i>europaea</i> . Foram incluídas 28 sequências putativas de UPBEAT1 de plantas superiores (a correspondência com números de acesso e as espécies de plantas estão incluídas na Tabela Suplementar S1). A árvore foi obtida através de uma análise Neighbor-Joining pelo método bootstrap com 1000 réplicas usando o software MEGA 7	36
Figura 10 - Alinhamento realizado entre as sequências peptídicas obtidas pela tradução in silico das sequências OeUPB1 identificadas. O alinhamento foi realizado com recurso ao software CLC GenomicsWorkbench 11.0.1. A região correspondente ao domínio bHLH (<i>Transcription factor IBH1-like</i>) está indicada a azul em cada sequência	37
Figura 11 - Heatmap mostrando a variação da expressão dos diferentes membros da família UPB1 em oliveira durante a indução do enraizamento adventício em es. A taxa de falsos positivos (FDR do inglês false discovery rate) foi utilizada para identificar genes diferencialmente expressos segundo o método General Linear Model (GLM) (teste Likelihood ratio) utilizando os tratamentos (Contolo vs. IBA) e os tempos de análise como fatores	39
Figura 12 – Expressão relativa dos genes OE6A085116 – OeUPB1a , OE6A099831 – OeUPB1b , OeAPx, OeSOD e OeCAT na base de microestacas de oliveira (<i>Olea europaea</i> L.) após tratamento com IBA (indole-3-butiric acid). As amostras foram recolhidas em diferentes momentos após tratamento com a auxina: 0h, 6h, 24h e 72h.	

As amostras controlo correspondem a amostras recolhidas de microestacas não tratadas com IBA. Os valores de expressão são relativos às 0h 44

Figura 13 – Expressão relativa dos genes OE6A085116 – **OeUPB1a**, OE6A099831 – **OeUPB1b**, OeAPx, OeSOD e OeCAT na folha de oliveira (*Olea europaea L.*) após tratamento com IBA (indole-3-butyric acid). As amostras foram recolhidas em diferentes momentos após tratamento com a auxina: 0h, 6h, 24h e 72h. As amostras controlo correspondem a amostras recolhidas de microestacas não tratadas com IBA. Os valores de expressão são relativos às 0h 47

Figura 14 - Quantificação das espécies reativas de oxigénio (ROS) em amostras da base do caule de microestacas de oliveira (*Olea europaea L.*) tratadas/não tratadas (Controlo) com IBA obtidas em diferentes tempos após a inoculação em meio de enraizamento (0h, 6h, 24h e 72h). Os dados correspondem à média ± EPM e * indica a existência de diferenças significativas entre os grupos controlo e IBA em cada tempo de análise. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos (0h, 6h, 24h e 72h) para cada grupo (controlo e IBA) 49

Figura 15 – Imagem da membrana de Western blot para a proteína Catalase (CAT) em amostras de base da microestaca de oliveira (*Olea europaea L.*). A banda correspondente à proteína CAT encontra-se delimitada a vermelho nesta imagem e tem uma massa molecular aparente de aproximadamente 59kDa. As amostras correspondentes a cada banda encontram-se identificadas na linha superior da imagem: amostras tratadas com a auxina IBA e amostras do grupo controlo (C) obtidas em diferentes tempos após a inoculação em meio de enraizamento (0h, 6h, 24h e 72h). No lado esquerdo da imagem estão representadas as massas moleculares (kDa) do marcador utilizado (NZYColour Protein Marker II, nzytech) 52

Figura 16 – Expressão da proteína Catalase (CAT) em amostras da base do caule de microestacas de oliveira (*Olea europaea L.*) tratadas/não tratadas (Controlo) com IBA obtidas em diferentes tempos após a inoculação em meio de enraizamento (0h, 6h, 24h e 72h). Os dados correspondem à média ± EPM e * indica a existência de diferenças significativas entre os grupos controlo e IBA em cada tempo de análise. A densidade ótica foi obtida usando uma análise densitométrica. Estes valores compreendem a correção para o background, a qual foi aplicada para cada banda através da normalização de uma região adjacente da membrana 54

Figura 17 – Atividade enzimática da Catalase (CAT) da base do caule de microestacas de oliveira (*Olea europaea L.*) tratadas/não tratadas (Controlo) com IBA obtidas em diferentes tempos após a inoculação em meio de enraizamento (0h, 6h, 24h e 72h). Os dados correspondem à média ± EPM e * indica a existência de diferenças significativas

entre os grupos controlo e IBA em cada tempo de análise. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes <i>timepoints</i>	56
--	----

Índice de Figuras e Tabelas Suplementares

Figura A1 – Curvas de dissociação (<i>melting</i>) obtidas na análise da expressão dos genes OE6A085116 – OeUPB1a , OE6A099831 – OeUPB1b , OeAPx, OeSOD e OeCAT por RT-qPCR em amostras retiradas da base de microestacas de oliveira durante o processo de enraizamento adventício	63
Figura A2 – Curvas de dissociação (<i>melting</i>) obtidas na análise da expressão dos genes OE6A085116 – OeUPB1a , OE6A099831 – OeUPB1b , OeAPx, OeSOD e OeCAT , por RT-qPCR em amostras de folha de oliveira durante o processo de enraizamento adventício	64
Figura A3 – Representação gráfica da curva de reação da Atividade enzimática CAT	65
Figura A4 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de proteína da CAT construída a partir da leitura de soluções padrão de BSA (0-500µg/mL)	65
Tabela S1 - Correspondência com números de acesso e as espécies de plantas Magnoliopsidas	66

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais espécies reativas de oxigénio (ROS) envolvidas no stress oxidativo em espécies vegetais e sua caracterização: radicais [radicais superóxido ($\text{O}^{\cdot-2}$) e hidroxilo (OH^{\cdot})] e não radicais [singleto de oxigénio ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2)]	14
Tabela 2 - Enzimas oxidativas envolvidas na eliminação de ROS em espécies vegetais	19
Tabela 3 - Informação relativa aos genes considerados para análise. Para normalização dos dados de expressão dos genes de interesse são referidos os genes de referência utilizados nas amostras da base (R-B) e nas amostras da folha (R-F)	25
Tabela 4 - Informação relativa aos primers utilizados para análise da expressão dos genes da família <i>OeUPB</i> e dos genes que codificam para enzimas envolvidas na homeostase das ROS (<i>OeCAT</i> , <i>OeSOD</i> e <i>OeAPx</i>). Para normalização dos dados de expressão dos genes de interesse são referidos os genes de referência utilizados nas amostras da base (R-B) e nas amostras da folha (R-F)	26
Tabela 5 - Genes <i>UPB1s</i> identificados no genoma de <i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i> var. <i>europaea</i> utilizando como <i>query</i> os genes de <i>A. thaliana</i>	34
Tabela 6 - Características das proteínas codificadas pelos genes <i>OeUPB</i> (*at pH 7.0; N: núcleo; M: mitocôndria; MW: peso molecular; Ip: ponto isoelétrico; Hydrof: hidrofóbico)	38
Tabela 7 - Matriz de similaridade (<i>Sequence Identity Matrix</i>) obtida no software Bioedit mostrando o nível de semelhança entre as cinco sequências de <i>O. europaea</i> identificadas como pertencentes à família UPB1	38

Lista de Abreviaturas

- OH - Radical Hidroxilo
¹O₂ – Singlet de Oxigénio
aa – Aminoácidos
APS – Persulfato de Amónio
APX – Ascorbato Peroxidase
ARs – Raízes Adventícias
bHLH – Domínio Básico Hélice-Loop-Hélice
BSA - Albumina do Soro Bovino (*Bovine Serum Albumin*)
CAT – Catalase
cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar
COI - Conselho Oleícola Internacional
Cu/Zn-SOD – Isoenzima SOD Cofator de Cobre e Zinco
DCFDA - Corante Fluorogénico 2',7'-dichlorofluorescein diacetate
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DOP – Denominação de Origem Protegida
DTT – Ditiotreitol
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
Fe – Ferro
Fe-SOD – Isoenzima SOD cofator de ferro
GPX – Glutationa Peroxidase
GR – Glutationa Redutase
H₂O - Água
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio
HLH – Região Hélice-Loop-Hélice
IAA - Ácido Indole-3-Acético
IAAox – IAA oxidase
IBA - Ácido Indole-3-Butírico (Indole-3-butyric Acid)
LRs – Raízes Laterais
Mn-SOD – Isoenzima SOD Cofator de Manganês
NCBI - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
O₂·⁻ - Radical Superóxido
PVDF - Difluoreto de Polivilideno
PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
POD – Guaiacol-Peroxidase

POX – Peroxidases Vegetais

PPO – Polifenol Oxidase

RFU – Unidades relativas de Fluorescência (Relative Fluorescence Units)

RNA – Ácido Ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SOD – Superóxido Dismutase

TEMED – N,N,N',N' tetrametilelenodiamina

TFs – Fatores de Transcrição

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

Resumo

A oliveira (*Olea europaea L.*) é uma espécie propagada recorrendo a protocolos de propagação vegetativa em que a formação de raízes adventícias se apresenta como fator determinante. A existência de um comportamento recalcitrante ao estímulo do enraizamento adventício em cultivares de elevado interesse agronómico justifica o interesse na identificação dos mecanismos moleculares associados à eficiência deste processo morfogénico. Foi objetivo do presente trabalho explorar o envolvimento dos fatores de transcrição UPB1 no enraizamento adventício. Os resultados obtidos revelam um potencial envolvimento dos membros UPB1a e UPB1b na regulação do enraizamento adventício através da regulação da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na homeostase das espécies reativas de oxigénio (ROS). O presente trabalho apresenta-se como um importante contributo na identificação dos mecanismos moleculares que poderão futuramente ser manipulados no sentido de ultrapassar a dificuldade de enraizamento em cultivares recalcitrantes.

Palavras-chave: *Olea europaea L.*; enraizamento adventício; stress oxidativo; fatores de transcrição; peroxidases

Abstract

Study of the involvement of *UPBEAT1* transcription factors in the formation of adventitious roots in olive (*Olea europaea* L.)

Olive tree (*Olea europaea* L.) is a plant species vegetatively propagated through protocols in which the formation of adventitious roots is a determining factor. The existence of recalcitrant behavior towards the stimulation of adventitious rooting (AR) in cultivars with high agronomic interest justifies the attention given to the identification of the molecular mechanisms involved in the efficiency of this morphogenic process. The objective of the present research was to explore the involvement of UPB1 transcription factors in the process of AR. The results obtained reveal a potential involvement of UPB1a and UPB1b members in the regulation of AR through the regulation of the expression of genes encoding enzymes involved in the homeostasis of reactive oxygen species (ROS). The present research represents an important contribution to the identification of the molecular mechanisms that could be manipulated aiming to overcome the difficulty of adventitious root formation in recalcitrant cultivars.

Keywords: *Olea europaea* L.; adventitious rooting; oxidative stress; transcription factors; peroxidases

1. Introdução

1.1. Taxonomia e caracterização morfológica da oliveira

A espécie *Olea europaea* L. pertence à ordem *Oleales*, classe *Magnoliopsida* (Dicotyledoneae), família *Oleaceae* e género *Olea* (Bacelar et al., 2009) e integra seis subespécies, três delas com representação na Europa (Guerrero et al., 2016). A *O. europaea* subsp. *europaea* L., característica dos países da Bacia do Mediterrâneo, (com duas variedades, a var. *europaea* que engloba todas as cultivares de interesse agronómico e a var. *sylvestris* que constitui o ancestral selvagem da qual terá evoluído a var. *europaea*), a subsp. *Guanchica*, localizada nas Ilhas Canárias e a subsp. *Cerasiformis*, característica do arquipélago da Madeira. As outras três subespécies estão restritas a Marrocos (subsp. *maroccana*), ao sul de África, sul do Egito, Arábia e sudoeste da China (subsp. *cuspidata*), Argélia, Sudão e Nigéria (subsp. *laperrinei*) (Ali et al., 2014; Guerrero et al., 2016).

A *O. europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* integra a nível mundial cerca de 2000 cultivares, das quais apenas 139 apresentam interesse agronómico sendo utilizadas para produção de azeite e azeitona de mesa (Fanelli et al., 2022). Em Portugal integram o Catálogo Nacional de Variedades 65 cultivares tradicionais (DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária, 2023).

A oliveira (Figura 1a) é uma planta lenhosa de porte arbóreo, com uma altura que varia entre 4 a 8 metros, podendo as árvores mais velhas atingir 15 metros. A folhagem da oliveira é do tipo perene, com duração de 1 a 3 anos. A forma e a dimensão das folhas (Figura 1b) varia muito com a cultivar, podendo a forma ser oval ou elíptica, e as dimensões variar de 4 a 10 cm de comprimento e de 1 a 3 cm de largura (Bacelar et al., 2009; Hussain et al., 2021). Sendo uma espécie xerofítica, as suas folhas apresentam características morfológicas que permitem controlar as perdas de água, nomeadamente a presença de estomas pequenos e densos, localizados apenas na página abaxial, protegidos por tricomas peltados que conferem uma cor cinzento prateado permitindo refletir a luz solar e reduzir a transpiração. A página adaxial, de tom verde-escuro, apresenta uma cutícula espessa e brilhante (Bacelar et al., 2009).

O fruto da oliveira, a azeitona (Figura 1d), é uma drupa ovóide composta por três estruturas principais: o exocarpo (epiderme ou película) membranoso com estomas, o mesocarpo (polpa) caracterizado pela acumulação de ácidos gordos, e o endocarpo (caroço que reveste a semente) muito espesso (~ 2 a 3 cm) e lenhificado.

O caule de uma planta adulta (Figura 1e) apresenta um crescimento secundário caracterizado por um diâmetro que pode atingir os 200 cm nos troncos mais velhos. As características morfológicas e fisiológicas da árvore e do fruto variam de acordo com a cultivar (States Department of Agriculture, 2008).

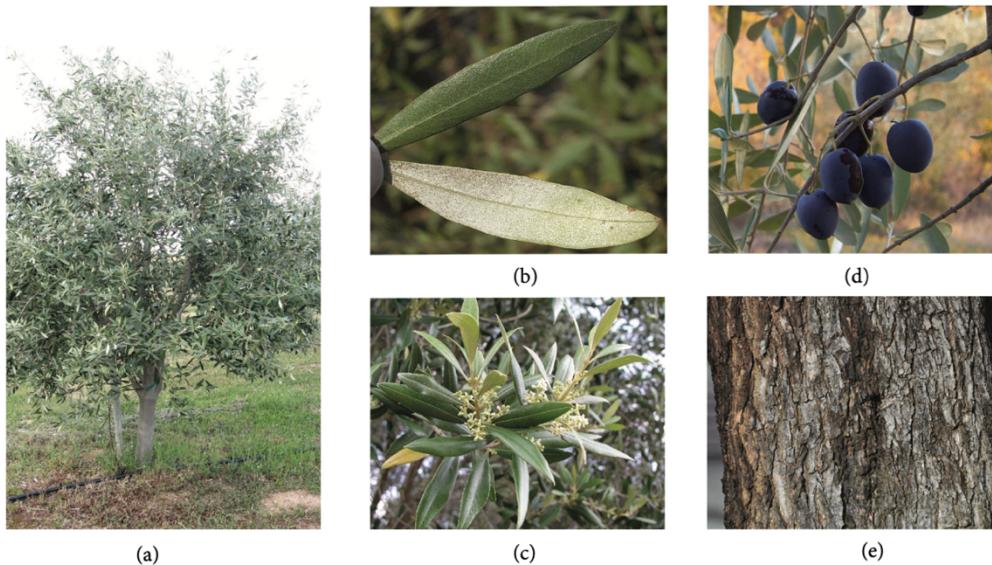


Figura 1 - Oliveira (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* L.): (a) planta adulta; (b) folhas exibindo a página adaxial de tonalidade mais escura e a abaxial de tonalidade cinzento prateado; (c) inflorescências antes da floração; (d) frutos no final da maturação; (e) caule lenhoso (tronco) (Adaptado de Hashmi et al., 2015).

1.2. Importância agronómica da oliveira

A oliveira (*Olea europaea* *europaea* subsp. *europaea* L.) é considerada uma das espécies fruteiras de maior importância agronómica a nível mundial, devido, em particular, à sua utilização para a produção de azeite (Porfírio et al., 2016). O consumo de azeite tem sido crescente nos últimos anos, em particular devido à identificação das suas propriedades medicinais, como a sua atividade anti-inflamatória, atividade antimicrobiana e atividade hepatoprotetora (Bilal et al., 2021).

A cultura da oliveira, datada de períodos anteriores a 4800 a.C., encontrou-se durante muitos séculos restrita a países da região da Bacia do Mediterrâneo (Fraga et al., 2021). Atualmente esta cultura apresenta uma expressão mundial sendo cultivada inclusivamente em países fora da Bacia do Mediterrâneo, como a Austrália, a China, a Índia e a América do Sul (Torres et al., 2017). Apesar desta distribuição mundial, ainda é nos países da Bacia do Mediterrâneo que esta cultura apresenta maior relevância

(Hedayati et al., 2015), sendo a Espanha, a Itália e a Grécia os países que registam valores de produção mais elevados (Fraga et al., 2021).

Em Portugal, a área de olival corresponde a 374762 ha sendo grande parte ainda ocupada por olivais tradicionais, caracterizados pela presença de diversas cultivares tradicionais portuguesas responsáveis pela tipicidade dos azeites produzidos, característicos de cada região geográfica e protegidos com o selo de Denominação de Origem Protegida (DOP). Em Portugal existem 8 regiões DOP, 6 associadas à produção de azeite e 2 à azeitona de mesa (Albuquerque et al., 2019). Das cultivares tradicionais portuguesas, registadas no Catálogo Nacional de Variedades (DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária, 2023), apenas um número reduzido tem expressão na produção de azeite integrando a composição dos azeites DOP. Destas destacam-se a ‘Cobrançosa’, a ‘Cordovil de Serpa’, a ‘Galega vulgar’, a ‘Verdeal de Serpa’, a ‘Azeiteira’ e a ‘Blaqueta’.

A cv. ‘Galega vulgar’ é a cultivar com maior representatividade a nível nacional estando presente na composição de 5 azeites DOP (Rodrigues et al., 2023). Apesar do elevado interesse que apresenta do ponto de vista da elevada estabilidade e qualidade regular do azeite produzido, esta variedade apresenta alguns problemas graves do ponto de vista agronómico, como a suscetibilidade a algumas doenças (Materatski et al., 2018) e as baixas taxas de enraizamento que comprometem diretamente o sucesso da multiplicação vegetativa (Cardoso et al., 2022; Santos Macedo et al., 2012; Velada et al., 2018) e consequente disponibilização de material vegetal.

1.3. Propagação vegetativa da oliveira

A oliveira é propagada de forma vegetativa, processo que permite a obtenção de plantas geneticamente idênticas, sendo por isso aplicado à multiplicação de genótipos de elite, incluindo cultivares e clones (Pop et al., 2011).

O processo convencional, ou seja, o comumente utilizado ao nível viveirista é a multiplicação por estacaria semi-lenhosa (Figura 2). Este processo consiste na recolha em campo (árvores pés-mães) de ramos jovens (semi-lenhosos) que serão segmentados em estacas de aproximadamente 15-20 cm com 4 a 6 nós dependendo da cultivar, mantendo as 4 folhas apicais, (Figura 2A). Neste sistema de propagação é comumente utilizada uma auxina, o IBA (*indole-3-butyric acid*), de forma a induzir a formação do sistema radicular. A base das estacas (± 3 cm) é mergulhada numa solução de IBA ($\sim 3.000\text{-}5.000$ ppm) durante 10 a 20 segundos (Figura 2B) sendo as estacas posteriormente colocadas num substrato inerte (perlite) (Figura 2C) e posteriormente

mantidas numa estufa com uma temperatura de 24-26°C durante o dia e 15°C durante a noite, sendo importante manter a humidade relativa a aproximadamente 100% (Macedo, 2013).

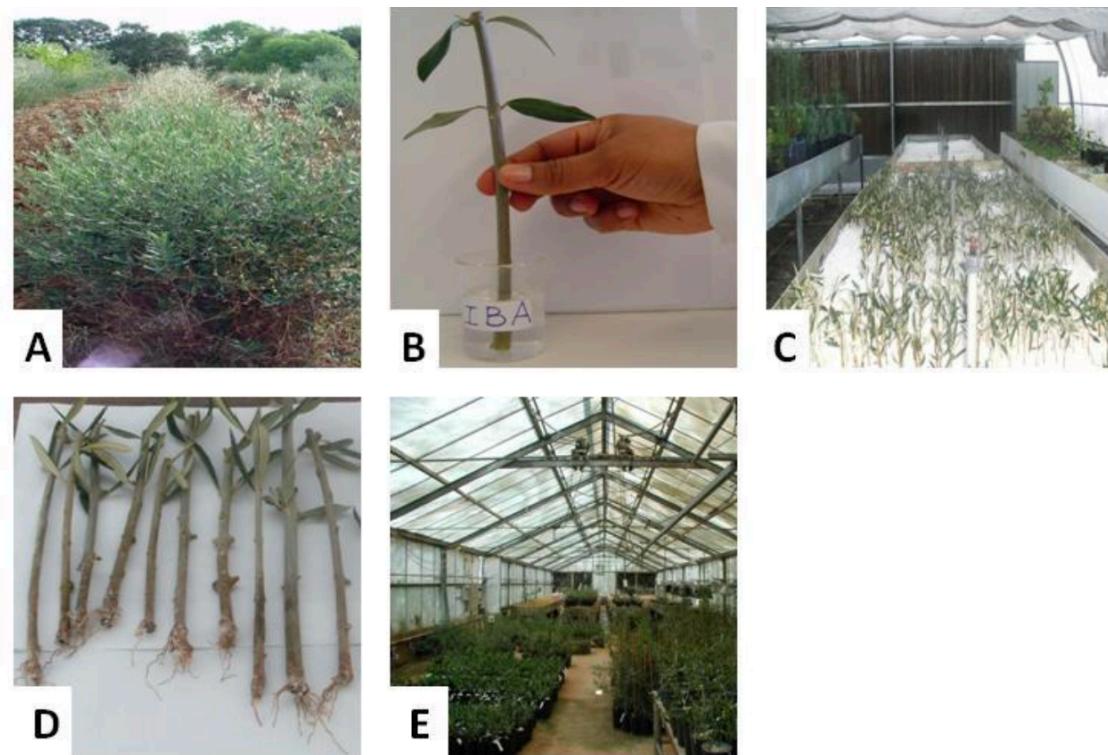


Figura 2 – Multiplicação vegetativa de cultivares de oliveira por estacaria semi-lenhosa. (A) Recolha do material vegetal a partir da planta-mãe e preparação das estacas de 15-20 cm de comprimento; (B) submersão da parte basal das estacas ($\pm 3\text{cm}$) numa solução de IBA; (C) as estacas tratadas são colocadas em perlite; (D) estacas com formação de raízes adventícias; (E) plantas provenientes de enraizamento em estufa. (Adaptado de Macedo, 2013)

No entanto, nem todas as cultivares respondem da mesma forma quando utilizado o sistema de multiplicação por estacaria semi-lenhosa e algumas cultivares tradicionais demonstram mesmo uma forte dificuldade em serem propagadas, resultado da recalcitrância na formação de raízes adventícias (Porfirio et al., 2016b). A cv. ‘Galega vulgar’, apesar do seu elevado interesse agronómico, demonstra uma elevada recalcitrância no processo de enraizamento sendo comum a obtenção de um valor inferior a 20% de estacas enraizadas quando seguido o processo convencional (Velada et al., 2018). A recalcitrância consiste assim na dificuldade/incapacidade das células vegetais responderem a um estímulo exógeno no sentido de alterarem o seu programa celular e readquirirem as características meristemáticas primárias, rediferenciando

posteriormente um novo órgão (Benson, 2000). Cultivares recalcitrantes ao enraizamento adventício são, portanto, cultivares de difícil propagação.

O estabelecimento de protocolos de propagação recorrendo a sistemas *in vitro* permitiu, para algumas cultivares, ultrapassar o problema da recalcitrância. A propagação *in vitro* por cultura de microestacas consiste na utilização de plântulas (microestaca após remoção da região basal e das folhas mais basais) obtidas *in vitro* por cultura de segmentos uninodais (segmentos de caule com apenas um nó), tratadas com uma solução de auxina, usualmente o IBA, por imersão da parte basal (protocolo descrito na Figura 3). Esta metodologia permite a propagação de cultivares/clones de elite, em número muito elevado, num curto espaço de tempo e com necessidades reduzidas em termos de espaço (Haq et al., 2021).

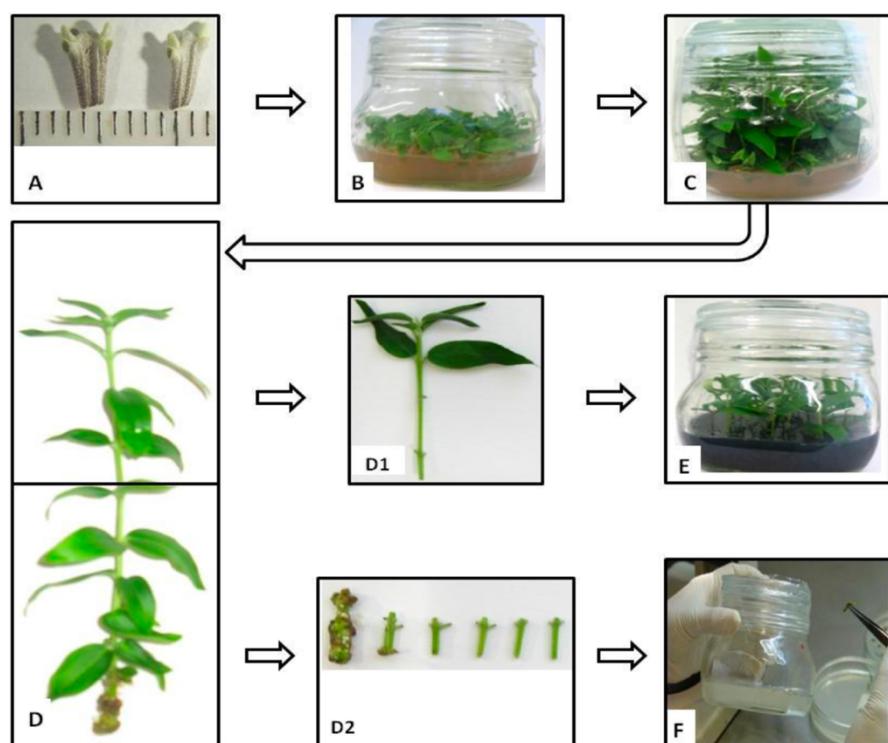


Figura 3 - Multiplicação de microestacas de oliveira. (A) Explantes uninodais preparados para cultura *in vitro*; (B) plântulas obtidas após 30 dias em meio de proliferação – fase de iniciação; (C) plântulas obtidas após 45-50 dias de subcultura em meio de proliferação – fase de alongamento; (D) plântula obtida após o período de alongamento utilizada para indução do enraizamento (D1: microestaca obtida da região apical da plântula) ou para propagação por cultura de segmentos uninodais (D2: segmentos uninodais obtidos da região basal preparados para novo ciclo de multiplicação); (E) microestacas inoculadas em meio de enraizamento após o tratamento com a auxina; (F) cultura dos segmentos uninodais em meio de proliferação. (Adaptada de Macedo, 2013)

1.4. O sistema radicular – origem e importância das raízes adventícias

O sistema radicular é um órgão fundamental na maioria das plantas terrestres, permitindo a sua fixação ao solo, a aquisição de água e nutrientes necessários para a realização da fotossíntese e o estabelecimento de simbioses com microrganismos benéficos como as microrrizas e os rizóbios. O sistema radicular difere entre as plantas quanto à sua origem e estrutura. As plantas pertencentes à classe Magnoliopsida (dicotiledóneas) apresentam um sistema radicular do tipo aprumado exibindo uma raiz principal (pivotante) de maiores dimensões. Nestas plantas o sistema radicular tem origem embrionária, diferenciando-se a partir da radícula do embrião. A oliveira, sendo uma espécie pertencente à classe Magnoliopsida, apresenta um sistema radicular do tipo aprumado, específico de um crescimento em profundidade. As plantas pertencentes à classe Liliopsida (monocotiledóneas) são caracterizadas por apresentar um sistema radicular do tipo fasciculado, com raízes de tamanho muito similar e com uma origem adventícia, ou seja, o sistema radicular diferencia-se a partir das células da base do caule (Li, 2021).

Para além de constituir o sistema radicular normal de diversas espécies, as raízes adventícias estão associadas a diversos processos biológicos, muitas vezes característicos de espécies pertencentes à classe Magnoliopsida. São exemplos o desenvolvimento de raízes adventícias associadas à reprodução assexuada característica de espécies como o morangueiro (*Fragaria spp.*) e o lúpulos (*Humulus spp.*) (Porfírio et al., 2016), o desenvolvimento de raízes adventícias em espécies adaptadas a solos alagados, como os mangais, ou ainda o seu desenvolvimento como resposta a condições de stress abiótico (nutrição mineral, luminosidade e temperatura) e bióticos (herbivoria e infecção com *Agrobacterium rhizogenes*) (Geiss et al., 2009). O desenvolvimento destas raízes pode ocorrer a partir de qualquer órgão aéreo da planta, como o caule e as folhas (Legué et al., 2014, Velada et al., 2020, Roussos, 2023).

Em espécies que se propagam de forma vegetativa, a formação de um sistema radicular adventício é determinante no sucesso da propagação. Em comparação com as raízes laterais, com origem nas raízes primária, as raízes adventícias (ARs) provêm de células diferenciadas que readquirem, durante uma fase inicial denominada de **fase de indução**, a sua competência meristemática primária. Esta fase, dependente da presença de auxinas (Macedo et al., 2013), é caracterizada por uma alteração do programa celular (reprogramação celular) que envolve a alteração do padrão de expressão de genes. Após reaquisição da competência meristemática as células iniciam uma fase de multiplicação conduzindo à formação dos meristemóides, locais onde se iniciará a diferenciação do novo órgão. Esta fase, denominada de **fase de iniciação** é

a fase onde se detetam as primeiras alterações histológicas, com o surgimento de células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso e núcleo proeminente (meristemóides). A terceira fase, **fase de expressão**, corresponde à fase em que ocorre diferenciação celular e consequente desenvolvimento do novo órgão (Cardoso et al., 2022; Li et al., 2009b).

Várias são as alterações que ocorrem ao nível molecular e bioquímico que estão na base das alterações morfológicas associadas ao processo de desdiferenciação celular e subsequente rediferenciação. A figura 4 ilustra as principais vias de sinalização envolvidas na indução de vias metabólicas essenciais ao processo de morfogénesse.

Na base da estaca (microestaca ou estaca semi-lenhosa), local onde se efetua o corte aquando da preparação da estaca e se aplica a auxina para induzir o processo de enraizamento, várias moléculas pertencentes a diferentes vias de sinalização são mobilizadas ou sintetizadas *de novo*. Destas moléculas destacam-se as espécies reativas de oxigénio (ROS), os polifenóis (antioxidantes associados à redução da degradação das auxinas utilizadas na indução do enraizamento) e o ácido jasmónico. As ROS, em particular o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO), estão associadas à ativação da fotossíntese, a via metabólica responsável pela síntese dos carboidratos, promovendo assim o aumento dos açúcares solúveis. Esses açúcares são translocados para a base da estaca onde serão utilizados como fonte de energia na elevada atividade metabólica associada à cicatrização da ferida e à subsequente formação das raízes adventícias. No entanto, se na fase de indução o aumento das ROS apresenta um papel essencial, nas fases subsequentes as células deverão ter capacidade de as reduzir a níveis basais protegendo assim a célula da oxidação. O papel das ROS enquanto moléculas sinalizadoras e das enzimas oxidativas responsáveis pelo restabelecimento da homeostase das ROS é descrito no ponto 1.8.

No processo da formação das raízes adventícias, o etileno, uma fitohormona, é biossintetizado pelas plantas em respostas ao stress, regulando o desenvolvimento e crescimento através de uma via de sinalização (Binder, 2020) difundindo-se entre as células vegetais através das membranas (Veloccia et al., 2016).

A concentração de auxina na zona de corte da estaca é, geralmente, controlada através da síntese e degradação, transporte e conjugação ou desconjugação, como mecanismos regulatórios de forma a ajustar o seu nível. Na fase da indução, para além dos níveis elevados de auxina e carboidratos, muitas outras alterações bioquímicas acontecem, como o aumento do ácido jasmónico, de alguns fenólicos, e das ROS, alterações nos níveis de reguladores de crescimento (particularmente a produção de

etileno devido à ferida) e mudanças na atividade de enzimas como as peroxidases, fenoloxidases, entre outras (Steffens & Rasmussen, 2016).

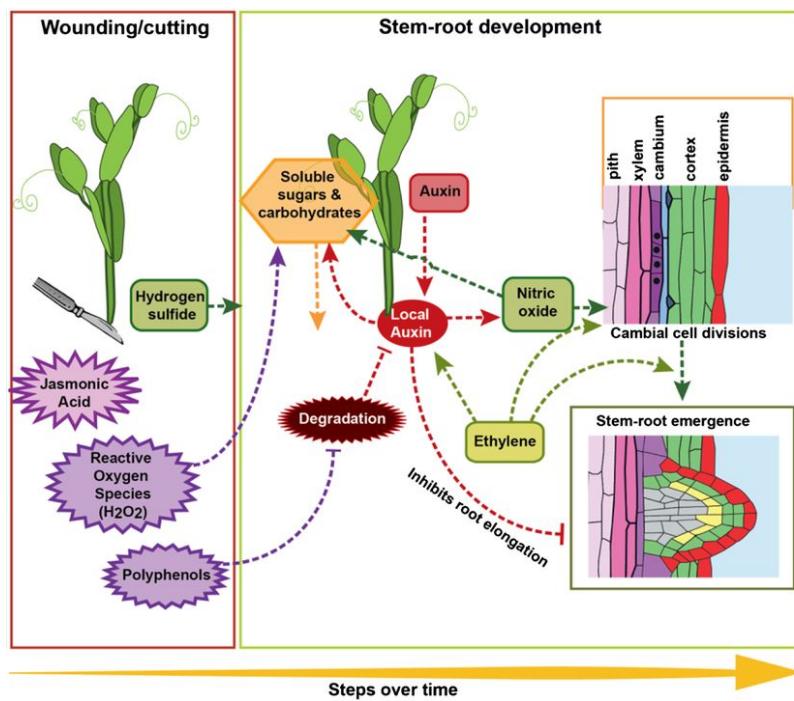


Figura 4 - Esquema representativo do processo de formação de raízes adventícias induzido em estacas. Encontram-se ilustradas as principais vias de sinalização envolvidas na indução de vias metabólicas essenciais ao processo de morfogénese, em particular associadas à síntese de carboidratos originando açúcares solúveis (Adaptada de Steffens & Rasmussen, 2016).

1.5. Fatores envolvidos no processo de Enraizamento Adventício

O enraizamento adventício é um processo biológico que depende de fatores endógenos e exógenos. Salienta-se de entre os fatores exógenos a idade das estacas, o fotoperíodo, a intensidade luminosa, a temperatura, a humidade relativa, a disponibilidade de sais minerais, de fitohormonas e de outras moléculas. Nos fatores endógenos salientam-se o estado fitossanitário, o estado de desenvolvimento e o período do ano em que são recolhidas as estacas para indução do enraizamento (Geiss et al., 2009).

1.5.1. Fatores exógenos

A idade das estacas é um dos fatores exógenos de maior relevância uma vez que o estado de desenvolvimento influencia a formação das raízes adventícias. Estacas

juvenis apresentam um elevado desempenho na formação de raízes, independentemente da estação do ano. No entanto, Therios (2009) refere a existência de uma interação entre a idade das estacas e a estação do ano ao demonstrar que estacas adultas (mais lenhificadas) enraízam melhor quando colhidas na primavera e/ou outono.

O período de luz, a sua qualidade e intensidade podem afetar a formação de raízes adventícias em espécies propagadas vegetativamente, incluindo a oliveira (Fett-Neto et al., 2001; Sorin et al., 2005; Therios, 2009). A luz é um fator determinante no processo de fotossíntese do qual depende a síntese de açúcares, essenciais à intensa atividade metabólica que decorre na formação de raízes adventícias (Kami et al., 2010).

A temperatura pode influenciar a capacidade de enraizamento contribuindo negativamente para a absorção de água e nutrientes, promovendo ou inibindo a ação enzimática e as repostas hormonais. As épocas mais apropriadas para a propagação vegetativa, por estarem associadas a taxas de enraizamento mais elevadas, são as épocas do ano com temperaturas mais elevadas. Segundo um estudo de Mancuso (1999), o nível mais elevado de enraizamento (80%) foi obtido na época da primavera-verão, ou seja, entre maio e junho, onde as temperaturas são mais elevadas, e o nível mais baixo obtido no inverno (20-30%). Contudo, temperaturas demasiado elevadas promoveram o desenvolvimento dos gomos laterais antes do desenvolvimento da raiz, conduzindo a uma taxa elevada de transpiração e consequente morte celular na base da estaca impedindo assim a formação de raízes (Almeida et al., 2017).

A humidade relativa do ar, afetada principalmente pela temperatura, apresenta um grande impacto na fotossíntese, influenciando o crescimento e desenvolvimento das plantas (Chia & Lim, 2022). No processo de enraizamento adventício a humidade é um fator importante por influenciar a taxa de transpiração. Uma elevada humidade do ar contribui para a redução das perdas de água através da transpiração e desidratação do tecido na zona de corte, favorecendo assim a formação das raízes na base da estaca (Macedo, 2013).

As auxinas são fitohormonas que afetam a divisão, o alongamento e a diferenciação celular, estando por isso associadas ao crescimento e desenvolvimento normal das plantas (Velada et al., 2020). Estas encontram-se também implicadas nos estágios iniciais da embriogénese, organização do meristema apical e ramificação da parte aérea da planta (dominância apical), formação da raiz principal, lateral e adventícia (Pop et al., 2011). No processo de enraizamento adventício as auxinas atuam de forma direta ou indireta ao interagirem com outras fitohormonas ou moléculas de outra natureza (Pop et al., 2011), induzindo a formação e o desenvolvimento das raízes (Depuydt & Hardtke,

2011). Devido ao seu papel chave na formação de raízes adventícias, as auxinas são amplamente utilizadas na propagação vegetativa de diversas espécies vegetais (Porfírio et al., 2016).

A primeira auxina a ser utilizada em protocolos para indução da formação de raízes adventícias por estacaria foi o ácido índole-3-acético (IAA) (Cooper, 1935). Identificado pela primeira vez no inicio da década 1940, o IAA foi reconhecido como a principal auxina vegetal (Ma et al., 2018). No entanto, na propagação vegetativa de diversas espécies vegetais, inclusivamente na oliveira, existe uma preferência pelo uso do ácido IBA em detrimento do IAA, devido sobretudo à sua elevada capacidade de indução e elevada estabilidade à luz (Pacurar et al., 2014).

1.5.2. Fatores endógenos

O estado fitossanitário é um dos fatores endógenos mais relevantes no sucesso do enraizamento da oliveira. São diversos os agentes patogénicos que limitam este processo biológico sendo exemplo os fungos, os vírus e as bactérias. Contudo, existem alguns microorganismos que apresentam um efeito contrário, estimulando a rizogénesis. São exemplo as ectomicorrizas, fungos que estabelecem uma relação simbiótica com as raízes de algumas plantas superiores beneficiando-se mutuamente (Charya & Garg, 2019). A inoculação das estacas com estes fungos pode estimular a formação de raízes adventícias. Vários autores reportaram a formação de ramificações radiculares em estacas e rebentos *in vitro* como resultado da inoculação com fungos micorrízicos (Fortuna et al., 1998; Karabaghli et al., 1998; Niemi et al., 2000). Uma estratégia que também tem sido reportada e que se baseia na utilização de micoorganismos é a inoculação com *Agrobacterium rhizogenes*, uma bactéria do solo gram-negativa que infeta as plantas e induz o aparecimento de raízes adventícias no local infetado (Geiss et al., 2009; Muranaka & Saito, 2010). No entanto, a sua aplicação no enraizamento adventício em oliveira não tem considerado como estratégia de interesse.

O estado de desenvolvimento do material vegetal é reportado como um dos fatores mais importantes no sucesso do enraizamento adventício. Explantes provenientes de rebentos junto à base do tronco apresentam maior capacidade de enraizamento comparativamente a explantes provenientes da copa árvore. Tal pode estar relacionado com o facto destes últimos apresentarem maior grau de diferenciação (Porlingis & Therios, 1976).

O período do ano em que o material vegetal é obtido para obter as estacas influencia igualmente o sucesso do processo de formação de raízes adventícias. A utilização de

estacas obtidas em diferentes períodos do ano está também relacionado com o sucesso do enraizamento adventício por estar associado a estados fisiológicos distintos. No período da Primavera as estacas apresentam um nível de carboidratos elevado funcionando como reservas de energia que serão utilizadas na fase de indução e desenvolvimento radicular, quando a planta ainda não dispõe da possibilidade de absorver água e nutrientes para a realização da fotossíntese (Macedo, 2013).

1.6. Regulação molecular e bioquímica do enraizamento adventício

O processo de enraizamento adventício é definido como um processo morfogénico que implica a alteração do programa celular e que culmina na formação *de novo* de um órgão. Este processo biológico envolve a ativação/silenciamento de genes que codificam proteínas com diferentes funcionalidades. A ativação desses genes implica a existência de moléculas sinalizadoras pertencentes a diferentes vias de sinalização. As ROS são moléculas formadas em diferentes compartimentos celulares que, em níveis moderados, atuam como moléculas sinalizadoras, ativando respostas rápidas face a fatores de stress. No entanto, em níveis elevados, as ROS podem causar danos celulares ou até mesmo a apoptose, devendo a célula apresentar mecanismos que a auxiliem na manutenção da homeostase, como os mecanismos associados à síntese de compostos antioxidantes ou envolvendo a atividade de enzimas oxidativas (Singh et al., 2022). A percepção destas moléculas sinalizadoras está associada, por exemplo, à ativação de genes que codificam proteínas cuja função é regular a expressão de genes alvo, sendo denominadas de fatores de transcrição (TFs do inglês *transcription factors*).

1.7. Fatores de transcrição (FT) – o seu papel na modulação do enraizamento adventício

Os TFs, característicos de organismos eucariotas, são proteínas que reconhecem elementos *cis* (sequências de 6 a 10 pb) localizados no promotor de genes alvo e que ligando-se a essas regiões permitem a associação de proteínas adicionais promovendo ou inibindo o posterior recrutamento da RNA polimerase e a subsequente transcrição do gene alvo (Castellanos et al., 2020). Os TFs são assim elementos essenciais na regulação da expressão génica (Wang et al., 2015), regulando a expressão de genes associados a uma diversidade de processos biológicos como o normal desenvolvimento (Chowdhary et al., 2023) ou a resposta a condições de stress (Sun et al., 2018).

Através da análise do genoma de *Arabidopsis* foi possível identificar 2000 genes que codificam 1500 TFs pertencentes a aproximadamente 30 famílias diferentes (Hong, 2016). O envolvimento dos FTs na modelação do enraizamento adventício foi reportada em diversos trabalhos (Legué et al., 2014). Das diferentes famílias de FTs identificadas, os bHLH aparecem envolvidos no processo de formação de raízes em associação à via de sinalização do ácido jasmónico (JA). O JA e os seus derivados, designados por jasmonatos (JAs) (Ruan et al., 2019), correspondem a um conjunto de fitohormonas importantes na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas e igualmente importante como moléculas sinalizadoras nas respostas de defesa das plantas (Mao et al., 2017; Wasternack, 2007) em resposta a stresses bióticos (pragas e doenças) e abióticos (baixas temperaturas, seca, salinidade excessiva e radiação UV) (Peñuelas et al., 2019; Verma et al., 2016; Yang et al., 2019).

Dos FTs da família bHLH, os MYCs (mielocimatose), associados à via de sinalização do JA, têm sido estudados pelo seu envolvimento no enraizamento adventício. Entre eles, o MYC2 está envolvido em diversos processos de desenvolvimento nas plantas, para além da formação de raízes adventícias está também associado à formação de raízes laterais e floração (Kazan & Manners, 2013).

Num estudo recente com *Arabidopsis*, Dob et al. (2021) observaram que a sinalização via JA dependente do MYC2 participa na homeostase das citocininas através da repressão da expressão da enzima *oxidase de citoquinina/desidrogenase1* (CKX1), o que consequentemente conduz à inibição do enraizamento adventício.

Os FTs pertencentes à família bHLH são caracterizados por apresentarem na sua sequência um domínio denominado de hélice-loop-hélice (bHLH) constituído por 60 aminoácidos (aa). Este domínio encontra-se dividido em duas regiões, uma região básica (*b*) e a região hélice-loop-hélice (*HLH*) (Li et al., 2020). A região básica, com cerca de 15 aa, localiza-se no N-terminal do domínio bHLH. Desta região fazem parte 6 aa básicos, responsáveis pela ligação ao promotor do gene alvo, comumente o motivo E-box (5'-CANNTG-3') (Sun et al., 2018, Qian et al., 2021). A região HLH, com cerca de 50 aa, localiza-se na região C-terminal e é composta por duas hélices α anfipáticas ligadas por um anel hidrofóbico, tendo como objetivo realizar a dimerização do domínio e a ocorrência de interações entre proteínas (Sun et al., 2018).

O número de genes que constituem a família bHLH varia com a espécie. Em milho (*Zea mays*) foram identificados 213 genes (Lin et al., 2014), em arroz (*Oryza sativa*) 178 e em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) 170 genes (Carretero-Paulet et al., 2010). O envolvimento de diferentes genes da família bHLH foi reportado em diversas vias de sinalização, processos morfogénicos e de desenvolvimento, como o crescimento

do meristema radicular, o desenvolvimento dos estomas e tamanho das pétalas (Li et al., 2019). Nas plantas superiores o meristema apical tem como função a multiplicação celular e a diferenciação de novos tecidos e órgãos, sendo a sua atividade regulada por FTs, incluindo membros pertencentes à família bHLH (Niu & Fu, 2022).

O envolvimento dos membros pertencentes à subfamília *UPBEAT1* (*UPB1*), TF que integram a família dos bHLH, na regulação da proliferação do meristema radicular e diferenciação de raízes laterais foi descrito em *Arabidopsis*. Tsukagoshi et al. (2010) relacionou o envolvimento do *UPB1* na formação de raízes laterais pela sua função de regulação das peroxidases, que por sua vez estão associadas à homeostase das ROS, em particular o peróxido de hidrogénio e o superóxido. O *UPB1* foi assim considerado um regulador da proliferação das células do meristema apical radicular mediando o equilíbrio das ROS (Li et al., 2019). No trabalho descrito por Tsukagoshi et al. (2010) a interrupção da atividade do *UPB1* provocou a alteração do equilíbrio das ROS, levando a um atraso no início da diferenciação das raízes laterais.

Apesar de descrita a função do *UPB1* no processo de organogénesis associado à formação de raízes laterais, não se conhece nenhum trabalho que relate este TF com o processo de formação de raízes adventícias nem a sua relação com a homeostase das ROS durante este processo.

1.8. Espécies reativas de oxigénio (ROS) enquanto moléculas sinalizadoras

Os ROS são subprodutos resultantes do metabolismo aeróbico que, em condições fisiológicas normais, são produzidas e acumuladas em diferentes compartimentos celulares como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas (Apel & Hirt, 2004). Estas moléculas desempenham um papel essencial em diversos processos biológicos das plantas, como o crescimento, a diferenciação celular, a fotossíntese e a senescência, assim como na sinalização e resposta a diferentes condições de stress (Tyagi et al., 2022). Os níveis de ROS nos diferentes compartimentos celulares é determinado pela interação entre múltiplos mecanismos de produção e eliminação. O processo de produção de ROS como subprodutos resultantes do metabolismo aeróbico, juntamente com a eliminação dos mesmos por mecanismos celulares antioxidantes, ocorre constantemente nas células para prevenir potenciais efeitos tóxicos, nomeadamente danos oxidativos no DNA, RNA e proteínas (conhecido como stress oxidativo).

Sob condições de stress, há um desequilíbrio na homeostase celular, resultando num aumento da produção de ROS, as quais estão envolvidas em diferentes vias de

transdução de sinal essenciais para a indução de respostas de defesa. Por exemplo, as ROS produzidas em resposta a stress podem iniciar o processo de sinalização através da oxidação de proteínas, com a consequente produção de péptidos que funcionam como mensageiros secundários. Além da oxidação de proteínas, as ROS podem também iniciar a sinalização através da ativação de enzimas quinases e/ou fosfatases, ativação de genes de defesa, influxo de iões Ca^{2+} , fosforilação de proteínas, ou mesmo aumentando a síntese de hormonas vegetais como o ácido salicílico, ácido jasmónico ou etileno (Sachdev et al., 2021).

Dos diferentes tipos de ROS podem identificar-se moléculas de dois tipos, as radicais e as não radicais. As ROS radicais são moléculas muito instáveis que possuem um ou mais eletrões desemparelhados. Neste grupo destacam-se os radicais superóxido ($\text{O}^{\cdot-2}$) e hidroxilo (OH^{\cdot}). Nas ROS não radicais destacam-se o singuleto de oxigénio (${}^1\text{O}_2$) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2). O H_2O_2 , produzido nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas, e o $\text{O}^{\cdot-2}$, produzido principalmente nos cloroplastos e mitocôndrias, são espécies com baixa reatividade e que se formam em condições metabólicas normais. Por outro lado, o ${}^1\text{O}_2$, produzido nos cloroplastos e com capacidade para oxidar lípidos, proteínas e resíduos de DNA, e o OH^{\cdot} , produzido principalmente nos cloroplastos e mitocôndrias, são espécies muito reativas que se formam em condições de stresse (Das & Roychoudhury, 2014; Roussos, 2023). As ROS referidas ao longo do texto, assim como a sua localização e modo de ação, encontram-se resumidas na tabela 1.

Tabela 1 - Principais espécies reativas de oxigénio (ROS) envolvidas no stress oxidativo em espécies vegetais e sua caracterização: radicais [radicais superóxido ($\text{O}^{\cdot-2}$) e hidroxilo (OH^{\cdot})] e não radicais [singuleto de oxigénio (${}^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2)] (Adaptado de Eljebbawi et al., 2021).

ROS	Modo de ação	Local de produção	Sistema de defesa
Superóxido ($\text{O}^{\cdot-2}$)	Reage com a proteína Fe-S e ocorre a dismutação para H_2O_2	cloroplastos, mitocôndria, peroxissomas, cadeia de transporte de eletrões	SOD, flavonóides, ascorbato
Radical hidroxilo (OH^{\cdot})	Extremamente reativo com todas as biomoléculas, incluindo o DNA, RNA, lípidos e proteínas.	Cloroplastos, mitocôndrias	Flavonóides, prolina, ascorbato
Peróxido de hidrogénio (H_2O_2)	Reage com proteínas, com proteínas heme e com o DNA	Peroxissomas, cloroplastos, mitocôndrias, citosol e apoplastos	Enzimas antioxidantes, ascorbato, glutationa
Singuleto de oxigénio (${}^1\text{O}_2$)	Oxidação de lípidos, proteínas e resíduos de DNA	Membranas, cloroplastos e núcleos	Carotenóides e α -tocoferol

Entre as diferentes ROS, o H₂O₂ tem sido das moléculas mais estudadas quanto ao seu envolvimento no enraizamento adventício. Li et al. (2007) descreveu um aumento significativo da capacidade de enraizamento em *Cucurbita pepo* quando aplicada uma solução de 20 – 40 µM de H₂O₂. Resultados similares foram descritos em calêndula (*Tagetes erecta L.*) e crisântemo (*Dendranthema morifolium 'Beiguozhicun'*) quando aplicada uma solução de H₂O₂ a 200 µM (Liao et al., 2010, 2011). Em *O. europaea* a utilização de H₂O₂ combinada com a adição de IBA conduziu a um aumento da percentagem de enraizamento em várias cultivares (Roussos, 2023). Resultados similares foram reportados por Santos Macedo et al. (2009), em que o tratamento de estacas semi-lenhosas com H₂O₂ (10mM), durante 14 horas, conduziu à obtenção de valores de enraizamento similares aos alcançados quando efetuado o tratamento com IBA ao longo de 20 segundos.

1.9. O papel das peroxidases na gestão dos níveis de ROS durante o processo de enraizamento adventício

O stress oxidativo, que pode ser causado por fatores bióticos ou abióticos, define-se como um desequilíbrio resultante de uma diminuição da capacidade antioxidante ou, por outro lado, por um aumento excessivo do nível intracelular de ROS, ultrapassando a capacidade da planta restabelecer os valores basais (QAMER et al., 2021). Este aumento descontrolado de ROS e acumulação dos mesmos no interior das células conduz a reações oxidativas que causam graves danos a nível celular, como a peroxidação dos lípidos, oxidação das proteínas, inibição enzimática e danos ao nível do DNA e RNA.

Em resposta ao stress oxidativo, a planta desenvolve mecanismos internos de defesa que conduzem à eliminação das ROS no interior da célula. Estes mecanismos podem ser classificados em não-enzimáticos ou enzimáticos (Das & Roychoudhury, 2014). O mecanismo não-enzimático consiste na síntese de compostos antioxidantes, como **o ascorbato, a glutatona, os carotenoides, os tocoferóis, os flavonoides e a prolina**. Estes antioxidantes têm a capacidade de se oxidar preferencialmente em vez das biomoléculas (lípidos, proteínas e DNA), protegendo-as dos efeitos nocivos dos ROS. O **ascorbato**, ou ácido ascórbico, é um dos mais abundantes compostos antioxidantes, reagindo diretamente com as moléculas $^1\text{O}_2$, H₂O₂, OH[·] e O^{·-2}. Além disso, o ascorbato participa ainda na regeneração do α-tocoferol, previne a oxidação de enzimas que contém grupos metálicos e participa nos mecanismos de proteção e regulação da fotossíntese (Noctor & Foyer, 1998).

A **glutationa** é um tripéptido de ácido glutâmico, cisteína e glicina que, na sua forma reduzida (GSH) tem um grupo tiol livre no resíduo de cisteína. Em processos de oxidação-redução a GSH atua como agente redutor, sofre oxidação e é convertida em glutationa oxidada. Elimina os compostos $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , OH^\cdot e O^{*-2} e protege as diferentes biomoléculas (Das & Roychoudhury, 2014).

A glutationa está presente em quase todos os compartimentos celulares e está envolvida em processos como a diferenciação celular, crescimento, divisão e morte celular, regulação da atividade enzimática, síntese de proteínas e nucleótidos, entre outros (Mullineaux & Rausch, 2005).

Os **carotenoides** pertencem à família dos antioxidantes lipofílicos, desenvolvendo a sua atividade antioxidant através da proteção da maquinaria fotossintética. O **α -tocoferol** pertence também à família dos antioxidantes lipofílicos, protegendo lípidos e outros constituintes da membrana dos cloroplastos através da reação com o O_2 . Os **flavonoides**, muito comuns em folhas, órgãos florais e grãos de pólen, têm um papel importante na eliminação do composto $^1\text{O}_2$. A **prolina**, um osmolito com elevado poder antioxidant, está envolvido na defesa ao stress abiótico, facilitando a retenção de água no citosol, protegendo as membranas, complexos proteicos e estruturas celulares, sendo ainda eficiente na eliminação dos compostos OH^\cdot e 1O_2 (Gajewska et al., 2006).

Do sistema enzimático fazem parte diferentes enzimas que atuam de forma direta na remoção das ROS ao utilizarem essas moléculas como substrato. As enzimas mais comuns envolvidas neste mecanismo de defesa são a **superóxido dismutase (SOD)**, a **catalase (CAT)** e as **peroxidases (POX)**, como a **guaiacol-peroxidase (POD)** e a **glutationa peroxidase (GPX)**. Deste sistema fazem ainda parte enzimas **do ciclo ascorbato-glutationa, como a ascorbato peroxidase (APX) e a glutationa redutase (GR)** (Roussos, 2023). Nas plantas, o sistema antioxidant com maior relevância envolve a ação da SOD, da APX e da CAT. Estas enzimas são de extrema importância na diminuição do impacto do stresse oxidativo (Apel & Hirt, 2004). A resposta celular baseada em mecanismos enzimáticos contra as ROS encontra-se esquematizada na figura 5.

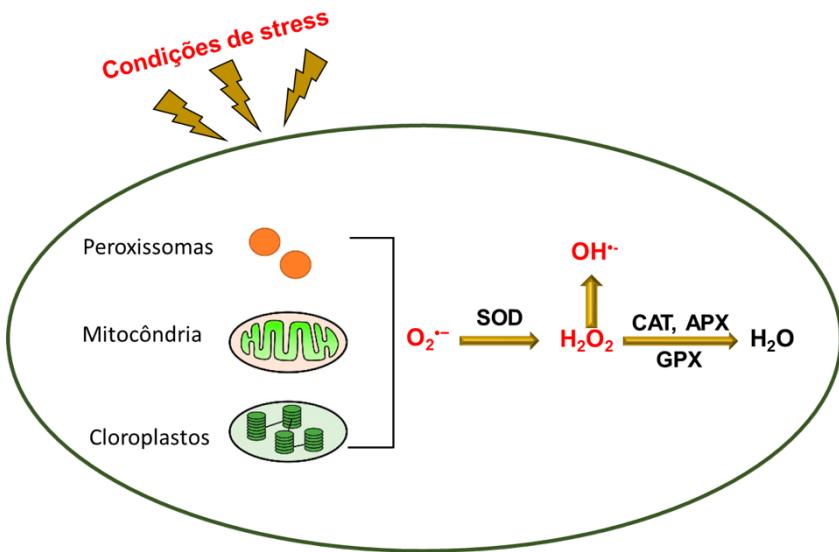
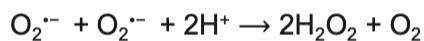


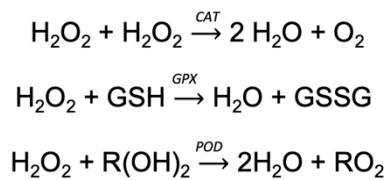
Figura 5 - Esquema representativo da resposta celular contra as espécies reativas de oxigénio (ROS) formadas em condições de stress. No início da reação, o anião superóxido ($O_2^{-\cdot}$) pode ser formado pela redução de um eletrão da molécula de oxigénio, sofrendo dismutação a peróxido de hidrogénio (H_2O_2) pela enzima Superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 resultante pode reagir com os iões metálicos, dando origem ao radical OH^{\cdot} . Como a SOD não é suficiente para a total eliminação do H_2O_2 , o mesmo pode ser eliminado pela catalase (CAT) ou outras peroxidases, como a ascorbato peroxidase (APX) ou a glutationa peroxidase (GPX), através da sua redução em H_2O (Adaptado de Chi et al., 2013).

Em situações de stress a superóxido-dismutase (**SOD**) é a primeira linha de defesa enzimática para a eliminação das ROS. A SOD pertence à família das metaloenzimas e encontra-se presente em todos os organismos aeróbios. Estas enzimas podem ser classificadas em três isoenzimas consoante a sua ligação a um ião metálico: Mn-SOD (cofator de manganés, localizada nas mitocôndrias e peroxissomas), Fe-SOD (cofator de ferro, localizado nos cloroplastos) e Cu/Zn-SOD (cofator de cobre e zinco, localizado no citosol, peroxissomas e cloroplastos) (Berwal & Ram, 2018; Das & Roychoudhury, 2014). Esta enzima catalisa a reação de eliminação do $O_2^{-\cdot}$ através da seguinte reação de dismutação:

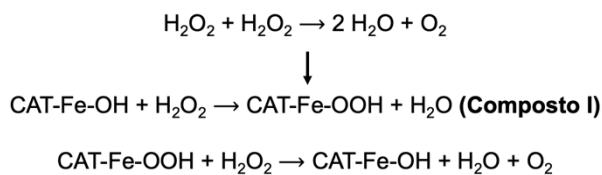


Nesta reação de dismutação as reações de oxidação e redução ocorrem no anião superóxido ($O_2^{-\cdot}$) resultando oxigénio (O_2) se o nível de oxidação for elevada, e

H_2O_2 se o nível de oxidação for mais baixa. No entanto, a dismutação do O_2^- em $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ pela SOD não é suficiente para a eliminação completa das ROS visto que o H_2O_2 resultante pode reagir com os iões metálicos, dando origem ao radical OH^{\cdot} (Y. Wang et al., 2018). Deste modo, o H_2O_2 originado pela SOD pode ser eliminado pela catalase ou outras peroxidases, como a POD ou a GPX, através da sua redução em H_2O , como representado nas seguintes equações (Rajput et al., 2021):



A catalase (**CAT**) é uma enzima tetramétrica que possui um grupo heme no seu centro ativo (Anjum et al., 2016). Esta enzima, localizada principalmente nos peroxissomas, catalisa a dismutação do H_2O_2 antes que este migre para outras partes da célula. Inicialmente, uma molécula de H_2O_2 oxida o ferro (Fe) presente no centro ativo da CAT, originando peróxido de ferro rico em oxigénio (composto I) (Anjum et al., 2016). Se os níveis de H_2O_2 forem baixos, a enzima permanece neste estado de repouso. Na presença de níveis elevados de H_2O_2 , a segunda molécula de H_2O_2 apresenta um papel de redutor, dando dois eletrões ao composto I, reconstituindo a enzima em repouso (férrica) e formando água e oxigénio (Domínguez et al., 2010; Rajput et al., 2021). Apesar de estar presente principalmente nos peroxissomas, pode também ser encontrada em menor grau na mitocôndria, citosol e cloroplastos (Sharma & Ahmad, 2014).



Como foi referido anteriormente, uma alternativa na eliminação de H_2O_2 é a via das peroxidases (**POD** e **GPX**), que apresentam ainda maior afinidade para esta molécula do que a CAT, convertendo-a em água no final. O termo peroxidase é atribuído a uma enzima que catalisa a oxirredução entre o H_2O_2 e os redutores. Estas encontram-se em animais, plantas e microrganismos sendo classificadas com base nas suas propriedades estruturais e catalíticas, dividindo-as em três superfamílias (Hiraga et al.,

2001). A terceira superfamília corresponde às peroxidases vegetais (*Plant peroxidase superfamily*), estando a mesma dividida em três classes: classe I, inclui enzimas intracelulares presentes em plantas, bactérias e leveduras, como a peroxidase Citocromo C microbiana, catalase-peroxidase bacteriana e ascorbato-peroxidase; classe II, que inclui peroxidases extracelulares presentes em fungos e peroxidases dependentes de magnésio; classe III, descritas originalmente como peroxidases (POX) e presentes exclusivamente em plantas. As POX exclusivas de plantas são glicoproteínas contendo um grupo heme, codificadas por uma grande família de genes (Yoshida et al., 2003). As enzimas oxidativas envolvidas na eliminação das ROS referidas ao longo do texto, assim como a sua localização e modo de ação, encontram-se resumidas na tabela 2.

Tabela 2 - Enzimas oxidativas envolvidas na eliminação de ROS em espécies vegetais (Adaptado de Eljebbawi et al., 2021).

Enzimas oxidativas	Localização celular	Sistema de defesa
Superóxido dismutase (SOD)	Cloroplastos, mitocôndrias, peroxissoma e citosol	Defesa contra danos oxidativos. Erradica o O_2^- produzindo O_2 e H_2O_2
Catalase (CAT)	Peroxissomas e mitocôndrias no pólen e sementes; tecidos fotossintéticos e raízes	Remove H_2O_2 transformando-o em H_2O e O_2
Ascorbato peroxidase (APX)	Cloroplastos e citosol	Remove H_2O_2 transformando-o em H_2O e O_2
Glutationa redutase (GR)	Cloroplastos, mitocôndrias e citosol	Mantém o rácio celular GSH:GSSG elevado, reduzindo a glutationa dissulfito (GSSG) em glutationa (GSH)
Guaiacol peroxidase (POD)	Mitocôndrias, citosol, vacúolo	Elimina o H_2O_2 durante o metabolismo regular ou numa situação de stress oxidativo

Vários estudos demonstraram o papel das enzimas oxidativas na formação de raízes adventícias. Um dos primeiros estudos demonstrou que o complexo PPO, POX e IAAox era ativado nos estágios iniciais do enraizamento de *Phaseolus aureus* (Frenkel & Hess, 1974). Pelo contrário Upadhyaya et al. (1986) afirmaram que as enzimas POX e PPO não estavam envolvidas na iniciação das raízes, mas sim no seu desenvolvimento. Estudos mais recentes demonstraram que a enzima POX tem um papel fundamental no processo de enraizamento, sendo que alterações na atividade

desta enzima têm sido utilizadas como marcador bioquímico do processo de enraizamento (Hatzilazarou et al., 2006; Syros et al., 2004). De um modo geral, a atividade da POX apresenta valores mínimos na fase de indução, aumentando a atividade até valores máximos no fim da fase de iniciação e início da fase de desenvolvimento das raízes adventícias (Gaspar et al., 1992). Cho et al. (2011) reportaram uma redução significativa na atividade da POX após a aplicação da auxina IBA durante a indução de raízes adventícias em *Cinnamomum kanehirae*. Também a enzima PPO pode catalisar a formação do complexo IAA-fenol, classificado por muitos autores como um cofator do enraizamento, que pode promover o desenvolvimento de raízes adventícias (Balakrishnamurthy & Rao, 1988; Bhattacharya, 1988).

Embora o envolvimento das enzimas oxidativas na formação de raízes adventícias esteja descrito na literatura, os resultados são muitas vezes contraditórios, dependendo da espécie e/ou a cultivar em estudo. Apesar dos vários estudos desenvolvidos ao longo dos últimos anos com o objetivo de aumentar o conhecimento acerca do enraizamento adventício, este processo continua a ser um problema em espécies recalcitrantes, como é o caso da oliveira (*Olea europaea*). Macedo et al. (2013) demonstrou uma diminuição da atividade da enzima POX durante a fase inicial do enraizamento após o tratamento com IBA, aumentando de forma gradual ao longo da fase de iniciação, e voltando a diminuir na fase final do enraizamento. Ainda neste estudo, a enzima PPO demonstrou uma tendência inversa, aumentando significativamente na fase final do enraizamento quando ocorre a formação de novas regiões meristemáticas.

Até ao momento, a maioria dos estudos demonstraram o papel das enzimas POX e PPO na formação de raízes adventícias em oliveira, havendo uma lacuna de informação acerca do papel de outras enzimas oxidativas no enraizamento.

2. Objetivos

Trabalhos recentes revelaram o envolvimento do fator de transcrição UPBEAT (UPB1) no controlo do crescimento radicular bem como na regulação da expressão de um conjunto de genes que codificam peroxidases, enzimas responsáveis pela homeostase das ROS ao nível do ápice radicular. Os trabalhos de Tsukagoshi e colaboradores (2010) identificaram os UPB1 como os TFs chave na distribuição das ROS ao nível do ápice radicular estabelecendo a transição entre a zona de proliferação e a zona de diferenciação. A este conhecimento foi associado o conhecimento relativo

ao papel das ROS no enraizamento adventício, moléculas chave na fase de indução do processo de formação das raízes adventícias por funcionarem como moléculas sinalizadoras das condições de stress associadas (corte da estaca/microestaca e aplicação de auxina). Níveis elevados de ROS são detetados numa fase precoce do processo de formação de raízes adventícias sendo reduzidos ao seu nível basal através de diferentes mecanismos, um deles por atividade de enzimas oxidativas.

No entanto, para além do envolvimento dos UPB1 no crescimento radicular e estabelecimento do balanço dos níveis das ROS no ápice radicular, não existe nenhuma referência quanto ao seu envolvimento no processo de formação de raízes adventícias, ainda que este processo esteja associado à via de sinalização das ROS. Perante esta lacuna no conhecimento foi colocado a hipótese abaixo.

Hipótese: Os TFs OeUPB1 estão envolvidos na fase de indução do processo de enraizamento adventício em oliveira controlando os níveis de ROS por regulação de enzimas oxidativas.

Para investigar a hipótese foram consideradas diferentes abordagens: a) análise da expressão dos genes que codificam os UPB1 e de genes que codificam enzimas oxidativas; b) quantificação das ROS; c) análise da expressão e determinação da atividade da enzima oxidativa identificada como tendo o papel predominante na fase de indução do enraizamento adventício em oliveira.

3. Materiais e Métodos

3.1. Identificação e caracterização dos genes *UPBEAT (UBP1)* em oliveira (*OeUPB1*)

Para determinar o número de genes que constituem a família *UPB1* em *O. europaea* subsp. *europaea*, foi realizada uma análise Blastn na base de dados do genoma da oliveira disponível em Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>).

Para uma primeira análise foram utilizadas as sequências *UPB1* de *Arabidopsis thaliana* e numa segunda análise foram utilizadas as sequências de oliveira previamente obtidas. Posteriormente, foi realizada uma análise Blastn na base de dados NCBI

(National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para verificar a homologia com sequências *UPBs* de *A. thaliana* ou de outras espécies.

Para classificar as sequências de *UPB1* identificadas em *O. europaea* foi realizada uma comparação entre essas sequências traduzidas *in silico* e sequências de *UPB1* de várias espécies de plantas Magnoliopsidas (ver detalhes na Tabela suplementar S1). As sequências obtidas foram alinhadas no MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) e gerado um documento Pearson/FASTA. Este documento foi utilizado para construir uma árvore filogenética utilizando o software MEGA 7 (Kumar et al., 2016) seguindo o método Neighbor-Joining (Tamura et al., 2004) com análise bootstrap: 1000 réplicas, "número de diferenças" como o modelo de substituição e "deleção par a par" para o tratamento de gaps. A árvore foi editada no software Fig Tree v14.0 (Rambaut, 2010) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3.2. Análise *in silico* da estrutura dos *OeUPB1* e identificação dos locais funcionais da proteína

Para a análise da estrutura exão-intrão os genes *OeUPB1* foram avaliados pelo GSDS – Gene Structure Display Server (<http://gsds.gao-lab.org/>) comparando a sequência genómica e a sequencia codificante. O tamanho da proteína, o peso molecular, o ponto isoelettrico e a composição de aminoácidos ácidos/básicos, hidrofóbicos e polares foram determinados utilizando o software EditSeq do Lasergene 7 (DNASTAR, Madison, WI, EUA). Para a identificação do domínio bHLH foi utilizado o software InterPro – Classification of Protein Families (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). A conservação deste domínio nas sequências de *OeUPB1* foi analisada através de um alinhamento realizado com recurso ao software CLC Main Workbench 7.5.1 (CICbio, Aarhus N, Denmark).

Para previsão da localização subcelular da proteína e identificação do peptídeo sinal foi utilizado o software WoLF PSORT – Protein Subcellular Localization Prediction (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>).

3.3. Análise da expressão génica

3.3.1. Estabelecimento do ensaio e preparação das amostras

Para o estabelecimento do ensaio foram utilizadas plântulas de cv. 'Galega vulgar' mantidas em condições *in vitro* por repicagens sucessivas seguindo o

procedimento previamente estabelecido (Peixe et al., 2007). As microestacas de aproximadamente 4 cm foram preparadas a partir destas plântulas eliminando a região mais basal e removendo as folhas da região apical mantendo apenas as 4 folhas adultas mais apicais.

As microestacas foram posteriormente tratadas com uma solução de 14,7 mM de IBA (ácido indol-3-butírico) fazendo a imersão da parte basal (aprox. 1,0 cm) por 10 segundos. De seguida as microestacas foram inoculadas em potes contendo meio de enraizamento (Velada et al., 2018). Por cada pote foram inoculadas 10 microestacas correspondentes a uma réplica biológica. As culturas foram mantidas numa câmara de crescimento com uma temperatura de 24°C/21°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) dia/noite, com um fotoperíodo de 15 h e uma intensidade luminosa de $36 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-2}$.

Em simultâneo foram inoculadas microestacas não tratadas com IBA funcionando como controlo. Para a análise da expressão génica, atividade enzimática e quantificação das ROS foram recolhidas amostras em diferentes momentos do ensaio: 0h (imediatamente antes do tratamento com IBA), 6h, 24h e 72h após o tratamento com IBA. Por cada tempo foram recolhidas as folhas e a zona basal de 10 microestacas, correspondente a uma réplica biológica de folha e de base. Por cada tempo foram consideradas 3 réplicas biológicas (cada réplica correspondeu a uma mistura do material vegetal, folhas ou base, das 10 microestacas).

As amostras vegetais recolhidas nos diferentes tempos de recolha foram maceradas com azoto líquido, usando um pilão e almofariz, com uma pressão vertical e posteriormente com movimentos circulares de forma a obter um pó fino (Figura 6). Tanto o pilão como o almofariz foram previamente esterilizados e arrefecidos antes da sua utilização. Após a sua maceração, as amostras foram armazenadas em microtubos de 2 μL e guardadas a uma temperatura de -80°C até posterior utilização.

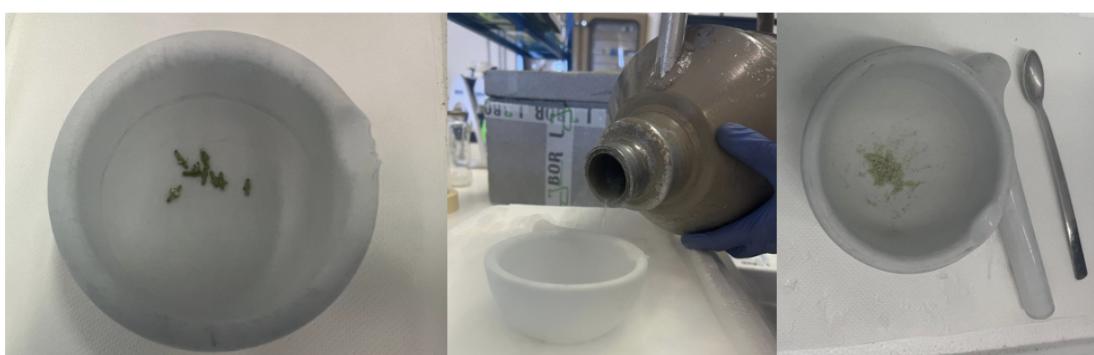


Figura 6 – Procedimento realizado na homogeneização das amostras vegetais de caule de cv. ‘Galega vulgar’.

3.3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi isolado utilizando o kit Maxwell 16 LEV simplyRNA (Promega, Madison, WI, EUA) no equipamento Maxwell 16 (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fornecedor e eluído em 30 µL de água ultrapura. O RNA total foi tratado com 1 uL de DNase de acordo com o procedimento referido pelo fabricante.

A concentração de RNA total foi determinada com recurso a um espectrofotômetro NanoDrop-2000C (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A pureza das amostras foi avaliada através dos rácios de absorvância $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, visualizando, com recurso a um sistema de imagem Gene Flash Bio (Syngene, Cambridge, Reino Unido), as duas subunidades ribossómicas (28S e 18S). Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado 1 µg de RNA total e o kit SensiFAST cDNA Synthesis kit (Bioline). O volume de reação foi ajustado a 20 uL. O cDNA obtido foi diluído de 1:10 para utilização na análise da expressão génica.

3.3.3. Análise da expressão génica por RT-qPCR (*Reverse Transcription quantitative - PCR*)

Cada reação de amplificação foi realizada para um volume total de 18 µL adicionando 1× Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, 2 µL de cDNA e 300 nM de cada um dos primers específicos para os genes alvo e para os genes de referência (Tabela 3). Os primers específicos foram desenhados no software Primer Express v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando as configurações padrão (Tabela 3).

Para o desenho de *primers* dos *OeUPB1s* as cinco sequências foram alinhadas permitindo confirmar a especificidade dos *primers* desenhados para cada gene. Para além do alinhamento, foi também realizada uma matriz de similaridade no Bioedit software que revelou um nível de similaridade próximo dos 98% para os genes OE6A085116 e OE6A055347 (Tabela 7). Este nível elevado de semelhança impossibilitou o desenho de *primers* específicos para essas duas sequências, pelo que os valores da expressão que serão apresentados nos resultados integram essas duas sequências (sequências consideradas cópias, denominadas neste trabalho como gene *OeUPB1a*).

Para a normalização dos dados de expressão das amostras da base do caule, foram considerados como genes de referência (Tabela 4) os genes Actina (*OeACT*), Histona 2B (*OeH2B*) e Ubiquitina (*OeUBQ*) (Noceda et al., 2022). Para normalização das amostras da folha foram considerados os genes *E3 ubiquitin-protein ligase SDIR1* (SDIR), *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2* (NADH) e *Ubiquitin-conjugating enzyme E2* (UBQ) (dados não publicados).

As reações decorreram num equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) segundo o programa: 10 minutos a 95 °C e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C seguido de 60 segundos a 61 °C. Para cada par de primers foram realizados controlos negativos de modo a avaliar a presença de contaminações e formação de dímeros. Para determinação da eficiência dos primers foi realizada uma curva padrão usando uma amostra não diluída representativa do ensaio (resultante da mistura de 2 µL retirados de cada amostra) com um total de seis pontos, considerando a amostra inicial mais cinco diluições seriadas. Para o cálculo da eficiência utilizou-se a expressão $E = 10^{(-1/\text{declive})}$, sendo o valor do declive dado pelo software Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Todas as amostras foram analisadas em duplicado. Para verificação da especificidade dos primers foi avaliada a curva de dissociação e a presença de um pico único correspondente à amplificação de apenas um amplicão. Os valores do ciclo de quantificação (Cq) foram adquiridos para cada amostra com o software Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e utilizados para o cálculo da quantidade relativa.

Tabela 3 - Informação relativa aos genes considerados para análise. Para normalização dos dados de expressão dos genes de interesse são referidos os genes de referência utilizados nas amostras da base (R-B) e nas amostras da folha (R-F).

	Gene	Accession	Descrição
Genes alvo	<i>OeCAT</i>	OE9A048265T2	catalase isozyme 3-like
	<i>OeSOD</i>	OE9A108938T4	superoxide dismutase [Fe], chloroplastic-like
	<i>OeAPx</i>	OE9A071780T6	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic
	<i>OeUPB1a</i>	OE6A085116	transcription factor UPBEAT1-like
	<i>OeUPB1a</i>	OE6A055347	transcription factor UPBEAT1-like
	<i>OeUPB1b</i>	OE6A099831	transcription factor UPBEAT1-like
	<i>OeUPB1c</i>	OE6A107214	transcription factor UPBEAT1-like
	<i>OeUPB1d</i>	OE6A032918	transcription factor UPBEAT1-like

R-B	<i>OeACT</i>	AF545569.1	beta-actin (act1)
	<i>OeOUB</i>	AF429430.1	polyubiquitin OUB2
	<i>OeH2B</i>	GO244518.1	histone H2B
R-F	<i>OeSDIR</i>	OE6A063006	E3 ubiquitin-protein ligase SDIR1
	<i>OeNADH</i>	OE6A059879T1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2
	<i>OeUBQ</i>	OE6A109843T1	ubiquitin-conjugating enzyme E2

Tabela 4 - Informação relativa aos primers utilizados para análise da expressão dos genes da família *OeUPB1* e dos genes que codificam para enzimas envolvidas na homeostase das ROS (*OeCAT*, *OeSOD* e *OeAPx*). Para normalização dos dados de expressão dos genes de interesse são referidos os genes de referência utilizados nas amostras da base (R-B) e nas amostras da folha (R-F).

Gene	Sequências (5' → 3')		AS	Tm (°C)	E(%)	R ²
Genes alvo	<i>OeCAT</i>	Fw: ACTGTTCTCAGGCTGACAGG Rv: CGCTCACAGCAACTGGAAAGA	112	83	B: 92 F: 97	B: 0,993 F: 0,998
	<i>OeSOD</i>	Fw: GCCGTGAATCCTCTTGCTTG Rv: GCGTGCTCCCAAACGTCTAC	62	80	B: 106 F: 94	B: 0,998 F: 0,996
	<i>OeAPx</i>	Fw: CCACACCCTGGGACGTTG Rv: CTTGTCTCCACTCAGAACGCTCC	113	82	B: 91 F: 97	B: 0,996 F: 0,999
	<i>OeUPB1a</i>	Fw: TGACGAGGAGGGAGGAGAAGA Rv: GGCGGTTGTTCTACCAATGT	78	82	B: 88 F: 107	B: 0,924 F: 0,996
	<i>OeUPB1b</i>	Fw: TCCCACAGTGAAAATGCAA Rv: CCTGGGTTTGAGGAGTACG	76	79	B: 94 F: 102	B: 0,991 F: 0,995
	<i>OeUPB1c</i>	Fw: TCCAAACTGTGAATCAATGCC Rv: GAAAATACATTGACCATAATTGC	93	--	--	--
	<i>OeUPB1d</i>	Fw: ACCCGTCGGCCCAACCGG Rv: ATCCCATTGATTCACAGTCGG	83	--	--	--
R-B	<i>OeACT</i>	Fw: TTGCTCTCGACTATGA ACAGG Rv: TATTACT ATTGGGGCCGAGAG	106	80	102	0,996
	<i>OeOUB</i>	Fw: AGGCATCCCACC AGACCAA Rv: TCGTGTGAGGCTTC GCGGT	64	85	99	0,996
	<i>OeH2B</i>	Fw: AAGCGTCTAGGCT TGCAAGGT Rv: TCTCGGGAGATTTCAGACTGC	64	80	95	0,996
R-F	<i>OeSDIR</i>	Fw: CAGGCTTCTTCTTCATGCTCATC Rv: TTTCTCCACCTGTGCAAT	66	78	104	0,922
	<i>OeNADH</i>	Fw: AAGGGTCCTTTTGCCAAAC Rv: TCTGTGTAATTCTCTCACGAATG	72	81	93	0,991

	OeUBQ	Fw: TGATGTTGCGGCTATTCTACTTC Rv: GAACATCCGAGCAGCTTCAGA	91	80	96	0,967
--	-------	--	----	----	----	-------

AS: tamanho do amplicão; Tm: temperatura de *melting* (dissociação).

3.3.4. Quantificação das Espécies Reativas de Oxigénio (ROS)

A quantificação das espécies reativas de oxigénio (ROS) foi realizada segundo o protocolo adaptado de Jambunathan (2010), através do corante fluorogénico 2',7'-*dichlorofluorescein diacetate* (DCFDA).

Foram misturadas 50 mg de material vegetal macerado com 1mL de Tris-HCl 10 mM (pH 7,2) e centrifugado a 12 000 x g durante 20 minutos a 4°C. Recolheu-se o sobrenadante para novo microtubo *eppendorf* e a 100 µL foram adicionados 900 µL de Tris-HCl (10 mM, pH 7,2). A mistura foi agitada por inversão, sendo de seguida adicionados 10µL de DCFH (1mM) de modo a obter-se uma concentração de 10µM de DCFH no volume final. Após vórtex e incubação no escuro durante 10 min, um volume de 25 µl foi pipetado para uma microplaca de 24 poços e a fluorescência emitida foi medida num termociclador PikoReal® 24 (Thermo Scientific) (programa com 2 ciclos de 15 segundos, a 25 °C), com um espetro de excitação e emissão de 495 nm e 520 nm, respetivamente.

Os níveis totais de ROS foram determinados nas amostras de folha e base nos diferentes tempos de recolha, em triplicado, e expressos em *Relative Fluorescence Units* (RFU).

3.4. Análise Proteica

3.4.1. Preparação do extrato proteico

Os extratos proteicos das amostras foram obtidos segundo o protocolo adaptado de Dias et al. (2014). A 100 mg de material vegetal previamente macerado foi adicionado 1 mL de tampão de extração [Tampão Fosfato (0,1 mM; pH 7,5), 2 mM de DTT; 0,5 mM de EDTA e 0,2% Triton X-100, 1 mM PMSF]. A mistura foi homogeneizada em vórtex durante 10 minutos e centrifugada a 10000 x g, 10 minutos a 4°C. O sobrenadante límpido foi recolhido e utilizado para quantificação da proteína total, determinação da atividade enzimática da OeCAT e análise da expressão da proteína OeCAT por *Western blot*.

3.4.2. Determinação da concentração proteica total

A quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) através da utilização do corante previamente preparado [10% (m/v) reagente Coomassie G-250; 5% etanol 95%; 10% ácido fosfórico 85%]. Este método colorimétrico utiliza o Coomassie Brilliant Blue que complexa com as proteínas originando um máximo de absorção a 595nm.

Preparou-se inicialmente uma curva de calibração com concentrações de 25, 50, 75, 150, 200 e 500 μ g/mL de albumina do soro bovino (BSA- **Bovine Serum Albumin**).

Os extratos proteicos obtidos das amostras de folha e de base foram descongelados em gelo. Uma vez que as concentrações proteicas nos extratos de amostras de base eram elevados, foram diluídos 5X com água ultrapura, enquanto nos extratos de folha não foi necessário. Nos diferentes poços da microplaca foram aplicados, em triplicado, 10 μ L de cada amostra e 10 μ L de cada solução de BSA (25, 50, 75, 150, 200 e 500 μ g/mL). Posteriormente, adicionaram-se 200 μ L do reagente de Bradford. Após uma incubação de 2-3 minutos à temperatura ambiente foram feitas as leituras de absorbância a um comprimento de onda de 590nm, num leitor de microplacas (Glomax, Promega).

Para posteriormente proceder ao cálculo da concentração para cada amostra, foi traçada, por placa, uma reta de calibração com os valores médios das absorbâncias dos padrões de BSA em função da quantidade de proteína. A concentração proteica total das amostras foi posteriormente calculada por interpolação tendo por base a equação da reta de calibração e fator de diluição se existente (5x no caso das amostras de base).

3.4.3. Imunodetecção de proteínas - *Western Blot*

A baixa concentração proteica (determinada no ponto 3.4.2) das amostras de folha e o limite máximo de volume por poço (40 μ L de amostra), inviabilizam a realização desta técnica utilizando as amostras de folha, sendo a mesma realizada apenas nas amostras de base. Com efeito, amostras de base de ambos os grupos (controlo e tratado com IBA), nos pontos de recolha 0h, 4h, 24h e 72h, foram analisados por *Western Blot* [baseado na técnica de (Towbin et al., 1979)] para identificação e análise da expressão da proteína OeCAT. Foram consideradas duas réplicas biológicas por cada ponto de recolha, sendo as mesmas testadas em triplicado.

A técnica *Western Blot* consistiu em três etapas: 1) eletroforese SDS-PAGE para separação das proteínas com base na sua massa molecular; 2) transferência das

proteínas para uma membrana e 3) marcação das proteínas alvo através do anticorpo primário e secundário específicos. As etapas envolvidas nesta técnica encontram-se representadas na figura 7. Numa fase inicial, procedeu-se à separação de 20 μ g de proteína de cada amostra por eletroforese SDS-PAGE, em géis de 12% de policrilamida. Para a realização da eletroforese SDS-PAGE foram preparados géis com 8 cm x 10 cm e 0,75 mm de espessura constituídos por um gel de resolução e um gel de concentração. O gel de resolução (12% acrilamida) consistiu em 5mL de Tris-HCl 1.5M, pH 8,8, 200 μ L de SDS, 9,45 mL de acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 5,45 mL de água bidestilada, 150 μ L de APS (*Ammonium Persulfate*) 0,1 g/mL e 10 μ L de TEMED. Esta mistura foi então colocada nas placas de vidro, sem criar bolhas, até 1 cm abaixo do topo do vidro da frente e adicionando-se água bidestilada sobre o gel de modo a evitar o contacto da mistura com o ar. Para a polimerização do gel foi necessário aguardar 30-45 min.

O gel de concentração (4% acrilamida), consistiu em 2mL de Tris-HCl 0,5M, pH 6.8, 80 μ L de SDS, 4,86mL de água bidestilada, 1,06mL de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 48 μ L de APS e 8,8 μ L de TEMED. O gel de concentração foi aplicado apenas após polimerização do gel de resolução. Imediatamente após a aplicação do gel de concentração, foram colocados os pentes para formação de 10 poços no gel de concentração.

Após a polimerização, os géis foram colocados no sistema Protean mini (Bio-Rad), onde as câmaras superiores e inferiores foram cheias com tampão de corrida (0,025M Tris, 0,192M glicina, 1% (m/v) SDS). As amostras de material vegetal foram misturadas com tampão de amostra [0,125M Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS (m/v), 5% 2-mercaptopetanol, 20% glicerol, quantidade vestigial de azul de bromofenol], aquecidas num banho seco, a 95°C, durante 5 minutos, e em seguida colocadas em gelo, seguindo-se a sua aplicação nos poços do gel, num volume correspondente a uma quantidade de proteínas de 20 μ g por poço. Num dos poços de cada um dos géis foram aplicados 3 μ L de marcador de massas moleculares (NZY Colour Protein Marker II, NZytech). A eletroforese decorreu a uma voltagem constante de 130 V até que a frente de corrida atingiu o final do gel.

Após a separação proteica procedeu-se à transferência das proteínas para uma membrana de PDVF (difluoreto de polivilideno) (Amersham™Hybond™) através do sistema Semi-Dry Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad). A membrana foi ativada em metanol a 100% antes de se iniciar a transferência, durante 5 segundos, com agitação lenta, sendo de seguida colocada em tampão de transferência [Tris-HCl 25mM, pH 8.3; glicina 192mM; metanol 20%; SDS 0,037% (m/v)]. Os géis foram retirados dos vidros de SDS-PAGE e colocados em contacto com a membrana no tampão de transferência

durante 10 minutos. De seguida foram cortadas quatro folhas de papel de filtro com o tamanho aproximado do gel de resolução, sendo os mesmos também embebidos em tampão de transferência. Para montagem do sistema de transferência retirou-se a gaveta do equipamento, abriu-se e, na parte inferior, procedeu-se à montagem da *sandwich* na seguinte ordem: dois papéis de filtro humedecidos, membrana em cima dos papéis de filtro, gel em cima da membrana e, em cima do gel, colocaram-se mais dois papéis de filtro humedecidos. No final, humedeceu-se mais um pouco a *sandwich*, adicionando-se 3 mL de tampão de transferência por cima do papel de filtro final. Todos estes componentes foram colocados de modo a evitar a formação de bolhas de ar. A transferência ocorreu a uma voltagem constante de 25 V durante 50 minutos.

De modo a evitar ligações inespecíficas do anticorpo, após a transferência a membrana foi colocada numa solução de bloqueio [5% (m/v) leite em pó em TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20)] durante 2 h, à temperatura ambiente com agitação suave.

Após o bloqueio, incubou-se a membrana com o anticorpo primário Anti-CAT (Agrisera AS09501), numa diluição de 1:1000, *overnight* a 4°C, com agitação suave. Após a incubação com o anticorpo primário, efetuaram-se três lavagens, de 15 minutos cada, com agitação suave, com uma solução de lavagem [0,5% (m/v) de leite em pó em TBS-T]. Após as lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário ligado a Fosfatase alcalina [Goat anti-Rabbit IgG antibody (Agrisera AS09 602), diluição 1:10000] durante 2 horas, com agitação suave, à temperatura ambiente. De seguida foram novamente realizadas três lavagens de 15 minutos cada, em agitação, usando a mesma solução de lavagem.

No final, a membrana foi revelada com substrato [reagente quimiofluorescente (ECF Plus *Western Blotting Detection Reagents*, GE, Healthcare)], através da sua aplicação numa placa de plástico. Colocou-se a membrana em contacto com o substrato durante alguns segundos, retirou-se o excesso de líquido e procedeu-se por fim à aquisição da imagem num transiluminador Gel-doc System (Bio-Rad). A análise das bandas foi realizada através do software Bio-Rad Image Lab 5.2.1.

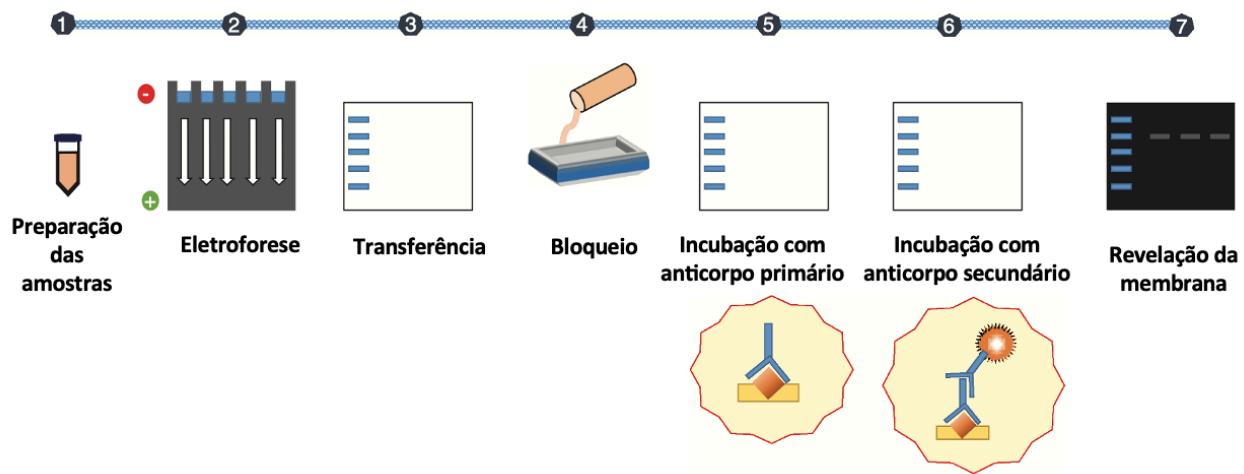
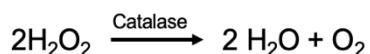


Figura 7 – Imagem representativa das etapas envolvidas na técnica do *Western blot*: (1) preparação de amostras, (2) SDS-PAGE, (3) transferência de proteínas, (4) bloqueio, (5) incubação com o anticorpo primário e (6) secundário e (7) revelação da membrana (Adaptado de Begum *et al.*, 2022).

3.4.4. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da OeCAT (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada nas amostras do grupo controlo e do grupo tratado com IBA nos diferentes tempos de recolha (0h, 6h, 24h, 72h). A atividade enzimática de cada amostra foi realizada em duplicado.

O protocolo para a determinação da atividade da OeCAT foi adaptado de Salvador (2014). A determinação da velocidade inicial foi obtida a partir da taxa de diminuição da absorvância resultante da decomposição de H_2O_2 , sendo a quantidade de enzima proporcional à diminuição de absorvância, de acordo com a seguinte equação:



Para determinação da atividade enzimática foram misturados 75 μL do extrato proteico com 915 μL de tampão fosfato (50 mM; pH 7,4), seguido de uma incubação à temperatura ambiente durante três minutos. Ao meio reacional referido foram adicionados 50 μL de H_2O_2 a 3%, seguindo-se a leitura da absorvância num espetrofotômetro (UV-1600PC Spectrophotometer, VWR) a um comprimento de onda de 240 nm, durante 10 minutos.

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a decomposição de $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ de H_2O_2 a 25°C , usando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do H_2O_2 a 240 nm de $0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Nelson & Kiesow, 1972). Os resultados da atividade enzimática da OeCAT foram expressos em U mg^{-1} proteína.

3.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software SPSS versão 28.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). As diferenças foram consideradas para um intervalo de confiança de 95%.

Antes da realização de qualquer teste estatístico foram avaliadas a normalidade e a homocedasticidade através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente.

A comparação das médias dos valores de expressão dos diferentes genes entre amostras controlo e tratadas com IBA, dentro do mesmo tempo de recolha, foi realizada através dos testes T-Student e Mann-Whitney (no caso de os dados não apresentarem distribuição normal). Para cada gene, a comparação das médias dos valores de expressão entre os diferentes tempos de recolha, tanto no grupo controlo como no grupo tratado com IBA, foi realizada através de One-way ANOVA. No caso de se verificarem diferenças significativas, as médias foram comparadas através do teste de Tukey. Sempre que os dados não cumpriram os critérios de normalidade ou homocedasticidade, a análise foi feita com recurso a testes não paramétricos (Kruskal-Wallis). No caso dos testes não paramétricos, sempre que se verificaram diferenças significativas, as amostras foram comparadas pelo método Pairwise. A mesma análise estatística foi considerada para comparação de médias dos níveis de ROS totais, da atividade da enzima CAT e da expressão individual de bandas proteicas das membranas *Western Blot*, ou seja, testes T-Student ou Mann-Whitney para comparar médias dos valores entre amostras controlo e tratadas com IBA, para cada tempo de recolha, e testes One-way ANOVA ou Kruskal-Wallis para comparação das médias dos valores entre os diferentes tempos de recolha para ambos os grupos. Para todos os parâmetros, a análise estatística foi feita para as amostras de base e folha, exceto na expressão individual de bandas proteicas das membranas *Western Blot*, em que a análise foi feita apenas para amostras de base.

Foi realizada uma análise de correlação de Pearson ou Spearman, no caso das amostras não apresentarem distribuição normal, entre as médias dos valores de

expressão dos genes *OeUPB1s* e os genes *OeAPX*, *OeSOD* e *OeCAT*. Nesta análise, sempre que se verificou significância estatística, foi avaliado o coeficiente de correlação. Esta correlação foi avaliada nas amostras de folha e base, em ambos os grupos.

4. Resultados e Discussão

Os *OeUPBEATs* (*OeUPB1*) correspondem a uma pequena família de genes constituída por cinco membros, cujas sequências genómicas (do codão start ao codão stop) variam entre 312 e 390 bp (Tabela 5). A sequência codificante (ORF - *Open Reading Frame*) correspondente a cada gene *OeUPB1* apresenta o mesmo tamanho que a sequência genómica devido à ausência de intrões (Figura 8).

A estrutura contínua, sem a presença de intrões, é uma estrutura típica dos genes de procariotas contrariamente aos genes de organismos eucariotas que apresentam, regra geral, a região codificante interrompida por um número variável de intrões, sendo o número de intrões e o tamanho dos exões muitas vezes associado à família de genes que integram (Cardoso et al., 2015). No entanto, esta estrutura foi já reportada noutros TFs pertencentes à família bHLH em diversas espécies. Zhang et al. (2015) reportaram a existência de 6 genes com uma estrutura caracterizada pela ausência de intrões em *S. miltiorrhiza*, Li et al. (2021) identificaram 4 genes com esta mesma estrutura em *Vitis vinifera L.* (Li et al., 2021), e Song et al. (2021) reportou a mesma estrutura em membros da família bHLH em *Ficus carica L.*.

Tabela 5 - Genes *UPB1s* identificados no genoma de *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* utilizando como query os genes de *A. thaliana*.

Sequence ID	Size (bp)	scaffold	score	E value	Identities	strand
OE6A055347P1	312	Oe6_s04210	563.94 (624)	6.43×10^{-159}	312/312	+/+
OE6A085116P1	312	Oe6_s05858	563.94 (624)	6.43×10^{-159}	312/312	+/+
OE6A099831P1	318	Oe6_s00239	574.76 (636)	3.63×10^{-162}	318/318	+/+
OE6A107214P1	390	Oe6_s07709	704.60 (780)	0.00	390/390	+/+
OE6A032918P1	366	Oe6_s00016	661.32 (732)	0.00	366/366	+/-

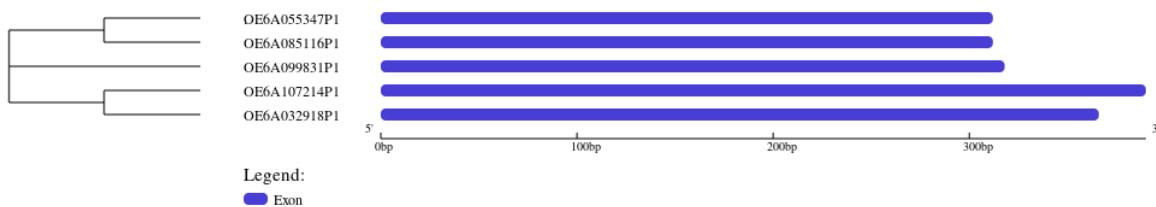


Figura 8 - Dendrograma resultante da análise das cinco sequências identificadas como *OeUPB1* utilizando o software MEGA v.11 (Tamura et al., 2021) após alinhamento das sequências pelo MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (Edgar, 2004) gerando um output no formato Pearson/FASTA. O dendrograma foi realizado segundo do método de Neighbor-Joining (NJ) (Tamura et al., 2004) e o dendrograma testado segundo o método bootstrap considerando 1000 réplicas, “number of differences” como “substitution model” e “pairwise deletion” para os “gaps/missing data”. O esquema foi criado no GSDS – Gene Structure Display Server (<http://gsds.gao-lab.org/>) (Hu et al., 2015). No esquema à direita está representada a estrutura do gene sendo possível verificar a ausência de intrôns.

Com o objetivo de investigar as relações filogenéticas entre os *OeUPB1* e membros da mesma família identificados noutras espécies vegetais, foi construída uma árvore filogenética com 28 sequências putativas obtidas de 17 espécies de plantas (Figura 9). A análise revelou a existência de duas sequências *UPBEAT1* homólogas de diversas espécies e de três membros *UPBEAT1-like*, homólogas de *AtUPBEAT-like*. Neste dendrograma é visível um cluster integrando as sequências bHLH do tipo MYC separadas de todas as sequências do tipo *UPBEAT1*, o que permite ter maior segurança na identificação das sequências UPBEAT de *O. europaea*.

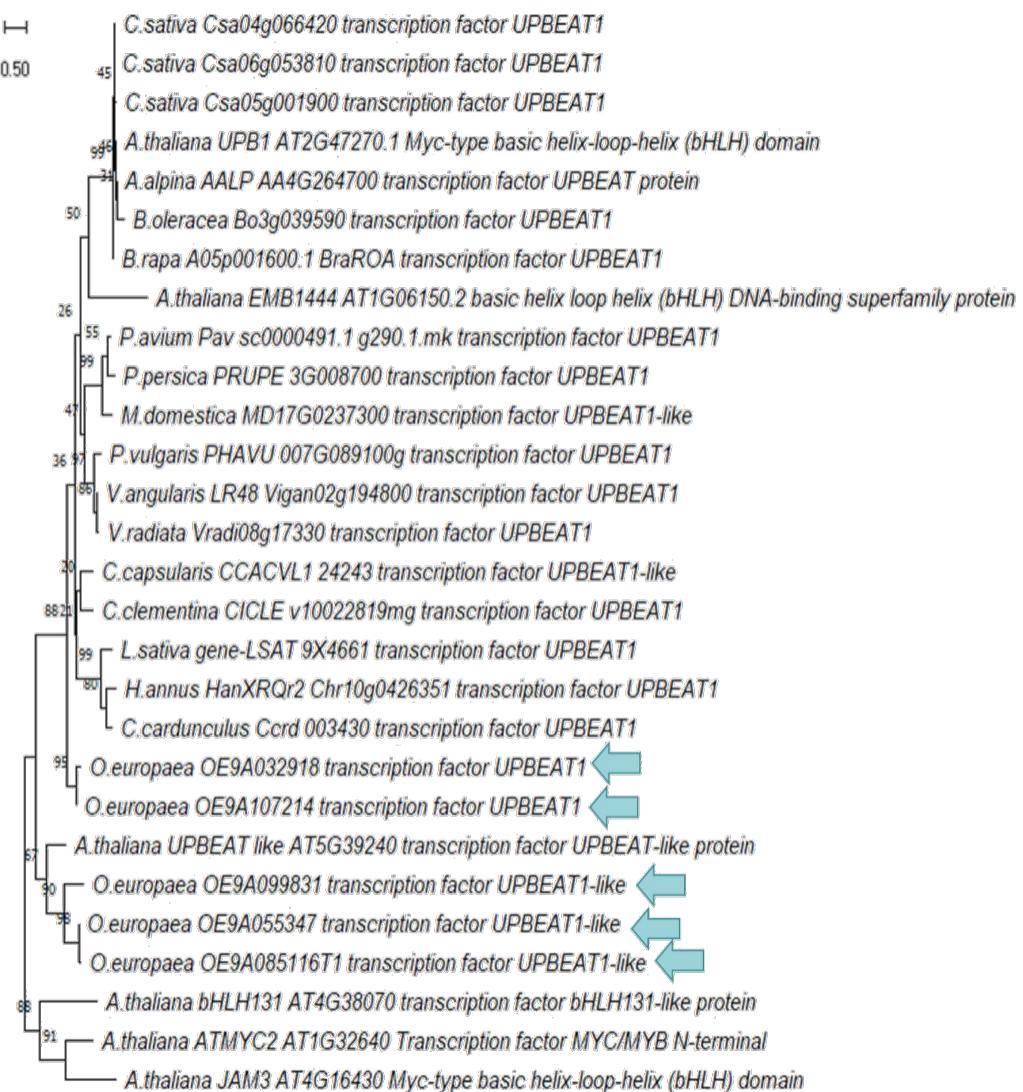


Figura 9 – Representação das relações filogenéticas entre as sequências deduzidas de UPBEAT1 de 17 espécies de plantas Magnoliopsida e as sequências de *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*. Foram incluídas 28 sequências putativas de UPBEAT1 de plantas superiores (a correspondência com números de acesso e as espécies de plantas estão incluídas na Tabela Suplementar S1). A árvore foi obtida através de uma análise Neighbor-Joining pelo método bootstrap com 1000 réplicas usando o software MEGA 7.

Para identificar o domínio bHLH (*Transcription factor IBH1-like*) conservado nos membros da família bHLH, as sequências deduzidas de *O. europaea* foram alinhadas utilizando o software CLC GenomicsWorkbench 11.0.1.. Em todas as sequências foi identificado o domínio bHLH como representado na Figura 10. Na Tabela 5 são identificadas as características das proteínas codificadas pelas diferentes sequências.

O alinhamento realizado utilizando as sequências peptídicas de *O. europaea* permitiu confirmar a similaridade entre as sequências, já previamente identificada nos clusters obtidos no dendrograma. Esta similaridade entre as sequências foi confirmada através da realização de uma matriz de similaridade entre as sequências nucleotíidas (Tabela 7), a qual revelou um valor de 97.7% de similaridade entre as sequências OE6A055347 e OE6A085116. Este resultado levou a considerar as sequências referidas como possíveis cópias de um único gene. Perante este resultado são propostos quatro genes *UPB1* em *O. europaea*, sendo classificados de *OeUPB1a* (OE6A055347 e OE6A085116), *OeUPB1b* (OE6A099831), *OeUPB1c* (OE6A107214), *OeUPB1d* (OE6A032918).

A análise efetuada para prever a localização das proteínas *OeUPB1* identificou para as *OeUPB1a*, *OeUPB1c* e *OeUPB1d* uma localização no núcleo, enquanto para a *OeUPB1b* foi identificada uma localização mitocondrial (Tabela 6). Estes resultados indicam uma atividade ao nível da regulação de genes nucleares para três membros *OeUPB1s* [*OeUPB1a* (OE6A055347 e OE6A085116), *OeUPB1c* (OE6A107214) e *OeUPB1d* (OE6A032918)], enquanto que um parece codificar uma proteína com atividade na regulação de genes mitocondriais [*OeUPB1b* (OE6A099831)].

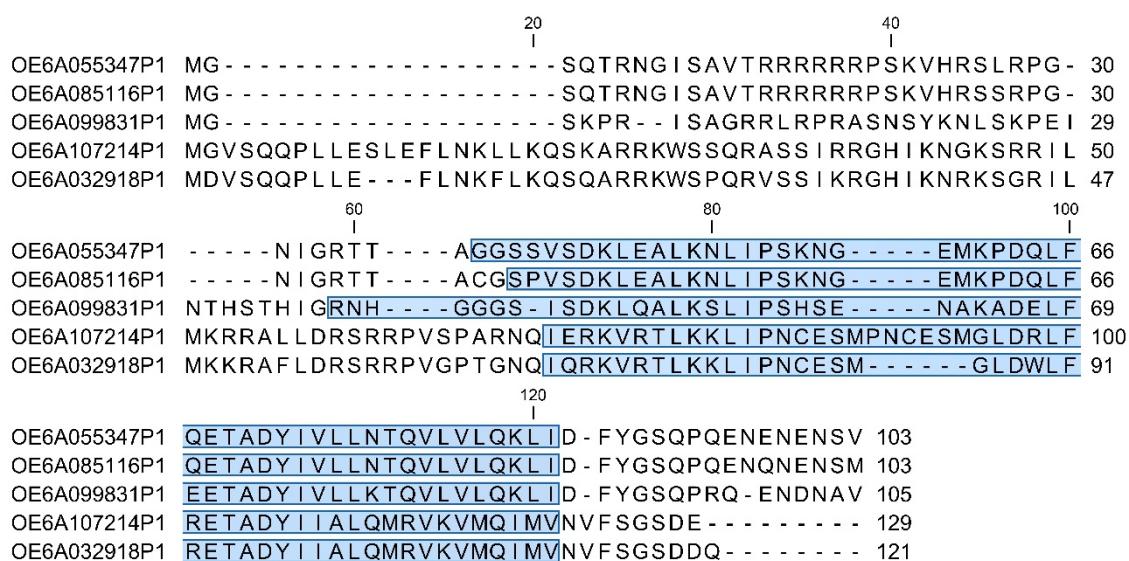


Figura 10 – Alinhamento realizado entre as sequências peptídicas obtidas pela tradução *in silico* das sequências *OeUPB1* identificadas. O alinhamento foi realizado com recurso ao software CLC GenomicsWorkbench 11.0.1. A região correspondente ao domínio bHLH (*Transcription factor IBH1-like*) está indicada a azul em cada sequência.

Tabela 6 – Características das proteínas codificadas pelos genes OeUPB (*at pH 7.0; N: núcleo; M: mitocôndria; MW: peso molecular; Ip: ponto isoelétrico; Hydrof: hidrofóbico.

Accession	Local	Proteína (aa)	MW (KDa)	Ip	carga*	Aminoácidos			
						básico	ácido	hidrof	polar
OE6A055347P1	N(5/14)	103	11.51	10.21	6.08	16	10	28	33
OE6A085116P1	N(6/14)	103	11.57	10.22	7.052	16	9	26	35
OE6A099831P1	M(8/14)	105	11.66	9.601	4.58	15	11	31	31
OE6A107214P1	N(10.5/14)	129	15.04	11.47	18.02	29	11	39	32
OE6A032918P1	N(6.5/14)	121	14.20	11.43	17.04	26	9	38	30

Tabela 7 – Matriz de similaridade (Sequence Identity Matrix) obtida no software Bioedit mostrando o nível de semelhança entre as cinco sequências de *O. europaea* identificadas como pertencentes à família UPB1.

Seq->	OE6A055347	OE6A099831	OE6A107214	OE6A085116	OE6A032918
OE6A055347	ID	0.301	0.158	0.977	0.193
OE6A085116	0.977	0.308	0.158	ID	0.202
OE6A099831	0.301	ID	0.202	0.308	0.210
OE6A107214	0.158	0.202	ID	0.158	0.310
OE6A032918	0.193	0.210	0.310	0.202	ID

4.1. Expressão dos genes – RT-qPCR

Com o objetivo de investigar a relação entre os fatores de transcrição UPBs na regulação das peroxidases associadas à homeostase das ROS (moléculas envolvidas na indução do enraizamento adventício desempenhando um papel de sinalizadoras) os níveis de mRNA dos genes que codificam para os fatores de transcrição OeUPB1 foram quantificados juntamente com os níveis de expressão dos genes que codificam para três enzimas envolvidas no controlo das ROS, a OeCAT, a OeSOD e a OeAPx. Tratando-se de três famílias de genes, a seleção do gene a avaliar foi baseada em resultados prévios de transcriptómica, tendo sido selecionado o gene com valores de expressão mais elevados (dados não publicados), correspondendo as accessions desses genes aos indicados na Tabela 3.



Figura 11 – Heatmap mostrando a variação da expressão dos diferentes membros da família *UPB1* em Microestacas de oliveira durante a fase de indução do enraizamento adventício. A taxa de falsos positivos (FDR do inglês false discovery rate) foi utilizada para identificar genes diferencialmente expressos segundo o método General Linear Model (GLM) (teste Likelihood ratio) utilizando os tratamentos (Contolo vs. IBA) e os tempos de análise como fatores.

Os resultados obtidos por RT-qPCR da análise da base da microestaca, a região que está diretamente envolvida na formação das raízes adventícias, permitiu corroborar os resultados previamente obtidos da análise do transcriptoma (*Whole Transcriptome Sequencing*, RNAseq) (Figura 11). Dos cinco genes previamente identificados pelos resultados do RNAseq, apenas foi possível obter resultados por RT-qPCR para os genes *OeUPB1a* (OE6A085116P1/OE6A055347P1) e *OeUPB1b* (OE6A099831P1), coincidente com os resultados de RNAseq onde se observou serem estes genes os que apresentaram valores de expressão mais elevados (Figura 12).

Os resultados obtidos por RT-qPCR permitiram confirmar que o gene *OeUPB1a* e *OeUPB1b* apresentaram um padrão de expressão que difere entre o controlo e o tratamento com IBA. O gene *OeUPB1a* apresentou na condição controlo uma expressão constante ao longo do tempo mantendo os níveis de expressão baixos, contrariamente ao tratamento com IBA onde a expressão se apresentou elevada logo às 6h, mantendo-se elevada às 24h e descendo para valores próximos do controlo às 72h (Figura 12). No caso do *OeUPB1b* verificou-se um ligeiro aumento ao longo do tempo atingindo o nível

máximo às 72h, sendo o padrão distinto quando comparado com a condição IBA, exibindo em todos os pontos de análise níveis de expressão significativamente superiores, sendo o pico de expressão visível às 24h.

As plantas, sendo organismos sésseis, estão sujeitas a uma diversidade de stresses bióticos e abióticos. Como forma de adaptação desenvolveram diversos mecanismos que lhes permitem responder e adaptar a novas condições (plasticidade) não comprometendo o seu desenvolvimento. Estas respostas adaptativas envolvem mecanismos moleculares e bioquímicos que culminam em alterações fisiológicas, e algumas vezes envolvendo alterações morfogénicas (Han et al., 2022). Com um papel chave na regulação da resposta adaptativa encontram-se os TFs, proteínas responsáveis pela regulação de genes relacionados com a tolerância/resistência a fatores de stress (Tikhomirova et al., 2022). Os TFs da família bHLH foram associados à resposta a diversos stressores em diferentes espécies de plantas, com o pico de expressão muito próximo do momento de aplicação da condição de stress. Zhao et al. (2023) demonstrou o envolvimento de 94,5% de 121 genes da família bHLH em *Betula platyphylla* na resposta ao stress osmótico. Em *Cucumis sativus* foi também reportado o envolvimento de genes bHLH a temperaturas baixas (4°C), tratamento com ácido abíssico (100 µM) e salinidade (10 mM de NaCl) (Li et al., 2020). Na resposta à salinidade os autores identificaram na maioria dos genes o valor máximo de expressão 3h após o tratamento, sendo a diminuição da expressão gradual ao longo do tempo. Na resposta às baixas temperaturas, o pico de expressão na maioria dos genes foi observado às 6h após exposição à condição de stress.

As auxinas afetam e controlam muitos processos metabólicos, incluindo o desenvolvimento e crescimento das plantas, assim como a resposta a condições ambientais adversas. No presente trabalho, a utilização de auxinas está diretamente associada à diferenciação de raízes adventícias, uma resposta morfogénica às condições de stress aplicadas (corte e aplicação da auxina IBA). A relação entre as auxinas e as espécies reativas de oxigénio (ROS) é integrada numa complexa rede hormonal que controla diversos processos biológicos, incluindo o crescimento e desenvolvimento e a resposta a stressores bióticos e abióticos (Xia et al., 2015). As ROS, uma vez presentes em todas as células vegetais, produzidas continuamente por várias vias metabólicas em resposta a condições de stress, podem apresentar níveis elevados tornando-se tóxicas para a planta. Contudo, as plantas dispõem de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que lhes permitem restabelecer os níveis de ROS a níveis não tóxicos (Ahmad et al., 2019; Garg & Manchanda, 2009). No presente trabalho

foram analisados os níveis de expressão de enzimas envolvidas na homeostase das ROS, a APX, a SOD e a CAT (figura 12).

O gene *OeAPX* apresentou um pico de expressão às 24h em ambas as condições consideradas (controlo e IBA). No controlo observou-se uma diminuição da expressão às 72h, sendo que na condição de tratamento com IBA a expressão se manteve estável. Este resultado sugere um envolvimento diferencial da *OeAPX* na resposta às duas condições de stress (corte e IBA), apresentando às 72h um papel predominante na resposta ao IBA, com valores de expressão significativamente diferentes dos valores obtidos na condição controlo. Num trabalho realizado por Pang et al. (2023) em *Capsicum annuum* L. os autores identificaram diferentes genes *APX* com um nível de expressão elevado em resposta ao stress térmico (frio/calor) sugerindo um papel importante destes genes na resposta ao stress térmico nesta espécie. Trabalhos prévios realizados noutras espécies revelaram resultados similares (Sharma e Dubey, 2005; Koussevitzky et al., 2008; Malambane et al., 2018).

Relativamente à expressão do gene *OeSOD*, na condição controlo, o nível de transcrito atingiu o seu máximo às 24h mantendo-se estável às 72h. Nas amostras tratadas com IBA, com uma expressão significativamente inferior ao controlo nos tempos iniciais, foi visível um aumento progressivo da expressão, atingindo o máximo às 72h com um nível de expressão similar ao observado no controlo. A expressão diferencial entre controlo e IBA, com valores significativamente diferentes entre ambas as condições, foi observado nos dois tempos iniciais (6h e 24h), revelando um envolvimento diferencial deste gene na resposta aos estímulos do enraizamento adventício, com uma expressão mais elevada em resposta ao corte. O envolvimento de genes da família *SOD* na resposta a diversos stressses abióticos foi reportada em diferentes espécies vegetais (Feng et al., 2016; Jiang et al., 2019; Su et al., 2021; Wang et al., 2017).

Em relação à expressão do gene *OeCAT* foi observado, na condição controlo, um aumento gradual ao longo do tempo com o valor máximo atingido às 72h. Contrariamente, no tratamento com IBA foi visível uma diminuição da expressão às 24h, ainda que sem diferenças significativas relativamente às 6h, para às 72h ser visível um aumento da expressão atingindo o valor máximo. Controlo e tratamento mostraram ao longo de todo o ensaio diferenças significativas, o que indica o envolvimento diferencial deste gene nos dois stressses associados ao processo de enraizamento adventício, o corte efetuado aquando da preparação da microestaca (condição controlo) e o

corte+IBA (condição IBA). Trabalhos realizados por Raza et al. (2021) permitiram associar diversos genes da família CAT à resposta a stresses abióticos como o stress hídrico (seca/alagamento), a salinidade, o stress térmico (frio/calor) e o tratamento com diferentes fitohormonas em *Brassica napus* L..

Com o objetivo avaliar a hipótese inicialmente colocada sobre a regulação de enzimas associadas à homeostase das ROS pelos fatores de transcrição UPB1s durante a fase de indução do enraizamento adventício (condição de tratamento com IBA) foi realizada uma análise de correlação entre os dados de expressão dos genes *OeUPB1s* e os genes *OeAPX*, *OeSOD* e *OeCAT*. Da análise realizada entre o gene *OeUPB1a* (correspondente aos transcritos OE6A085116P1/OE6A055347P1) e os três genes que codificam para as enzimas envolvidas na homeostase das ROS, foi possível observar uma correlação negativa forte entre os níveis de expressão dos genes *OeUPB1a* e *OeCAT* ($P= -0.819$) e moderada entre os genes *OeUPB1a* e *OeSOD* ($P= -0.640$). A análise de correlação revelou a existência de uma correlação positiva forte entre os níveis de expressão dos genes *OeSOD* e *OeCAT* ($P= 0.761$), revelando uma co-expressão de ambos os genes. A mesma análise de correlação foi realizada considerando o gene *OeUPB1b* (transcrito OE6A099831P1) e os três genes *OeCAT*, *OeSOD* e *OeAPx*. Desta análise foi possível detetar apenas a existência de uma correlação positiva moderada ($P=0.665$) com o gene *OeAPx*.

Os resultados da análise de correlação permitem-nos propor a *OeUPB1a* como regulador da expressão dos genes da *OeCAT* e *OeSOD*, sendo responsável pela subexpressão desses genes, os quais codificam enzimas diretamente envolvidas na regulação das ROS. O papel dos TFs UPB1 na supressão da transcrição de várias peroxidases foi previamente reportado por Dietz (2013). Num trabalho desenvolvido por Tsukagoshi et al. (2010) para investigar o envolvimento dos UPB1s na regulação das peroxidases na homeostase das ROS e consequente crescimento das raízes foi reportada a existência de uma função cumulativa entre peroxidases diretamente controladas pelos UPB1, o que pode justificar a co-expressão dos genes *OeCAT* e *OeSOD*, ambos envolvidos na codificação de enzimas oxidativas, envolvidas na homeostase das ROS. Os elevados níveis de expressão obtidos nas primeiras horas do ensaio para o gene *OeUPB1a* poderão estar associados a níveis de expressão mais baixos dos genes *OeCAT* e *OeSOD*. Este resultado está provavelmente relacionado com o fato de durante o período de indução, após o tratamento com IBA, a existência de ROS em níveis elevados ser de extrema importância para o papel de sinalização associado ao corte e consequente morte celular (Orozco-Cárdenas et al., 2001) e ao IBA como estímulo do enraizamento, estando ambos envolvidos no processo de

formação de lenhina, necessária à formação das paredes celulares (Macedo et al., 2012, 2013). Vários trabalhos reportam o envolvimento das ROS na indução e desenvolvimento de raízes adventícias (Dunand et al., 2007; Nag et al., 2001), sendo o H₂O₂ uma das moléculas mais estudadas. Dependendo da espécie vegetal e da concentração utilizada, o H₂O₂ apresenta um papel positivo na formação de raízes adventícias. Li et al., (2009a) demonstrou que o H₂O₂ é capaz de promover a formação e o desenvolvimento de raízes adventícias quando utilizado em concentrações entre 1 a 100 mM por 8 a 18 h. Em estacas de crisântemo (*Dendranthema morifolium* cv. 'Beiguozhicun'), o H₂O₂ a 200 µM provou ser mais eficaz na indução de elevadas taxas de enraizamento (Liao et al., 2010). Da mesma forma, um estudo com estacas de *Berberis thunbergii* var. *atropurpurea* reporta um aumento do enraizamento quando aplicado H₂O₂ (3,5% p/v) em combinação com IBA 3 g L⁻¹ em comparação com o tratamento exclusivo com IBA (Tehranifar et al., 2014).

Em oliveira, trabalhos baseados na aplicação de H₂O₂ revelaram a importância das ROS na eficiência do processo de enraizamento adventício. Neste sentido, o H₂O₂ desempenha um papel importante no alongamento celular e na formação de pelos radiculares, assim como no armazenamento e transporte de auxina na planta, processos importantes para o desenvolvimento de raízes adventícias (Silva et al., 2022).

Sebastiani & Tognetti (2004) observaram em oliveira que estacas semi-lenhosas da cv. 'Frantoio' (de fácil enraizamento) e da cv. 'Gentile di Larino' (de difícil enraizamento) tratadas com IBA e H₂O₂ apresentaram um aumento no número de raízes em comparação com as estacas tratadas apenas com IBA. Resultado semelhante foi obtido no estudo de Rugini et al. (1997), onde o tratamento com H₂O₂ conduziu ao aumento da percentagem de enraizamento em estacas semi-lenhosas da cv. 'Frangivento' e de microestacas da cv. 'Moraiolo'.

Passado o período de sinalização, os níveis de ROS deverão voltar aos níveis basais, sendo para tal necessária a ativação do mecanismo enzimático das peroxidases e enzimas oxidativas, o que poderá explicar a redução do nível de transcrito do *OeUPB1a* e consequente aumento do nível de transcrito dos genes *OeCAT* e *OeSOD*.

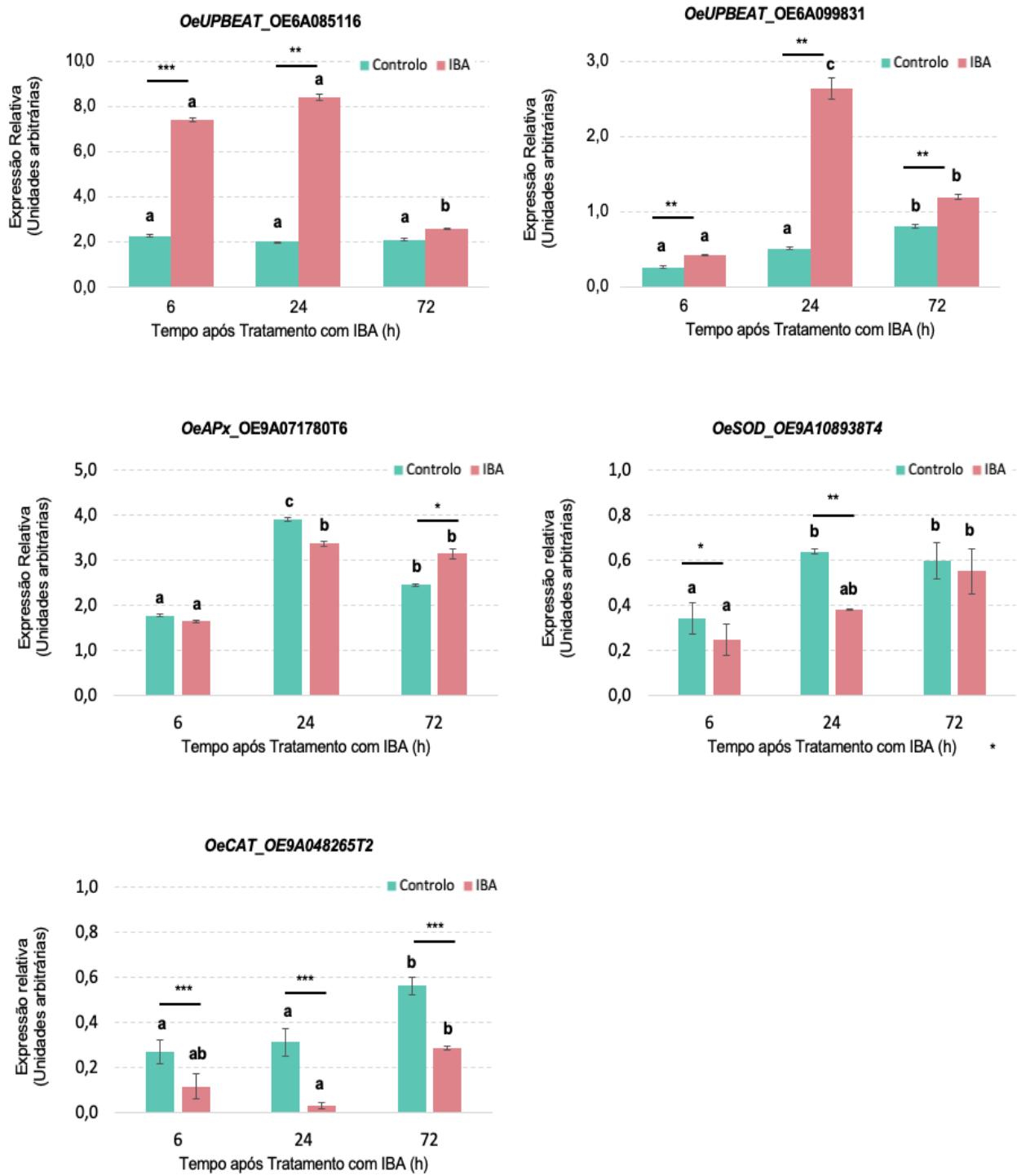


Figura 12 – Expressão relativa dos genes OE6A085116 – *OeUPB1a*, OE6A099831 – *OeUPB1b*, OeAPx, OeSOD e OeCAT na base de microestacas de oliveira (*Olea europaea* L.) após tratamento com IBA (*indole-3-butiric acid*). As amostras foram recolhidas em diferentes momentos após tratamento com a auxina: 0h, 6h, 24h e 72h. As amostras controlo correspondem a amostras recolhidas de microestacas não tratadas com IBA. Os valores de expressão são relativos às 0h.

Relativamente aos resultados de expressão génica obtidos em amostras da folha (Figura 13), foi possível verificar que apenas os genes *OeUPB1a* e *OeUPB1b* apresentaram nível de transcripto detetáveis por RT-qPCR como observado em amostras da base do caule. O padrão de expressão entre o controlo e o tratamento com IBA revelou-se semelhante em ambos os genes. Ambos apresentaram nas amostras do controlo uma diminuição da expressão ao longo do tempo, enquanto no grupo IBA, se verificou um aumento às 24h atingindo o seu nível máximo de expressão, com uma posterior diminuição às 72h.

Relativamente aos genes *OeAPX*, *OeSOD* e *OeCAT* o padrão de expressão nas amostras tratadas com IBA foi similar entre si e similar ao observado nos genes *OeUPB1a* e *OeUPB1b*, com o pico de expressão visível às 24h nas amostras tratadas com IBA. Neste caso poderia considerar-se uma regulação positiva das enzimas oxidativas por parte dos TFs.

Na condição controlo, pelo contrário, o gene *OeAPX* apresentou um padrão de expressão caracterizado por um aumento progressivo ao longo do tempo atingindo o nível máximo às 72h. Padrão este inverso ao observado em ambos os genes *OeUPB1a* e *OeUPB1b*. Os genes *OeSOD* e *OeCAT* mantiveram um nível de expressão constante ao longo do tempo.

Elevados níveis de ROS são muitas vezes prejudiciais para as células vegetais, e como tal a planta necessita de desenvolver mecanismos que lhe permita manter os níveis adequados, de forma a manter um equilíbrio adequado entre a sua proliferação e a diferenciação.

Segundo a análise de correlação entre os dados de expressão dos genes *OeUPB1s* e os genes *OeAPX*, *OeSOD* e *OeCAT* foi possível observar nas amostras de folha tratadas com IBA, que o gene *OeUPB1b* apresenta uma correlação positiva forte com o gene *OeUPB1a* e uma correlação positiva moderada com o gene *OeCAT*. Entre os três genes que codificam para as enzimas envolvidas na homeostase das ROS, o *OeSOD* apresenta uma correlação positiva forte com o gene *OeAPX* e *OeCAT*, ocorrendo a mesma correlação entre o gene *OeAPX* e *OeCAT*. Nas amostras controlo, a análise de correlação indica a ocorrência de uma correlação positiva forte entre os genes *OeUPB1s* (*OeUPB1a* e *OeUPB1b*) e uma correlação positiva moderada entre o gene *OeSOD* e os genes *OeAPX* e *OeCAT*, e entre o gene *OeAPX* e o *OeCAT*.

De forma a perceber melhor a relação entre as ROS e as UPB1 na proliferação celular, Tsukagoshi et al. (2010) analisou dados de expressão (depositados no AtGenExpress) de genes das peroxidases em raízes de *Arabidopsis* tratadas com metil

viológeno (composto que causa a formação contínua de O_2^-) e dados de stress oxidativo obtidos de um banco de dados de *microarray*. Os resultados mostraram uma regulação positiva da *UPB1* após 24h de tratamento e uma baixa expressão da regulação das peroxidases pela UPB1. Algumas das peroxidases não reguladas pelas UPB1 apresentaram um aumento da sua expressão, possivelmente associada à homeostase das ROS.

No presente trabalho a análise de correlação efetuada entre os dados de expressão dos genes *OeUPB1s* e os genes *OeAPX*, *OeSOD* e *OeCAT* tanto no controlo como nas amostras tratadas com IBA, revelou a existência de uma correlação positiva, ou seja, ambos os genes (*OeUPB1* e qualquer um dos genes que regulam as enzimas oxidativas, o *OeAPX*, o *OeSOD* ou o *OeCAT*) apresentam o mesmo comportamento. Já nas amostras de base de oliveira foi possível observar uma correlação negativa entre um dos genes *OeUPB1* e os genes *OeCAT* e *OeSOD*, podendo ser o gene *OeUPB1* o responsável pela subexpressão dos outros genes. Resultados similares foram descritos por Tsukagoshi et al. (2010) (observados no estudo descrito a cima) acabando por comprovar que os *UPBEAT1* (*UPB1*) reprimem diretamente um conjunto de genes que codificam enzimas envolvidas na homeostase das ROS conforme vai ocorrendo a diferenciação celular. As *UPBEAT1s* apresentam um papel importante no equilíbrio entre a proliferação celular e a diferenciação, regulando diretamente a expressão das peroxidases, uma vez que estas, controlam a distribuição de ROS nas células, que por sua vez, controlam a transição da proliferação para a diferenciação (Tsukagoshi et al., 2010).

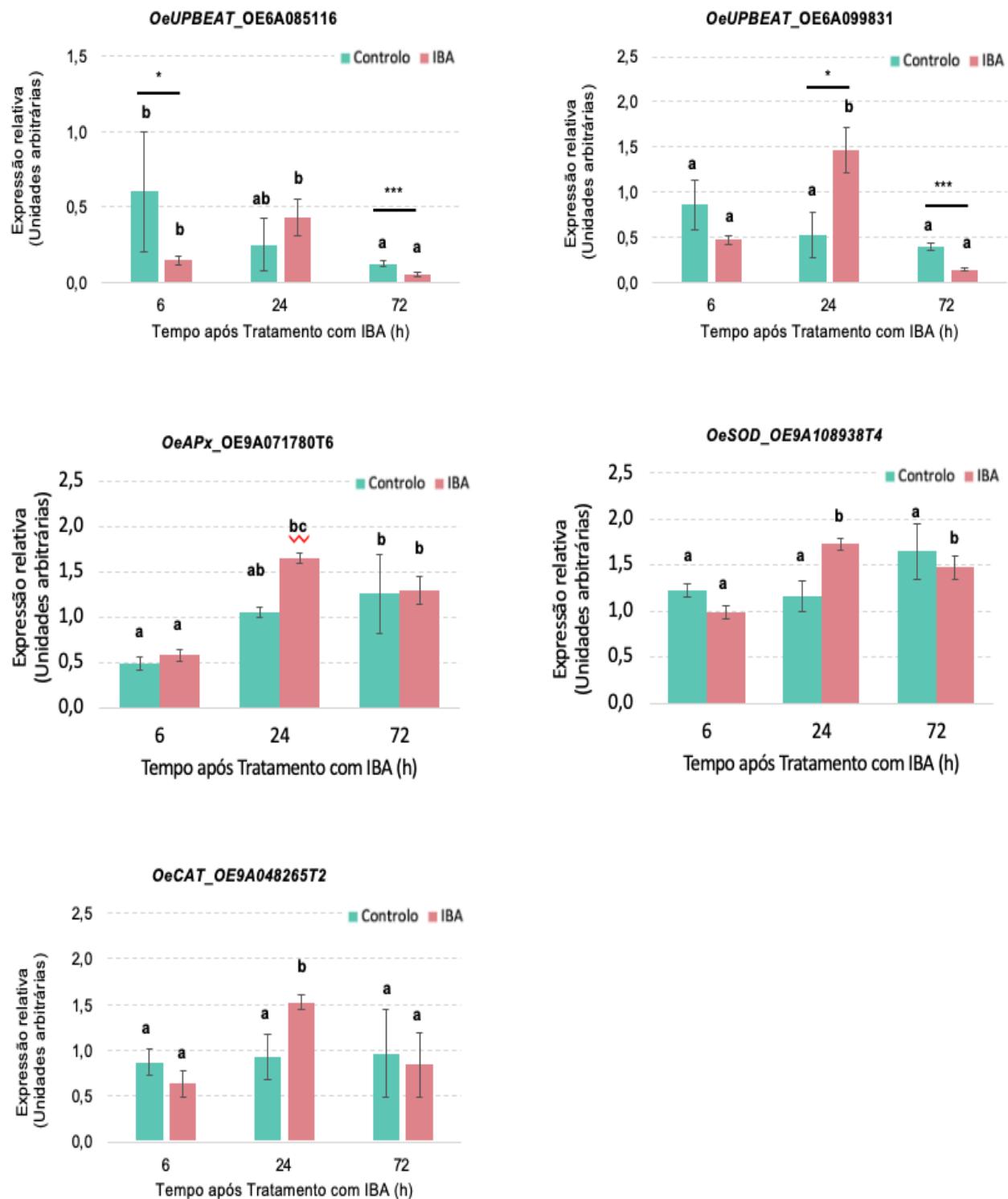


Figura 13 – Expressão relativa dos genes OE6A085116 – *OeUPB1a*, OE6A099831 – *OeUPB1b*, OeAPx, OeSOD e OeCAT na folha de oliveira (*Olea europaea* L.) após tratamento com IBA (*indole-3-butiric acid*). As amostras foram recolhidas em diferentes momentos após tratamento

com a auxina: 0h, 6h, 24h e 72h. As amostras controlo correspondem a amostras recolhidas de microestacas não tratadas com IBA. Os valores de expressão são relativos às 0h.

4.2. Quantificação de espécies reativas de oxigénio

As espécies reativas de oxigénio (ROS), quando em condições fisiológicas normais, são produzidas em níveis basais nas diversas espécies vegetais e armazenadas nos compartimentos celulares. No entanto, em resposta a diferentes fatores externos, as ROS podem ser produzidas em níveis considerados prejudiciais para a planta (Das & Roychoudhury, 2014). Foi objetivo desta dissertação a avaliação do padrão das ROS totais na folha e base da microestaca em oliveira (*Olea europaea L.*) ao longo do ensaio de enraizamento adventício (0h, 6h, 24h e 72h após tratamento com IBA) (resultados apresentados nas Figura 14).

Os resultados obtidos nas folhas (Figura 14) mostraram que plantas tratadas com a auxina IBA tinham níveis de ROS totais significativamente superiores, comparativamente às plantas do grupo controlo e um padrão de acumulação diferente. No grupo controlo observou-se uma ligeira variação dos níveis de ROS totais que se traduziu numa redução às 24h e um posterior aumento para os níveis basais às 72h. Pelo contrário, o grupo tratado com IBA foi marcado por um aumento pronunciado às 6h, momento em que foi observado o valor máximo, diminuindo progressivamente ao longo do tempo até às 72h.

Tendo em conta os níveis de ROS totais determinados na base das microestacas (Figura 14), às 6h o padrão é semelhante ao observado na folha, sendo o grupo tratado com a auxina IBA que apresentou níveis de ROS significativamente mais elevados, em comparação com o grupo controlo ($p=0.009$). A partir das 6h, observou-se um padrão inverso ao descrito para as amostras de folha, tendo o grupo controlo níveis de ROS significativamente mais elevados, comparativamente ao grupo tratado com IBA. Este resultado verificou-se às 24h ($p = 0.000$) e 72h ($p = 0.049$). Comparando os diferentes tempos de análise, o grupo controlo apresentou valores máximos de ROS às 24h, sendo significativamente diferente das 0h ($p=0.003$), 6h ($p=0.000$) e 72h ($p=0.001$). Já no grupo tratado com IBA, ocorreu um decréscimo dos níveis de ROS totais a partir das 6h, sendo atingidos valores mínimos às 72h. No grupo controlo os níveis de ROS totais atingiram valores mínimos às 6h, sendo este resultado o inverso no grupo tratado com IBA, onde os valores são máximos no tempo referido.

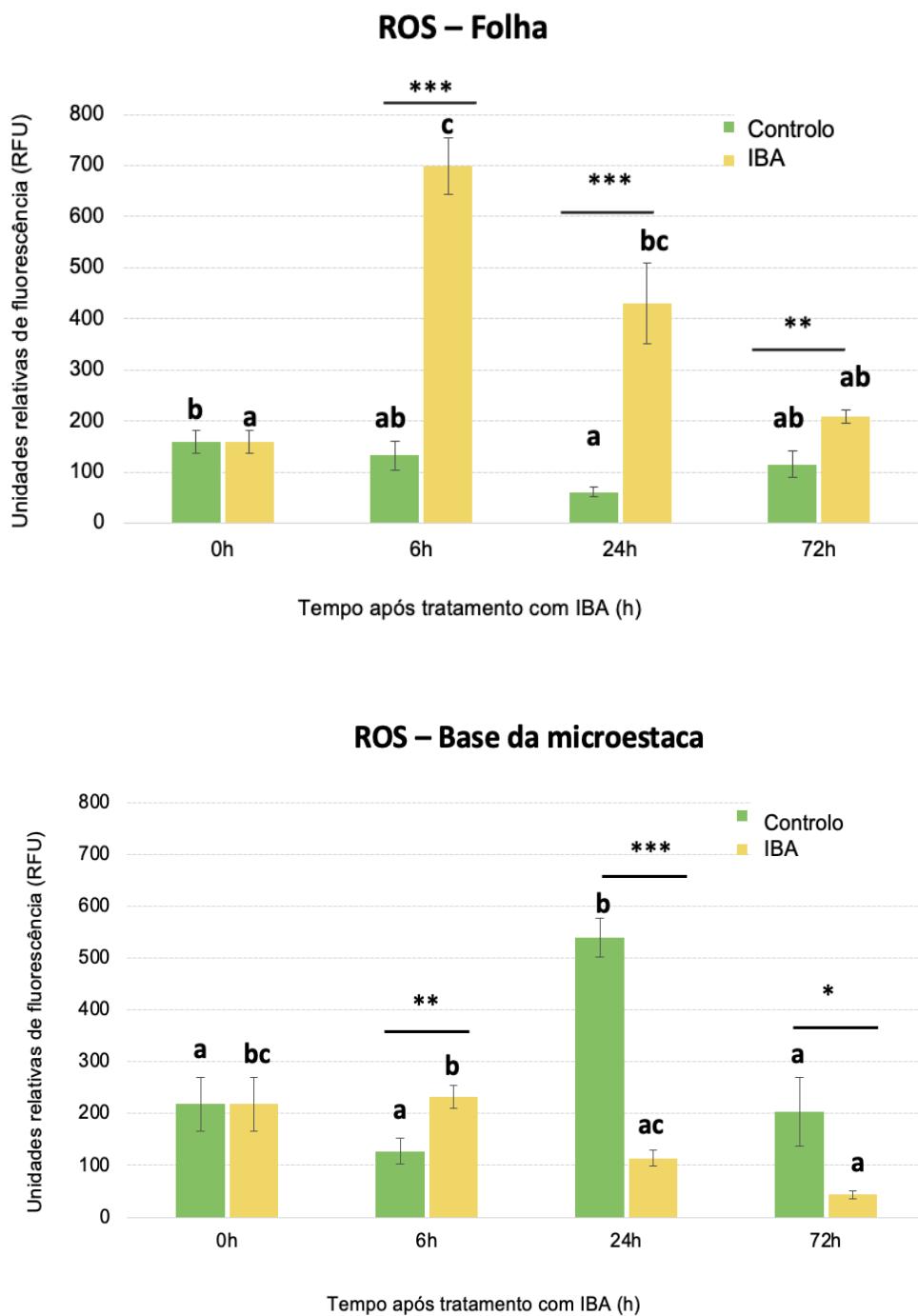


Figura 14 – Quantificação das espécies reativas de oxigénio (ROS) em amostras da base do caule de microestacas de oliveira (*Olea europaea* L.) tratadas/não tratadas (Controlo) com IBA obtidas em diferentes tempos após a inoculação em meio de enraizamento (0h, 6h, 24h e 72h). Os dados correspondem à média ± EPM e * indica a existência de diferenças significativas entre os grupos controlo e IBA em cada tempo de análise. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos (0h, 6h, 24h e 72h) para cada grupo (controlo e IBA).

O processo de enraizamento adventício é considerado uma resposta morfológica ao stress que pode ser influenciado por uma série de fatores internos e externos. Em oliveira, o stress abiótico é um fator determinante na formação de raízes adventícias, sendo o mesmo desenvolvido através do corte e da aplicação da auxina IBA, levando à ativação de diversas vias metabólicas envolvidas no enraizamento adventício (Porfírio et al., 2016). As espécies reativas de oxigénio (ROS) são um dos grupos de moléculas sinalizadoras descritas como tendo um papel central na resposta ao stress abiótico em plantas, bem como na regulação do seu crescimento e desenvolvimento (Velada et al., 2020). A relação entre as ROS e as auxinas que participam no processo de enraizamento adventício tem sido reportada em vários estudos, na medida em que as ROS podem ter influência no transporte ou na transcrição de genes associados às auxinas através da ativação da via de sinalização da proteína quinase (MAPK), levando à fosforilação de fatores de transcrição e outros componentes de sinalização (Nakagami et al., 2006; Tognetti et al., 2012; Xia et al., 2015).

Neste trabalho, nas amostras de folha de oliveira, observaram-se níveis de ROS totais significativamente mais elevados no grupo tratado com a auxina IBA, comparativamente ao grupo controlo. Este resultado está de acordo com o obtido no estudo de Li et al. (2009), onde os autores observaram um aumento dos níveis de H₂O₂ em plântulas de feijão (*Mucuna pruriens* L.) tratadas com IBA. Estes autores demonstraram que o H₂O₂ pode funcionar como molécula sinalizadora envolvida na formação de raízes adventícias induzidas pelo IBA (Li et al., 2007, 2009). Também outros estudos demonstraram que as auxinas podem induzir a produção de ROS (Tognetti et al., 2012) e regular a sua homeostase (Pasternak et al., 2005). Este aumento nos níveis de ROS pode ser resultado de alterações metabólicas desencadeadas pela auxina, promovendo a ativação de enzimas envolvidas na produção de ROS ou alterando o equilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos de eliminação dos mesmos (Xia et al., 2015). O stress provocado ao nível da base terá provocado um aumento das ROS que foram transportadas para a parte aérea onde desempenham um papel importante ao nível da ativação de diversas vias metabólicas. Nestas está incluída a fotossíntese como processo biológico responsável pela síntese de hidratos de carbono que serão posteriormente translocados para a base da microestaca, fornecendo a energia necessária à intensa atividade metabólica associada à formação das raízes adventícias. O papel das ROS enquanto moléculas de sinalização desempenhando um papel chave a longa distância foi revisto por Chi et al. (2013).

No caso das amostras de base das microestacas, os níveis de ROS apresentam-se significativamente mais elevados no grupo IBA imediatamente após o estabelecimento

do ensaio (6h), invertendo-se esta tendência nos tempos 24h e 72h, passando a ser significativamente superior nas amostras controlo (não tratadas com IBA). Neste caso, podemos colocar a hipótese de que a produção de ROS numa fase quase imediata à aplicação do estímulo do enraizamento (corte +IBA) estará mais associado à resposta ao IBA, e numa segunda fase mais associada ao stress provocado pelo corte.

Num estudo recente, Velada et al. (2020) demonstraram que os níveis de ROS, nomeadamente O_2^- e H_2O_2 , aumentaram significativamente nas primeiras horas após a inoculação de microestacas de oliveira (cv. ‘Galega vulgar’) em meio de cultura apropriado, diminuindo drasticamente 8 horas após o início do ensaio. Este resultado foi observado tanto em microestacas do grupo controlo, como do grupo submetido à auxina IBA. Os resultados obtidos para o grupo tratado com IBA são concordantes com o estudo de Velada et al. (2020), uma vez que se observou um pico de acumulação de ROS (mais notório nas folhas) às 6h com uma diminuição progressiva ao longo do ensaio. Pode ainda colocar-se como hipótese uma acumulação mais precoce das ROS no tratamento com IBA, o que explicaria a não deteção do pico antes das 6h.

4.3. Estudo da expressão por *Western Blot*

Tal como referido na secção dos materiais e métodos, as baixas concentrações proteicas obtidas nos extratos das amostras de folha, associado ao limite máximo de volume de amostra aplicável por poço (capacidade máxima de 40 μ L) invalidaram a realização da técnica *Western blot* nestas amostras. Neste contexto, e de modo a ser possível analisar a expressão em 20 μ g de proteína, apenas as amostras da base da microestaca foram consideradas.

Os resultados relativos à expressão da proteína CAT obtidos nas amostras da base da microestaca revelaram a existência de uma banda de massa molecular aparente entre os 48 e os 63 Kda (Figura 15). De acordo com os diversos trabalhos publicados, a proteína CAT é descrita como um sistema enzimático com uma grande diversidade em termos estruturais e propriedades moleculares. Do ponto de vista estrutural, a CAT nativa, de massa molecular entre 220-350 kDa, consiste num tetrâmero constituído por quatro subunidades idênticas, sendo que cada subunidade é caracterizada pela presença de um grupo heme no centro catalítico e uma massa molecular de 55-59 kDa (Bagnoli et al., 2004; Chelikani et al., 2004; Corpas et al., 1999; Palma et al., 2020). Segundo o marcador de massas moleculares utilizado no trabalho desenvolvido no âmbito da presente dissertação, a massa molecular da proteína

marcada com o anticorpo primário Anti-CAT aparenta corresponder à massa molecular da proteína CAT descrita na literatura, o que valida a identificação da mesma.

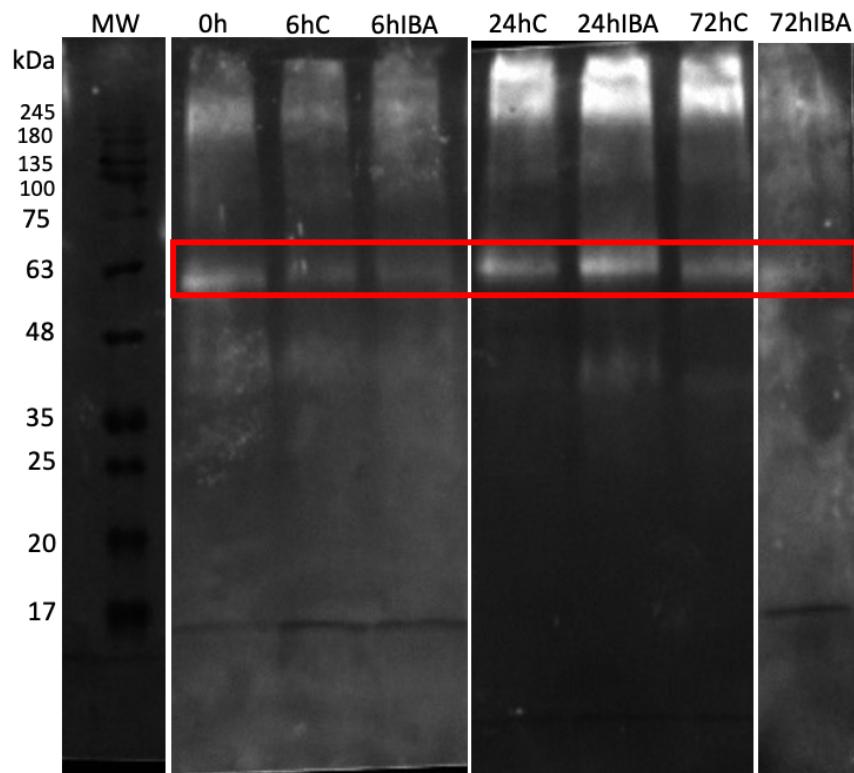


Figura 15 – Imagem da membrana de *Western blot* para a proteína Catalase (CAT) em amostras de base da microestaca de oliveira (*Olea europaea* L.). A banda correspondente à proteína CAT encontra-se delimitada a vermelho nesta imagem e tem uma massa molecular aparente de aproximadamente 59kDa. As amostras correspondentes a cada banda encontram-se identificadas na linha superior da imagem: amostras tratadas com a auxina IBA e amostras do grupo controlo (C) obtidas em diferentes tempos após a inoculação em meio de enraizamento (0h, 6h, 24h e 72h). No lado esquerdo da imagem estão representadas as massas moleculares (kDa) do marcador utilizado (NZYColour Protein Marker II, nzytech).

Para além da banda específica com uma massa molecular próxima do valor esperável, é possível identificar em todas as amostras uma banda com massa molecular aparente próxima de 200 kDa e, em algumas das amostras, uma banda com massa molecular aparente entre 35 e 48 kDa (Figura 15). Este facto pode ser explicado devido à existência de ligações inespecíficas do anticorpo com outras proteínas, podendo tal ser provocado por um bloqueio incompleto ou pela baixa especificidade do anticorpo. Segundo Kurien & Scofield (2006) estes fatores são os mais comuns em

técnicas baseadas na ligação antigénio-anticorpo para o aparecimento de ligações inespecíficas. No trabalho desenvolvido no âmbito da presente dissertação, o bloqueio teve uma duração de duas horas, contudo foi realizado com uma solução tampão composta por TBS-T e proteína do leite, podendo não apresentar a eficiência necessária para a prevenção de ligações inespecíficas do anticorpo primário a outras proteínas. Uma outra explicação para o aparecimento destas ligações inespecíficas pode estar relacionada com a concentração de anticorpo primário, podendo a mesma estar demasiado elevada. Com efeito, será necessário um trabalho posterior focado na otimização dos dois parâmetros referidos de modo a diminuir o sinal associado às ligações inespecíficas.

Os valores da expressão da proteína CAT, obtidos da análise da intensidade das bandas correspondentes à massa molecular aparente de 59KDa, permitiu criar o gráfico apresentado na Figura 16. Nesta figura é visível a expressão diferencial da proteína entre tempos e entre as condições consideradas (controlo e IBA). Comparando a expressão entre condições em estudo observaram-se diferenças significativas apenas às 72h, onde a expressão da CAT foi significativamente superior no controlo em comparação com as amostras tratado com IBA ($P=0.042$). Este resultado é concordante com os resultados obtidos na análise da expressão génica (apresentado no ponto 4.1.).

Entre os diferentes tempos de recolha, tanto no controlo como nas amostras tratadas com IBA, não se verificaram diferenças significativas. Contudo, nas amostras tratadas com a auxina foi possível identificar uma tendência ($P=0,076$) para aumento da expressão às 24h, comparativamente às 6h (onde a expressão apresenta o valor mais baixo).

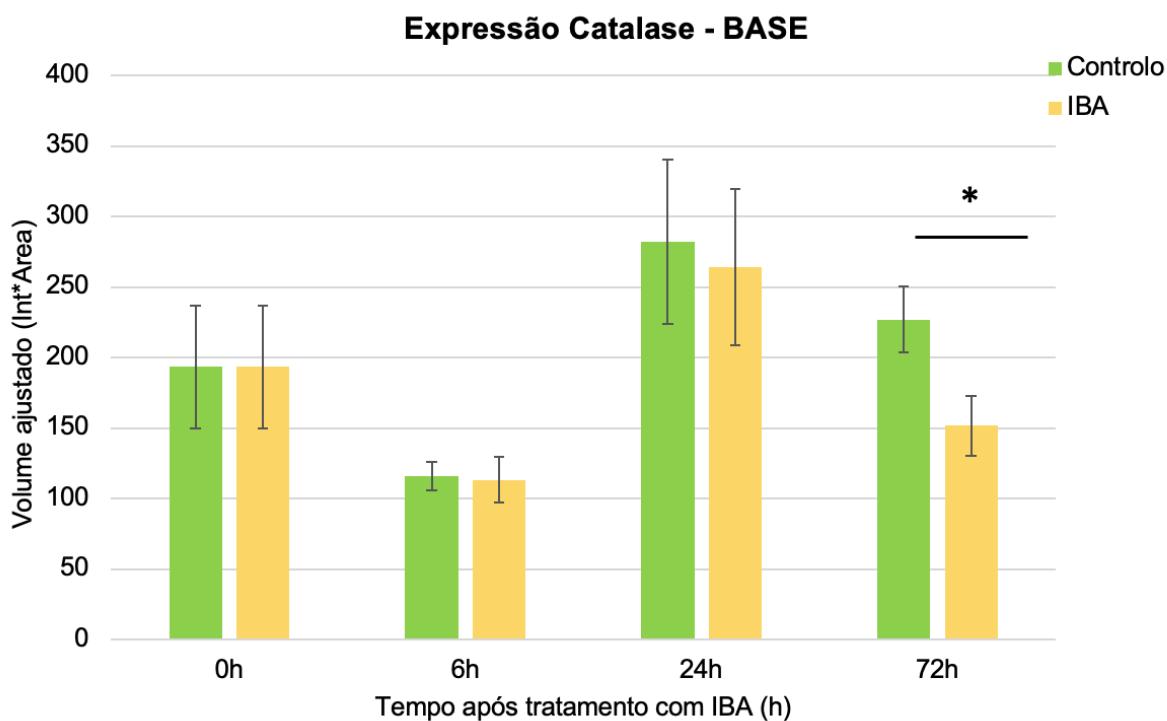


Figura 16 – Expressão da proteína Catalase (CAT) em amostras da base do caule de microestacas de oliveira (*Olea europaea* L.) tratadas/não tratadas (Controlo) com IBA obtidas em diferentes tempos após a inoculação em meio de enraizamento (0h, 6h, 24h e 72h). Os dados correspondem à média ± EPM e * indica a existência de diferenças significativas entre os grupos controlo e IBA em cada tempo de análise. A densidade ótica foi obtida usando uma análise densitométrica. Estes valores compreendem a correção para o background, a qual foi aplicada para cada banda através da normalização de uma região adjacente da membrana.

4.4. Atividade Enzimática da Catalase

Apesar de não ter sido possível avaliar a expressão da proteína CAT em amostras de folha, a atividade enzimática da proteína foi analisada. Comparando os resultados obtidos para as amostras controlo e as amostras tratadas com IBA (Figura 17), observou-se uma atividade significativamente mais elevada no grupo tratado com a auxina, comparativamente ao grupo controlo, às 6h ($P=0,030$) e 24h ($P=0,008$). Às 0h e 72h não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Comparando amostras recolhidas em diferentes tempos durante o ensaio de enraizamento verificou-se uma ausência de diferenças significativas na atividade da CAT ao longo do tempo em plantas tratadas com IBA, ao contrário de plantas do grupo

controlo, onde a atividade diminuiu às 24h para aumentar de seguida às 72h, diferindo estes dois tempos significativamente ($P=0,022$).

Nas folhas, os cloroplastos são os principais produtores de ROS, apresentando um papel importante para o metabolismo da planta e realização da fotossíntese (Ishida et al., 2014). Durante a fotossíntese, a planta produz O_2 , que quando excitado forma ROS. Em condições normais, há um equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS, contudo, em condições adversas provocadas por fatores bióticos e abióticos, os seus níveis podem alcançar a toxicidade nas plantas, sendo necessária a intervenção dos mecanismos enzimáticos.

Relativamente aos resultados obtidos em amostras da base das microestacas (Figura 17), observou-se uma atividade da CAT mais elevada no grupo tratado com IBA às 24h, comparativamente ao grupo controlo ($P=0,047$). Pelo contrário, às 72h foi nas amostras do grupo controlo onde se observou uma atividade significativamente mais elevada comparativamente ao grupo tratado com IBA ($P\leq 0,001$). Este resultado é concordante com os resultados obtidos na análise da expressão génica e proteica. Comparando amostras recolhidas em diferentes tempos, no grupo controlo a atividade da enzima atingiu valores mínimos às 6h, aumentando significativamente até às 72h. Já no grupo tratado com IBA, a atividade também foi reduzida às 6h, aumentando significativamente às 24h ($P=0,001$) para diminuir de seguida às 72h, embora se tenha mantido significativamente mais elevada quando comparada com as 6h ($P=0,031$).

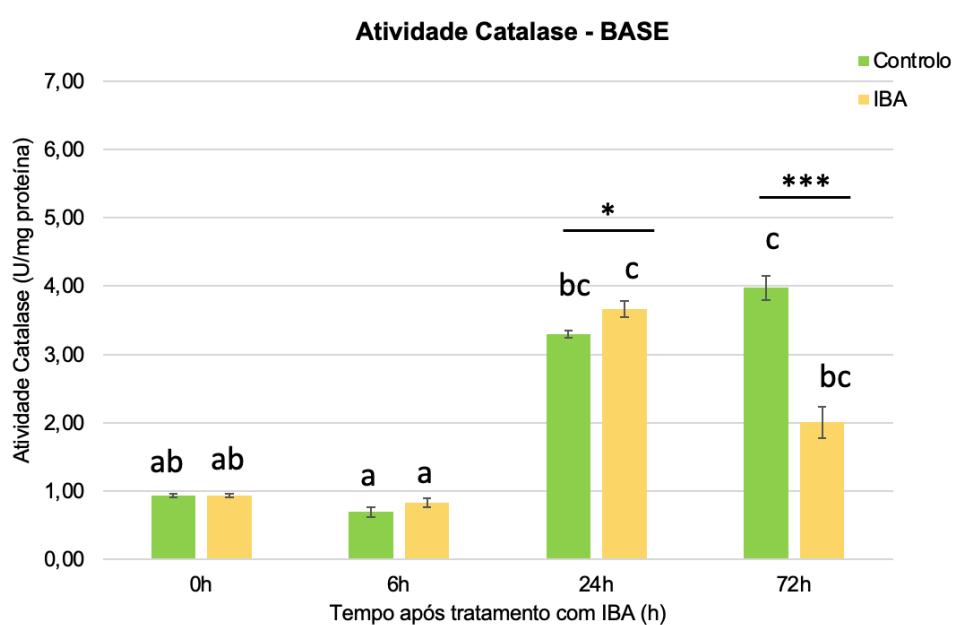
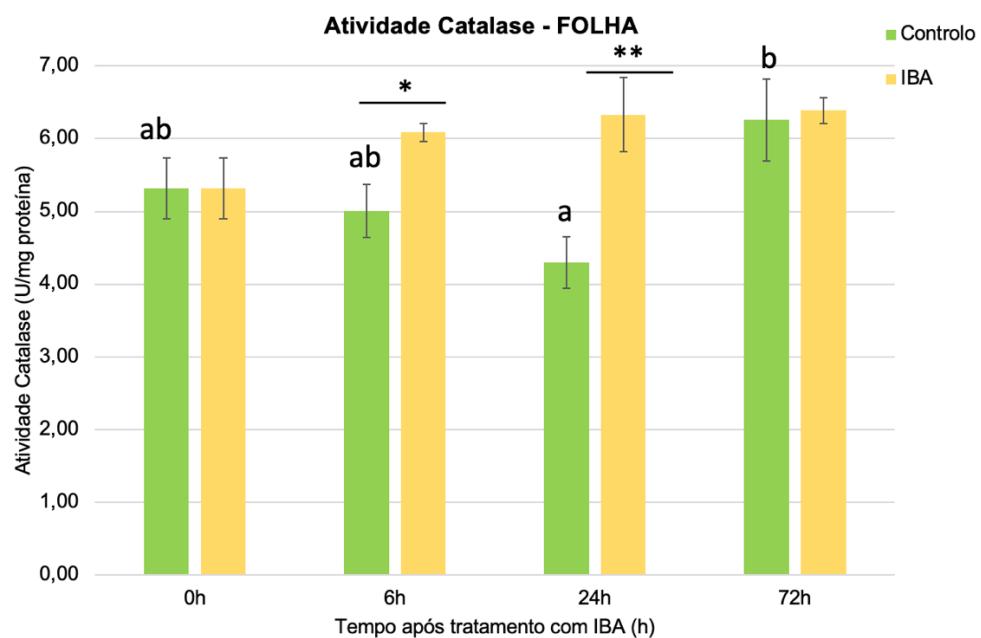


Figura 17 – Atividade enzimática da Catalase (CAT) da base do caule de microestacas de oliveira (*Olea europaea* L.) tratadas/não tratadas (Controlo) com IBA obtidas em diferentes tempos após a inoculação em meio de enraizamento (0h, 6h, 24h e 72h). Os dados correspondem à média ± EPM e * indica a existência de diferenças significativas entre os grupos controlo e IBA em cada tempo de análise. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes *timepoints*.

Vários estudos demonstraram o papel das enzimas oxidativas ao longo do processo de enraizamento adventício (Cheniany et al., 2010; Fu et al., 2011; Macedo et al., 2013). As enzimas peroxidase (POX), por exemplo, têm sido utilizadas como biomarcadores do processo de enraizamento, observando-se, no geral, valores mínimos de atividade na fase de indução e valores máximos na fase de iniciação e desenvolvimento das raízes. Num estudo realizado por Macedo et al. (2013) verificou-se uma diminuição da atividade da POX nas primeiras horas do processo de enraizamento –0 - 4h) e durante a fase final de indução (48-96h). O declínio da atividade nas primeiras 4 horas foi atribuído ao tratamento dos explantes com IBA, sendo muito provável que a aplicação exógena da auxina tenha uma redução na atividade da enzima (Cho et al., 2011). Já o segundo declínio (48 – 96h) terá sido coincidente com os primeiros sinais de alterações morfológicas nas células meristemáticas durante a fase de indução. Pelo contrário, a enzima PPO apresentou valores estáveis nas primeiras horas do processo de enraizamento, aumentando significativamente a sua atividade entre as 48 e 144 horas.

Apesar de existirem vários estudos que reportam o papel do IBA na atividade das enzimas antioxidantes envolvidas no processo de enraizamento, os resultados são altamente dependentes do genótipo (espécie e/ou cultivar), sendo por vezes contraditórios. Num estudo realizado em estacas de oliveira incluindo cultivares de difícil e fácil enraizamento, os autores constataram atividade das enzimas POX e PPO mais elevada no grupo de plantas controlo, comparativamente ao tratado com IBA (Denaxa et al., 2019). Noutro estudo realizado por Ilczuk e Jacygrad (2016) os autores observaram uma diminuição da atividade das enzimas POX e PPO em microestacas de planta do tabaco (*Cotinus coggygria* Scop.) induzidas em meio suplementado com a auxina IBA, durante os primeiros cinco dias. Macedo et al. (2013) verificaram uma diminuição da atividade da POX nas primeiras 8h da fase de indução do enraizamento adventício em microestacas de oliveira cv. ‘Galega vulgar’, e um aumento significativo da mesma enzima às 24h em meio suplementado com IBA. No entanto, este estudo não faz a comparação com um grupo controlo, ou seja, sem a presença de IBA. Que seja do nosso conhecimento, não existem estudos na literatura com foco na relação entre a presença de auxina e atividade da enzima CAT durante o processo de enraizamento em oliveira, o que impossibilita a comparação com resultados prévios.

De acordo com a bibliografia, existem poucos estudos acerca do papel da enzima CAT no processo de enraizamento adventício, principalmente em oliveira. Num estudo de 2009, Li et al. (Li et al., 2009a) estudaram o papel desta enzima no processo

de enraizamento de *Vigna radiata* L., tendo sido demonstrado que a atividade da enzima se manteve estável ao longo do processo. Os autores colocaram a hipótese da enzima sofrer inativação por parte do seu substrato, o H₂O₂. Resultado muito semelhante foi previamente reportado pelos mesmos autores (Li et al., 2007) durante a formação de raízes adventícias *Cucumis sativus*, onde a aplicação de CAT exógena não eliminou o H₂O₂ endógeno e não teve efeito no processo de enraizamento. Estes resultados não são concordantes com os resultados apresentados nesta dissertação, onde se verificou uma variação significativa da atividade da CAT ao longo da fase de indução, o que é justificado pelo facto do estudo ser feito numa espécie diferente. Que seja do nosso conhecimento, o trabalho apresentado nesta dissertação é o primeiro que relaciona a atividade da CAT na fase de indução do processo de enraizamento em oliveira.

O envolvimento de enzimas na eliminação das ROS foi investigado em diferentes espécies de plantas durante o processo de formação de raízes adventícias (Cardoso et al., 2022). No caso da enzima CAT (EC 1.11.1.6), esta é responsável pela eliminação do H₂O₂ superproduzido, mediando a dismutação do H₂O₂ em água e oxigénio de forma eficiente (Anjum et al., 2016). Os peroxissomas são o local central da atividade da CAT em resposta à produção de H₂O₂ como resultado do stress oxidativo, do catabolismo das purinas, da fotorrespiração e da β-oxidação de ácidos gordos. Contudo, estudos recentes mostram a sua presença no citosol, cloroplastos, mitocôndrias e outros compartimentos subcelulares. Apesar de apresentar uma elevada especificidade para o H₂O₂, a CAT apresenta também afinidade para peróxidos orgânicos (Zandi & Schnug, 2022). Neste trabalho, nas amostras de folha e base de plantas tratadas com IBA, os níveis de ROS e atividade da CAT apresentaram um comportamento inversamente proporcional quando se compara os diferentes tempos da fase de indução em oliveira. Enquanto os níveis de ROS aumentaram significativamente até às 6h, diminuindo a partir daí até às 72h, a atividade da enzima catálase manteve-se elevada ao longo do tempo (sem diferenças significativas entre os tempos) nas amostras de folha e aumentou significativamente das 6h para as 24h nas amostras de base. Esta diminuição dos níveis de ROS e aumento da atividade da CAT é um resultado expectável, visto que a enzima é ativada precisamente para eliminar as ROS em excesso (*ROS scavengers*) e manter o equilíbrio redox nas células. No caso das amostras do grupo controlo, o mesmo comportamento é observado às 72h, onde níveis mais baixos de ROS contrastaram com níveis elevados de atividade enzimática. Este resultado verificou-se tanto nas amostras de folha, como em base de microestaca. Através de uma análise de correlação foi possível identificar a existência de uma correlação negativa moderada entre os níveis de ROS e a atividade enzimática da CAT nas amostras de base tratadas

com IBA ($P= -0.552$), sendo visível na figura 14 e 17. Este resultado corrobora o papel da enzima CAT como reguladora dos níveis de ROS nas plantas durante o stress ambiental provocado por diferentes fatores bióticos e abióticos. Estudos anteriores reportaram o composto H_2O_2 , uma das principais espécies reativas de oxigénio, como sendo responsável pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD, APX, CAT e NADPH oxidase (Agarwal et al., 2005; Sairam & Srivastava, 2000; Tian et al., 2003). Apesar destes estudos não terem sido realizados em oliveira, contribuem para melhor compreender a relação entre os níveis de ROS e a atividade das enzimas antioxidantes.

5. Conclusões e perspetivas futuras

A formação de raízes adventícias é uma etapa fundamental na propagação vegetativa de qualquer espécie vegetal. A oliveira (*Olea europaea* L.), uma espécie propagada recorrendo a protocolos de propagação vegetativa (estacaria semi-lenhosa ou microestacaria), apresenta algumas cultivares em que o processo de enraizamento adventício é extremamente difícil, limitando a sua multiplicação e ulterior disponibilização de material vegetal para plantação de novos olivais. Apesar da investigação desenvolvida procurar compreender os mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos envolvidos neste processo biológico, existem ainda muitas lacunas no conhecimento que permitam a aplicação prática dos resultados até então obtidos.

Numa tentativa de contribuir para o conhecimento acerca dos mecanismos moleculares que controlam a eficiência do processo de enraizamento adventício foi considerado como objetivo principal desta dissertação explorar o envolvimento dos Fatores de Transcrição pertencentes à família UPBEAT (UPB1) na regulação de genes associados à homeostase das ROS, previamente identificadas como moléculas envolvidas na sinalização do estímulo do enraizamento adventício em oliveira.

O trabalho de identificação dos UPB1 em oliveira permitiu classificar cinco transcritos, sendo dois considerados como cópias devido ao elevado nível de similaridade entre as sequências. As restantes sequências foram classificadas como *OeUPB1a*, *OeUPB1b*, *OeUPB1c* e *OeUPB1d*. Dos quatro genes considerados apenas para os *OeUPB1a* e *OeUPB1b* foram detetados transcritos por RT-qPCR, corroborando resultados prévios obtidos por RNAseq. Ambos os genes se apresentaram, regra geral, sobreexpresos nas amostras tratadas com IBA, comparativamente ao controlo.

Considerando referências prévias sobre o papel dos UPB1s na regulação de genes que codificam enzimas oxidativas, foi analisada a expressão de genes que codificam três enzimas envolvidas na eliminação das ROS e manutenção da homeostase celular, o *OeCAT*, o *OeSOD* e o *OeAPX*. Esta análise foi realizada em amostras obtidas da base do caule das microestacas e amostras das folhas.

A análise da expressão génica na base do caule revelou expressão diferencial dos três genes comparando entre as condições controlo, apenas sujeita ao corte, e as amostras tratadas IBA, regra geral associado a uma sobreexpressão em amostras tratadas com IBA. O padrão de expressão dos genes *OeAPX* e *OeSOD* revelou-se relativamente similar entre amostras controlo e tratadas com IBA. Contrariamente, o gene *OeCAT* apresentou um padrão de expressão distinto entre as duas condições

consideradas. Uma análise de correlação identificou a existência de uma correlação negativa entre a expressão deste e o *OeUPB1a*, permitindo colocar como hipótese a atividade deste TF como supressor da *OeCAT* durante a fase de indução do enraizamento adventício em oliveira. O envolvimento do *OeUPB1a* na regulação da *OeCAT* durante o processo de enraizamento deverá ser validado em investigações futuras considerando por exemplo o silenciamento do gene *OeUPB1a* ou a mutagénese de locais *cis* no promotor do gene *OeCAT* por transformação genética e ulterior análise da expressão de ambos os genes, complementada pela quantificação dos níveis de ROS.

Nas folhas a análise da expressão génica revelou-se semelhante entre os genes *OeUPB1a* e *OeUPB1b* nos dois tratamentos (Controlo e IBA), com uma diminuição da expressão ao longo do tempo do ensaio na condição controlo, enquanto nas amostras tratadas com IBA, se verificou um aumento de expressão com o nível máximo visível às 24h. Já nos três genes *OeCAT*, *OeAPX* e *OeSOD*, nas amostras tratadas com IBA, o padrão de expressão foi semelhante entre si e ao observado nos genes *OeUPB1a* e *OeUPB1b*. Contudo, nas amostras controlo, apenas o gene *OeAPX* apresentou um aumento gradual ao longo do tempo do ensaio, com o seu máximo às 72h, padrão inverso ao observados nos genes *OeUPB1a* e *OeUPB1b*.

O desenvolvimento de raízes adventícias é considerado uma resposta morfogénica aos dois fatores de stress, o corte aquando da preparação da microestaca, e a aplicação da auxina IBA, fatores que ativam, numa primeira fase, vias de sinalização do estímulo do enraizamento. O estudo do envolvimento das ROS enquanto moléculas sinalizadoras no processo de enraizamento tem sido alvo de diversos estudos. Na presente dissertação observou-se, ao longo da fase de indução, uma diminuição dos níveis de ROS e um aumento da atividade da enzima CAT, resultado expectável e concordante com resultados obtidos em estudos anteriores considerando outras enzimas oxidativas. Resultado este corroborado pela análise da correlação entre os ROS e a enzima CAT onde se observou uma correlação negativa moderada nas amostras de base tratadas com IBA ($P=-0.552$). A CAT é responsável pela manutenção dos níveis de H_2O_2 , o que permite considerar esta espécie reativa de oxigénio como aquela que apresentará um papel preponderante na fase de indução estudada, sendo necessário restabelecer os seus níveis após desempenharem o seu papel de sinalização. Seria interessante em estudos futuros considerar a análise diferencial das diferentes ROS possibilitando assim validar esta hipótese.

De acordo com a bibliografia, ainda não existem estudos com foco no papel da enzima CAT no processo de enraizamento adventício. Que seja do nosso

conhecimento, o trabalho desenvolvido nesta dissertação foi o primeiro no qual se relacionou a atividade desta enzima com o processo de enraizamento em oliveira. No presente trabalho foi possível observar uma variação significativa da atividade desta enzima ao longo da fase de indução, tanto em plantas controlo, como tratadas com IBA.

O trabalho desenvolvido nesta dissertação contribuiu para o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do enraizamento adventício, em particular no envolvimento dos TFs pertencentes à família UPB1s na regulação de enzimas oxidativas e consequentemente no nível das ROS.

Em resposta à hipótese inicialmente colocada podemos de fato considerar que os OeUPB1 regulam a expressão de genes que codificam enzimas oxidativas, suprimindo a sua expressão e consequentemente regulando os níveis de ROS enquanto moléculas sinalizadoras do processo biológico. Além disso, das enzimas consideradas, a CAT parece ser o alvo da regulação das OeUPB1s durante a fase de indução.

6. Tabelas e Figuras suplementares

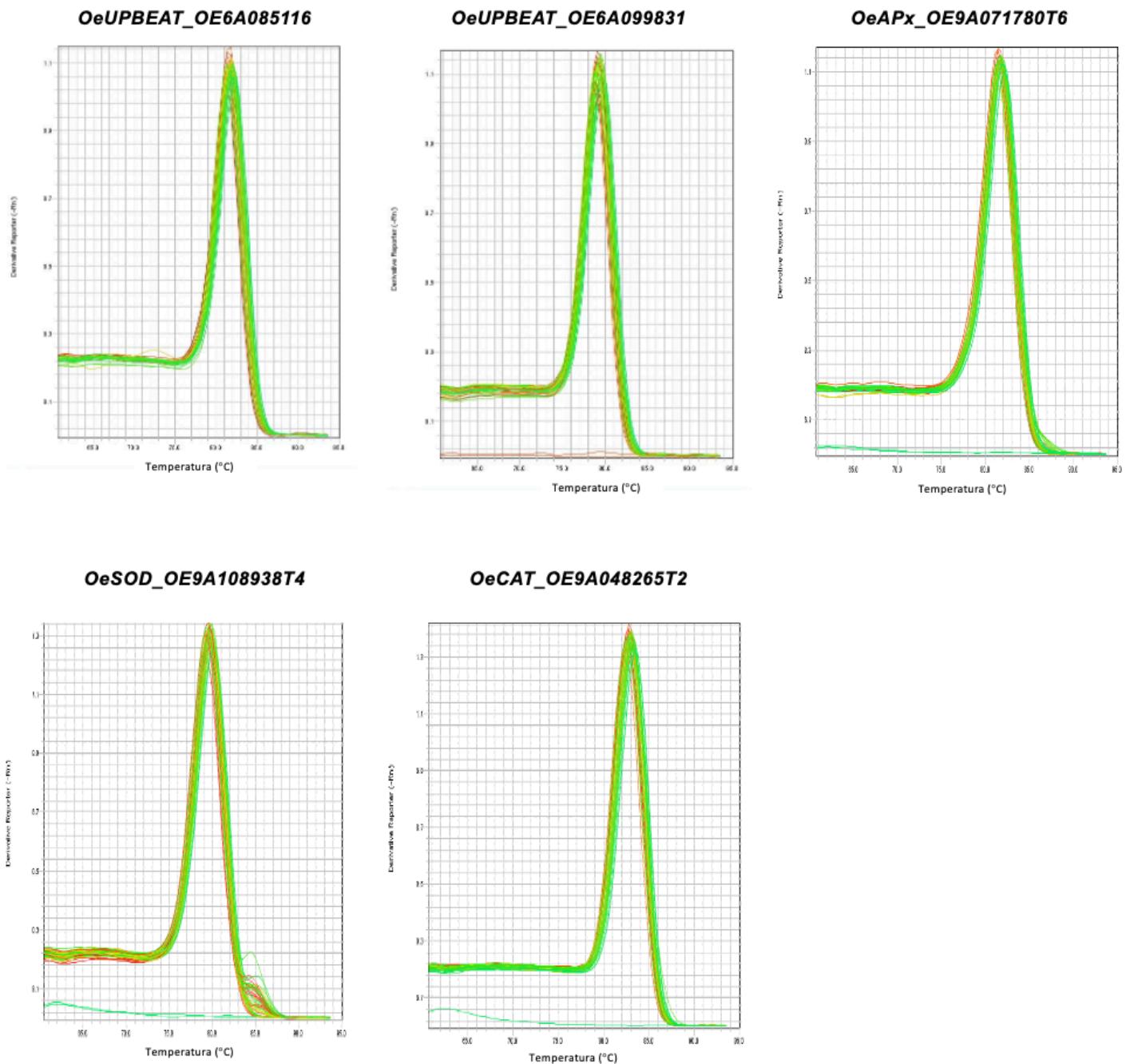
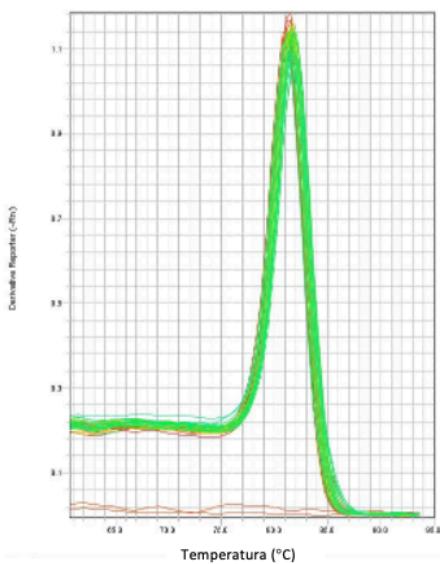
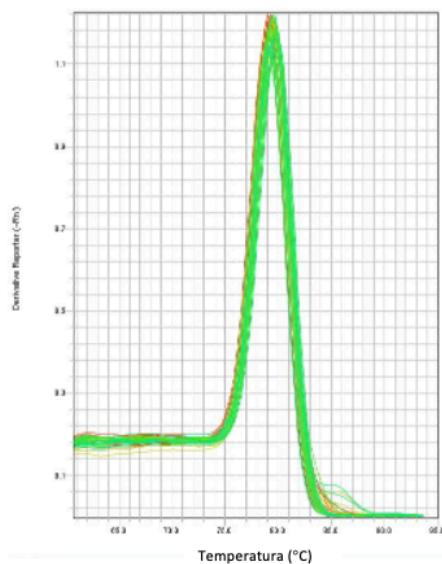


Figura A1 – Curvas de dissociação (*melting*) obtidas na análise da expressão dos genes *OE6A085116* – **OeUPB1a**, *OE6A099831* – **OeUPB1b**, *OeAPx*, *OeSOD* e *OeCAT* por RT-qPCR em amostras retiradas da base de microestacas de oliveira durante o processo de enraizamento adventício.

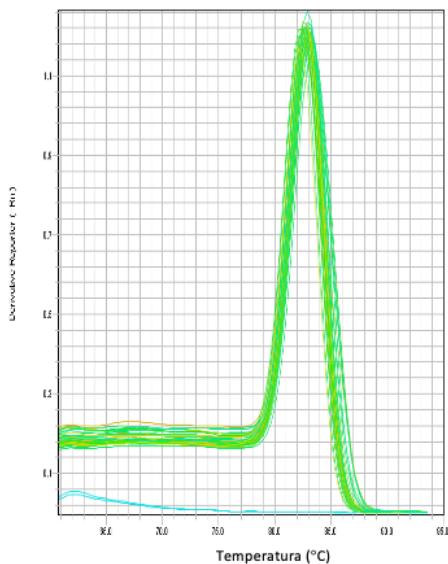
OeUPBEAT_OE6A085116



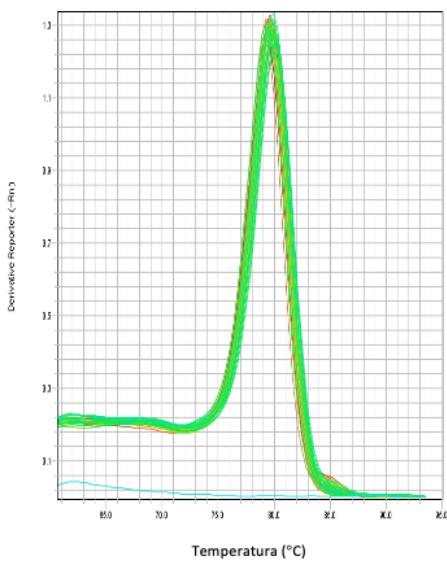
OeUPBEAT_OE6A099831



OeAPx_OE9A071780T6



OeSOD_OE9A108938T4



OeCAT_OE9A048265T2

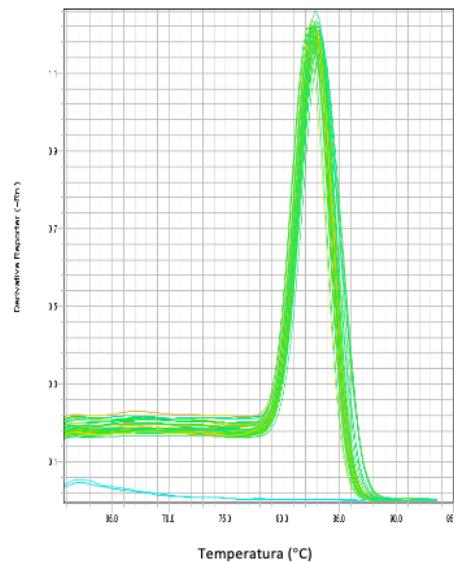


Figura A2 – Curvas de dissociação (*melting*) obtidas na análise da expressão dos genes *OE6A085116* – **OeUPB1a**, *OE6A099831* – **OeUPB1b**, *OeAPx*, *OeSOD* e *OeCAT*, por RT-qPCR em amostras de folha de oliveira durante o processo de enraizamento adventício.

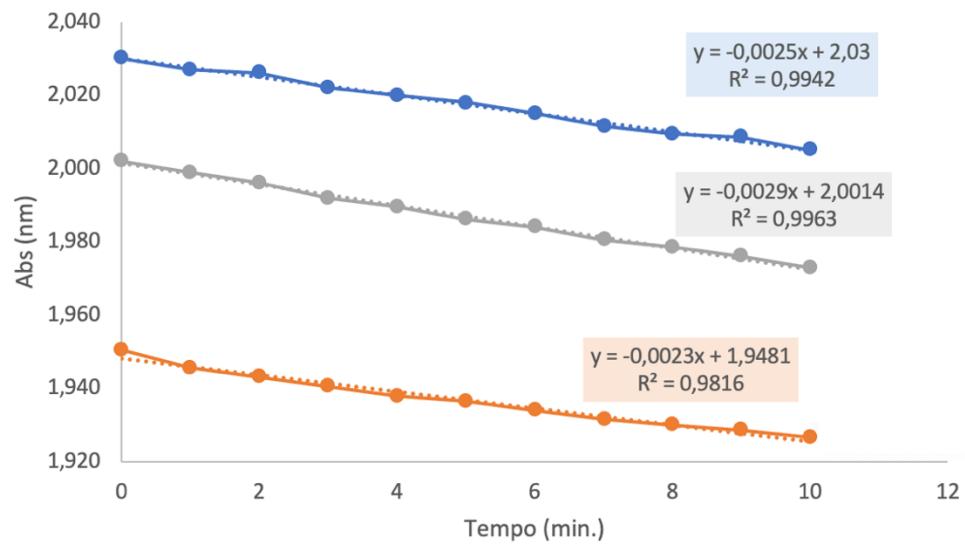


Figura A3 – Representação gráfica da curva de reação da Atividade enzimática CAT.

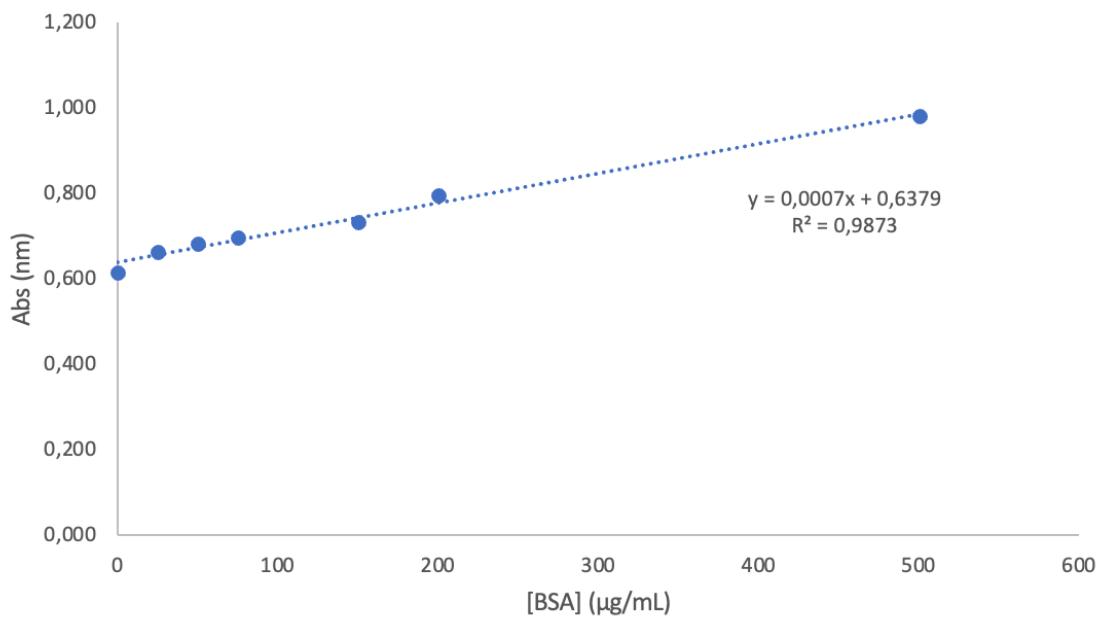


Figura A4 – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação do teor de proteína da CAT construída a partir da leitura de soluções padrão de BSA (0-500 $\mu\text{g/mL}$).

Especie Magnoliopsida	Acession
<i>Camelina sativa</i>	Csa04g066420.1
	Csa06g053810.1
	Csa05g001900.1
<i>Brassica oleracea</i>	Bo3g039590.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT4G16430.1
	AT5G39240.1
	AT4G38070.1
	AT1G32640.1
	AT1G06150.2
	AT2G47270.1
<i>Malus domestica Golden</i>	mRNA:MD17G0237300
<i>Arabis alpina</i>	AA4G264700
<i>Brassica rapa</i>	A05p001600
<i>Prunus persica</i>	PRUPE_3G008700
<i>Vigna angularis</i>	Vigan02g194800
<i>Corchorus capsularis</i>	CCACVL1_24243
<i>Citrus x clementina</i>	CICLE_v10022819mg
<i>Helianthus annuus</i>	HanXRQr2_Chr10g0426351
<i>Cynara cardunculus var. scolymus</i>	Ccrd_003430
<i>Olea europaea L.</i>	OE6A085116
	OE6A055347
	OE6A099831
	OE6A107214
	OE6A032918
<i>Prunus avium</i>	Pav sc0000491.1 g290.1.mk
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHAVU 007G089100g
<i>Vigna radiata</i>	Vradi08g17330
<i>Lactuca sativa</i>	gene-LSAT 9X4661

Tabela S1 - Correspondência com números de acesso e as espécies de plantas Magnoliopsida.

7. Bibliografia

- Agarwal, S., Sairam, R., Srivastava, G., Tyagi, A., & Meena, R. (2005). Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. *Plant Science*, 169(3), 559–570.
- Ahmad, P., Tripathi, D. K., Deshmukh, R., Pratap Singh, V., & Corpas, F. J. (2019). *Revisiting the role of ROS and RNS in plants under changing environment*.
- Albuquerque, T. G., Costa, H. S., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). An Overview of Portuguese Olive Oils and Table Olives with Protected Designation of Origin. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(5), 1800129. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800129>
- Ali, N., Chapuis, E., Tavoillot, J., & Mateille, T. (2014). Plant-parasitic nematodes associated with olive tree (*Olea europaea* L.) with a focus on the Mediterranean Basin: A review. *Comptes Rendus Biologies*, 337(7), 423–442. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2014.05.006>
- Almeida, M., Jr, A., Costa, C., Schwambach, J., Ruedell, C., Correa, L., & Fett-Neto, A. (2017). Environmental control of adventitious rooting in Eucalyptus and Populus cuttings. *Trees*, 31, <http://rdcu.be/rwnZ>. <https://doi.org/10.1007/s00468-017-1550-6>
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., Mohamed, A. A., Thangavel, P., Devi, G. D., Vasudhevan, P., Sofo, A., Khan, N. A., Misra, A. N., Lukatkin, A. S., Singh, H. P., Pereira, E., & Tuteja, N. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—Representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19002–19029. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Bacelar, E., Gonçalves, B., Moutinho Pereira, J., & Correia, C. (2009). *Botânica e Morfologia da Oliveira* (pp. 9–15).
- Bagnoli, F., Danti, S., Magherini, V., Cozza, R., Innocenti, A. M., & Racchi, M. L. (2004). Molecular cloning, characterisation and expression of two catalase genes from peach.

Functional Plant Biology, 31(4), 349–357.

Balakrishnamurthy, G., & Rao, V. N. M. (1988). CHANGES IN PHENOLS DURING RHIZOGENESIS IN ROSE (ROSA BOURBONIANA DESP). *Current Science*, 57(17), 960–962. JSTOR.

Begum, H., Murugesan, P., & Tangutur, A. D. (2022). Western blotting: A powerful staple in scientific and biomedical research. *BioTechniques*, 73(1), 58–69. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0003>

Benson, E. E. (2000). In vitro Plant Recalcitrance: An Introduction. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 36(3), 141–148. JSTOR.

Berwal, M. K., & Ram, C. (2018). Superoxide Dismutase: A Stable Biochemical Marker for Abiotic Stress Tolerance in Higher Plants. Em Alexandre Bosco de Oliveira (Ed.), *Abiotic and Biotic Stress in Plants* (p. Ch. 7). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82079>

Bhattacharya, N. (1988). Enzyme activities during adventitious rooting. *Advances in plant sciences series (USA)*.

Bilal, R., Liu, C., Zhao, H., Wang, Y., Farag, M., Alagawany, M., Hassan, F., Elnesr, S., Elwan, H., Qiu, H., & Lin, Q. (2021). Olive Oil: Nutritional Applications, Beneficial Health Aspects and its Prospective Application in Poultry Production. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.723040>

Binder, B. M. (2020). Ethylene signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 295(22), 7710–7725. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010854>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1–2), 248–254.

Cardoso, H. G., Nogales, A., Frederico, A. M., Svensson, J. T., Macedo, E. S., Valadas, V., & Arnholdt-Schmitt, B. (2015). Exploring AOX gene diversity. Em *Alternative respiratory pathways in higher plants* (pp. 239–254). <https://doi.org/10.1002/9781118789971.ch12>

Cardoso, H., Peixe, A., Bellini, C., Porfírio, S., & Druge, U. (2022). Editorial: Advances on the Biological Mechanisms Involved in Adventitious Root Formation: From Signaling

to Morphogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 13.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.867651>

Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martínez-García, J. F., Bilbao-Castro, J. R., & Robertson, D. L. (2010). Genome-Wide Classification and Evolutionary Analysis of the bHLH Family of Transcription Factors in Arabidopsis, Poplar, Rice, Moss, and Algae. *Plant Physiology*, 153(3), 1398–1412. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153593>

Castellanos, M., Mothi, N., & Muñoz, V. (2020). Eukaryotic transcription factors can track and control their target genes using DNA antennas. *Nature Communications*, 11(1), 540.

Charya, L. S., & Garg, S. (2019). Advances in methods and practices of ectomycorrhizal research. In *Advances in Biological Science Research* (pp. 303–325). Elsevier.

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61, 192–208.

Cheniany, M., Ebrahimzadeh, H., Masoudi-nejad, A., Vahdati, K., & Leslie, C. (2010). Effect of endogenous phenols and some antioxidant enzyme activities on rooting of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Afr J Plant Sci*, 4(12), 479–487.

Chi, Y. H., Paeng, S. K., Kim, M. J., Hwang, G. Y., Melencion, S. M., Oh, H. T., & Lee, S. Y. (2013). Redox-dependent functional switching of plant proteins accompanying with their structural changes. *Frontiers in Plant Science*, 4.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00277>

Chia, S., & Lim, M. (2022). A critical review on the influence of humidity for plant growth forecasting. 1257(1), 012001.

Cho, H.-Y., Chang, C.-Y., Huang, L.-C., Tsai, J.-B., & Liu, Z.-H. (2011). Indole-3-butyric acid suppresses the activity of peroxidase while inducing adventitious roots in *Cinnamomum kanehirae*. *Botanical Studies*, 52, 153–160.

Chowdhary, A. A., Mishra, Dr. S., Mehrotra, S., Upadhyay, S., Bagal, D., & Srivastava, V. (2023). *Plant transcription factors: An overview of their role in plant life* (pp. 3–20).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90613-5.00003-0>

Cooper, W. C. (1935). Hormones in Relation to Root Formation on Stem Cuttings1. *Plant Physiology*, 10(4), 789–794. <https://doi.org/10.1104/pp.10.4.789>

Corpas, F. J., Palma, J. M., Sandalio, L. M., López-Huertas, E., Romero-Puertas, M. C., Barroso, J. B., & Del Río, L. A. (1999). Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: Identification of five different isoforms. *Free Radical Research*, 31, S235–S242.

Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2014.00053>

Depuydt, S., & Hardtke, C. S. (2011). Hormone Signalling Crosstalk in Plant Growth Regulation. *Current Biology*, 21(9), R365–R373. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.013>

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2023). *Registo Nacional de Variedades de Fruteiras*, 20-22. https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2023/03/DGAV_RNVF_2023_2Edi.pdf

Dias, M. C., Correia, C., Moutinho-Pereira, J., Oliveira, H., & Santos, C. (2014). Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(2), 213–224. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0434-3>

Dietz, K.-J. (2013). Redox Regulation of Transcription Factors in Plant Stress Acclimation and Development. *Antioxidants & redox signaling*, 21. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5672>

Dob, A., Lakehal, A., Novak, O., & Bellini, C. (2021). Jasmonate inhibits adventitious root initiation through repression of CKX1 and activation of RAP2.6L transcription factor in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 72(20), 7107–7118. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab358>

Domínguez, L., Sosa-Peinado, A., & Hansberg, W. (2010). Catalase evolved to concentrate H₂O₂ at its active site. *Heme Peroxidases*, 500(1), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.017>

Dunand, C., Crèvecoeur, M., & Penel, C. (2007). Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: Possible interaction with peroxidases. *New Phytologist*, 174(2), 332–341.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time

and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>

Eljebbawi, A., Guerrero, Y. del C. R., Dunand, C., & Estevez, J. M. (2021). Highlighting reactive oxygen species as multitaskers in root development. *iScience*, 24(1), 101978. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101978>

Fanelli, V., Mascio, I., Falek, W., Miazzi, M. M., & Montemurro, C. (2022). Current Status of Biodiversity Assessment and Conservation of Wild Olive (*Olea europaea* L. subsp. *Europaea* var. *Sylvestris*). *Plants*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/plants11040480>

Feng, K., Yu, J., Cheng, Y., Ruan, M., Wang, R., Ye, Q., Zhou, G., Li, Z., Yao, Z., Yang, Y., Zheng, Q., & Wan, H. (2016). The SOD Gene Family in Tomato: Identification, Phylogenetic Relationships, and Expression Patterns. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01279>

Fett-Neto, A. G., Fett, J. P., Goulart, L. W. V., Pasquali, G., Termignoni, R. R., & Ferreira, A. G. (2001). Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*, 21(7), 457–464.

Fortuna, P., Morini, S., & Giovannetti, M. (1998). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on in vivo root initiation and development of micropropagated plum shoots. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73(1), 19–28.

Fraga, H., Moriondo, M., Leolini, L., & Santos, J. A. (2021). Mediterranean Olive Orchards under Climate Change: A Review of Future Impacts and Adaptation Strategies. *Agronomy*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy11010056>

Frenkel, C., & Hess, C. E. (1974). Isozymic changes in relation to root initiation in mung bean. *Canadian Journal of Botany*, 52(2), 295–297. <https://doi.org/10.1139/b74-038>

Fu, Z., Xu, P., He, S., Teixeira da Silva, J., & Tanaka, M. (2011). Dynamic changes in enzyme activities and phenolic content during in vitro rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) plantlets. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 5, 252–265.

Gajewska, E., Skłodowska, M., Ślaba, M., & Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia plantarum*, 50, 653–659.

Garg, N., & Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosystems*, 143(1), 81–96.

Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J. F., Berthon, J.-Y., & Ripetti, V. (1992). Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of microp propagated shoots. <http://dx.doi.org/10.1051/agro:19921003>, 12. <https://doi.org/10.1051/agro:19921003>

Geiss, G., Gutierrez, L., & Bellini, C. (2009). Adventitious Root Formation: New Insights and Perspectives. Em *Annual Plant Reviews Volume 37: Root Development* (pp. 127–156). <https://doi.org/10.1002/9781444310023.ch5>

Guerrero, N., López, M., Caudullo, G., & de Rigo, D. (2016). *Olea europaea in Europe: Distribution, habitat, usage and threats*.

Han, X., Zhao, Y., Chen, Y., Xu, J., Jiang, C., Wang, X., Zhuo, R., Lu, M.-Z., & Zhang, J. (2022). Lignin biosynthesis and accumulation in response to abiotic stresses in woody plants. *Forestry Research*, 2(1).

Haq, I. ul, Umar, H., Akhtar, N., Iqbal, M. A., & Ijaz, M. F. (2021). Techniques for Micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.): A Systematic Review. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 34. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:234221515>

Hashmi, M. A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U., & Perveen, S. (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2015, 541591. <https://doi.org/10.1155/2015/541591>

Hatzilazarou, S. P., Syros, T. D., Yupsanis, T. A., Bosabalidis, A. M., & Economou, A. S. (2006). Peroxidases, lignin and anatomy during in vitro and ex vitro rooting of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. *Journal of Plant Physiology*, 163(8), 827–836. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.06.018>

Hedayati, V., Mousavi, A., Razavi, K., Cultrera, N., Alagna, F., Mariotti, R., Hosseini-Mazinani, M., & Baldoni, L. (2015). Polymorphisms in the AOX2 gene are associated with the rooting ability of olive cuttings. *Plant Cell Reports*, 34(7), 1151–1164. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1774-0>

Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A Large Family of Class

III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462–468.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>

Hong, J. C. (2016). Chapter 3—General Aspects of Plant Transcription Factor Families. Em D. H. Gonzalez (Ed.), *Plant Transcription Factors* (pp. 35–56). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00003-8>

Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296–1297.

Hussain, S., Naseer, B., Qadri, T., Fatima, T., & Bhat, T. (2021). Olive (*Olea europaea L.*)—Morphology, Taxonomy, Composition and Health Benefits (pp. 117–129).
https://doi.org/10.1007/978-3-030-75502-7_9

Ilczuk, A., & Jacygrad, E. (2016). The effect of IBA on anatomical changes and antioxidant enzyme activity during the in vitro rooting of smoke tree (*Cotinus coggygria Scop.*). *Scientia horticulturae*, 210, 268–276.

Jambunathan, N. (2010). Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 639, 292–298. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_18

Jiang, W., Yang, L., He, Y., Zhang, H., Li, W., Chen, H., Ma, D., & Yin, J. (2019). Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of superoxide dismutase (SOD) family in wheat (*Triticum aestivum*). *PeerJ*, 7, e8062.
<https://doi.org/10.7717/peerj.8062>

Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., & Fankhauser, C. (2010). Chapter Two—Light-Regulated Plant Growth and Development. Em M. C. P. Timmermans (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 91, pp. 29–66). Academic Press.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91002-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91002-8)

Karabaghi, C., Frey-Klett, P., Sotta, B., Bonnet, M., & Le Tacon, F. (1998). In vitro effects of *Laccaria bicolor* S238 N and *Pseudomonas fluorescens* strain BBc6 on rooting of de-rooted shoot hypocotyls of Norway spruce. *Tree Physiology*, 18(2), 103–111.

Kazan, K., & Manners, J. M. (2013). MYC2: The Master in Action. *Molecular Plant*, 6(3), 686–703. <https://doi.org/10.1093/mp/sss128>

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics

Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293.

Legué, V., Rigal, A., & Bhalerao, R. P. (2014). Adventitious root formation in tree species: Involvement of transcription factors. *Physiologia Plantarum*, 151(2), 192–198. <https://doi.org/10.1111/ppl.12197>

Li, J., Wang, T., Han, J., & Ren, Z. (2020). Genome-wide identification and characterization of cucumber bHLH family genes and the functional characterization of CsbHLH041 in NaCl and ABA tolerance in *Arabidopsis* and cucumber. *BMC Plant Biology*, 20(1), 272. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02440-1>

Li, M., Sun, L., Gu, H., Cheng, D., Guo, X., Chen, R., Wu, Z., Jiang, J., Fan, X., & Chen, J. (2021). Genome-wide characterization and analysis of bHLH transcription factors related to anthocyanin biosynthesis in spine grapes (*Vitis davidii*). *Scientific Reports*, 11(1), 6863. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85754-w>

Li, S.-W. (2021). Molecular Bases for the Regulation of Adventitious Root Generation in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.614072>

Li, S.-W., Xue, L., Xu, S., Feng, H., & An, L. (2007). Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. *Plant Growth Regulation*, 52, 173–180. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9188-9>

Li, S.-W., Xue, L., Xu, S., Feng, H., & An, L. (2009a). Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 65(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.06.004>

Li, S.-W., Xue, L., Xu, S., Feng, H., & An, L. (2009b). IBA-induced changes in antioxidant enzymes during adventitious rooting in mung bean seedlings: The role of H₂O₂. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 442–450.

Li, S.-W., Xue, L., Xu, S., Feng, H., & An, L. (2009c). Mediators, Genes and Signaling in Adventitious Rooting. *The Botanical Review*, 75(2), 230–247. <https://doi.org/10.1007/s12229-009-9029-9>

Li, T., Lei, W., He, R., Tang, X., Han, J., Zou, L., Yin, Y., Lin, H., & Zhang, D. (2020).

Brassinosteroids regulate root meristem development by mediating BIN2-UPB1 module in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics*, 16(7), e1008883. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008883>

Li, T., Yang, S., Kang, X., Lei, W., Qiao, K., Zhang, D., & Lin, H. (2019). The bHLH transcription factor gene AtUPB1 regulates growth by mediating cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 518(3), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.088>

Liao, W., Huang, G., Yu, J., Zhang, M., & Shi, X. (2011). Nitric oxide and hydrogen peroxide are involved in indole-3-butyric acid-induced adventitious root development in marigold. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(2), 159–165. <https://doi.org/10.1080/14620316.2011.11512742>

Liao, W.-B., Xiao, L., & Zhang, M.-L. (2010). Effect of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide on Adventitious Root Development from Cuttings of Ground-Cover Chrysanthemum and Associated Biochemical Changes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29, 338–348. <https://doi.org/10.1007/s00344-010-9140-5>

Lin, J.-J., Yu, C.-P., Chang, Y.-M., Chen, S. C.-C., & Li, W.-H. (2014). Maize and millet transcription factors annotated using comparative genomic and transcriptomic data. *BMC Genomics*, 15(1), 818. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-818>

Ma, Q., Grones, P., & Robert, S. (2018). Auxin signaling: A big question to be addressed by small molecules. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 313–328. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx375>

Macedo, E. (2013). Studies on the potential of alternative oxidase (AOX) as a functional marker candidate for efficient adventitious rooting in olive (*Olea europaea* L.). [Tese de Doutoramento, Universidade de Évora]. <https://dspace.uevora.pt/rdpc/handle/10174/11443>

Macedo, E., Vieira, C., Carrizo, D., Porfirio, S., Hegewald, H., Arnholdt-Schmitt, B., Calado, M. L., & Peixe, A. (2013). Adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.) microshoots: Anatomical evaluation and associated biochemical changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(1), 53–59. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512935>

Mancuso, S. (1999). Seasonal dynamics of electrical impedance parameters in shoots

and leaves relate to rooting ability of olive (*Olea Europaea*) cuttings. *Tree physiology*, 19, 95–101. <https://doi.org/10.1093/treephys/19.2.95>

Mao, Y.-B., Liu, Y.-Q., Chen, D.-Y., Chen, F.-Y., Fang, X., Hong, G.-J., Wang, L.-J., Wang, J.-W., & Chen, X.-Y. (2017). Jasmonate response decay and defense metabolite accumulation contributes to age-regulated dynamics of plant insect resistance. *Nature communications*, 8(1), 13925.

Materatski, P., Varanda, C., Carvalho, T., Dias, A. B., Campos, M. D., Rei, F., & Félix, M. D. (2018). Diversity of *Colletotrichum* Species Associated with Olive Anthracnose and New Perspectives on Controlling the Disease in Portugal. *Agronomy*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/agronomy8120301>

Mhamdi, A., Noctor, G., & Baker, A. (2012). Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 181–194.

Mullineaux, P. M., & Rausch, T. (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research*, 86(3), 459–474. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-8811-8>

Muranaka, T., & Saito, K. (2010). 3.17—Production of Pharmaceuticals by Plant Tissue Cultures. Em H.-W. (Ben) Liu & L. Mander (Eds.), *Comprehensive Natural Products II* (pp. 615–628). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00065-4>

Nag, S., Saha, K., & Choudhuri, M. (2001). Role of Auxin and Polyamines in Adventitious Root Formation in Relation to Changes in Compounds Involved in Rooting. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20(2).

Nakagami, H., Soukupová, H., Schikora, A., Zárský, V., & Hirt, H. (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38697–38704.

Nelson, D. P., & Kiesow, L. A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, 49(2), 474–478. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90451-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90451-4)

Niemi, K., Salonen, M., Ernstsen, A., Heinonen-Tanski, H., & Häggman, H. (2000). Application of ectomycorrhizal fungi in rooting of Scots pine fascicular shoots. *Canadian Journal of Forest Research*, 30(8), 1221–1230. <https://doi.org/10.1139/x00-059>

Niu, X., & Fu, D. (2022). The Roles of BLH Transcription Factors in Plant Development and Environmental Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073731>

Noceda, C., Peixe, A., & Arnholdt-Schmitt, B. (2022). Selection of Reference Genes for Transcription Studies Considering Co-Regulation and Average Transcriptional Stability: Case Study on Adventitious Root Induction in Olive (*Olea europaea* L.) Microshoots. *Agronomy*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/agronomy12123201>

Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249–279.

Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J., & Ryan, C. A. (2001). Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *The Plant Cell*, 13(1), 179–191. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.179>

Pacurar, D. I., Perrone, I., & Bellini, C. (2014). Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia Plantarum*, 151(1), 83–96. <https://doi.org/10.1111/ppl.12171>

Palma, J. M., Mateos, R. M., López-Jaramillo, J., Rodríguez-Ruiz, M., González-Gordo, S., Lechuga-Sancho, A. M., & Corpas, F. J. (2020). Plant catalases as NO and H₂S targets. *Redox Biology*, 34, 101525. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101525>

Pang, X., Chen, J., Xu, Y., Liu, J., Zhong, Y., Wang, L., Zheng, J., & Wan, H. (2023). Genome-wide characterization of ascorbate peroxidase gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.) in response to multiple abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1189020.

Peixe, A., Raposo, A., Lourenço, R., Cardoso, H., & Macedo, E. (2007). Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 113(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.011>

Peñuelas, M., Monte, I., Schweizer, F., Vallat, A., Reymond, P., García-Casado, G., Franco-Zorrilla, J. M., & Solano, R. (2019). Jasmonate-related MYC transcription factors are functionally conserved in *Marchantia polymorpha*. *The Plant Cell*, 31(10), 2491–2509.

Pop, T., Pamfil, D., & Bellini, C. (2011). Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39, 307–316. <https://doi.org/10.15835/nbha3916101>

Porfirio, S., Calado, M. L., Noceda, C., Cabrita, M. J., da Silva, M. G., Azadi, P., & Peixe, A. (2016). Tracking biochemical changes during adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 204, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.029>

Porfírio, S., Silva, M. D. R. G. da, Cabrita, M. J., Azadi, P., & Peixe, A. (2016). Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*, 198, 207–226. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.034>

Porlingis, I., & Therios, I. (1976). Rooting response of juvenile and adult leafy olive cuttings to various factors. *Journal of Horticultural Science*, 51(1), 31–39.

QAMER, Z., CHAUDHARY, M. T., DU, X., HINZE, L., & AZHAR, M. T. (2021). Review of oxidative stress and antioxidative defense mechanisms in *Gossypium hirsutum* L. in response to extreme abiotic conditions. *Journal of Cotton Research*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s42397-021-00086-4>

Qian, Y., Zhang, T., Yu, Y., Gou, L., Yang, J., Xu, J., & Pi, E. (2021). Regulatory Mechanisms of bHLH Transcription Factors in Plant Adaptive Responses to Various Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.677611>

Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., & Mandzhieva, S. (2021). Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biology10040267>

Rambaut, A. (2010). *FigTree v1. 3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh*.

Rodrigues, N., Peres, F., Casal, S., Santamaria-Echart, A., Barreiro, F., Peres, A. M., & Alberto Pereira, J. (2023). Geographical discrimination of olive oils from Cv. 'Galega Vulgar'. *Food Chemistry*, 398, 133945. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133945>

Roussos, P. A. (2023). Adventitious Root Formation in Plants: The Implication of

Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide. *Antioxidants*, 12(4).
<https://doi.org/10.3390/antiox12040862>

Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J., & Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2479.

Rugini, E., Francesco, G., Muganu, M., Astolfi, S., & Caricato, G. (1997). The Effects of Polyamines and Hydrogen Peroxide on Root Formation in Olive and the Role of Polyamines as an Early Marker for Rooting Ability. Em *Plant Physiol Biochem* (Vols. 65–73, pp. 65–73). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5403-5_10

Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2021). Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. *Antioxidants*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/antiox10020277>

Sairam, R., & Srivastava, G. (2000). Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43, 381–386.

Salvador, C. (2014). Caracterização de Cogumelos Silvestres da Espécie Amanita Ponderosa: Produção de Metabolitos Com Atividade Biológica. [Tese de Doutoramento, Universidade de Évora]. <http://dspace.uevora.pt/rdpc/handle/10174/13391>

Santos Macedo, E., Cardoso, H. G., Hernández, A., Peixe, A. A., Polidoros, A., Ferreira, A., Cordeiro, A., & Arnholdt-Schmitt, B. (2009). Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. *Physiologia Plantarum*, 137(4), 532–552. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01302.x>

Santos Macedo, E., Sircar, D., Cardoso, H. G., Peixe, A., & Arnholdt-Schmitt, B. (2012). Involvement of alternative oxidase (AOX) in adventitious rooting of Olea europaea L. microshoots is linked to adaptive phenylpropanoid and lignin metabolism. *Plant Cell Reports*, 31(9), 1581–1590. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1272-6>

Sebastiani, L., & Tognetti, R. (2004). Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in Olea europaea L.(cvs ‘Frantoio’and ‘Gentile di Larino’) cuttings. *Scientia Horticulturae*, 100(1–4), 75–82.

Sharma, I., & Ahmad, P. (2014). Chapter 4—Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants. Em P. Ahmad (Ed.), *Oxidative Damage to Plants* (pp. 131–148). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6>

Silva, M. K. F. da, Siqueira, D. P., de Carvalho, G. C. M. W., Silva, R. de D., Silva, R. M. da R., & Barroso, D. G. (2022). Hydrogen peroxide enhanced indole-3-butyric acid effects on *Cordia trichotoma* adventitious rooting. *Rhizosphere*, 22, 100533. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100533>

Sorin, C., Bussell, J. D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., & Sandberg, G. (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *The Plant Cell*, 17(5), 1343–1359.

States Department of Agriculture, U. (2008). *United States Department of Agriculture Forest Service Agriculture Handbook 727 The Woody Plant Seed Manual*.

Steffens, B., & Rasmussen, A. (2016). The Physiology of Adventitious Roots. *Plant Physiology*, 170(2), 603–617. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01360>

Su, W., Raza, A., Gao, A., Jia, Z., Zhang, Y., Hussain, M. A., Mehmood, S. S., Cheng, Y., Lv, Y., & Zou, X. (2021). Genome-wide analysis and expression profile of superoxide dismutase (SOD) gene family in rapeseed (*Brassica napus* L.) under different hormones and abiotic stress conditions. *Antioxidants*, 10(8), 1182.

Sun, X., Wang, Y., & Sui, N. (2018). Transcriptional regulation of bHLH during plant response to stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(2), 397–401. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.123>

Syros, T., Yupsanis, T., Zafiriadis, H., & Economou, A. (2004). Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *Journal of Plant Physiology*, 161(1), 69–77. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00938>

Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30), 11030–11035.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Tehranifar, A., Tabar, S. M., Selahvarzi, Y., Balandary, A., & Kharrazi, M. (2014). Biochemical changes in barberries during adventitious root formation: The role of indole-3-butryic acid and hydrogen peroxide. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(2), 477–485.

Therios, I. (2009). *CROP PRODUCTION SCIENCE IN HORTICULTURE 18, OLIVES*.

Tian, M., Gu, Q., & Zhu, M. (2003). The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Science*, 165(4), 701–707. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00224-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00224-3)

Tikhomirova, T. S., Krutovsky, K. V., & Shestibratov, K. A. (2022). Molecular Traits for Adaptation to Drought and Salt Stress in Birch, Oak and Poplar Species. *Forests*, 14(1), 7.

Tognetti, V. B., Mühlenbock, P., & Van Breusegem, F. (2012). Stress homeostasis—the redox and auxin perspective. *Plant, cell & environment*, 35(2), 321–333.

Torres, M., Pierantozzi, P., Searles, P., Rousseaux, M. C., García-Inza, G., Miserere, A., Bodoira, R., Contreras, C., & Maestri, D. (2017). Olive Cultivation in the Southern Hemisphere: Flowering, Water Requirements and Oil Quality Responses to New Crop Environments. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01830>

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the national academy of sciences*, 76(9), 4350–4354.

Tsukagoshi, H., Busch, W., & Benfey, P. N. (2010). Transcriptional Regulation of ROS Controls Transition from Proliferation to Differentiation in the Root. *Cell*, 143(4), 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.020>

Tyagi, S., Shah, A., Karthik, K., Rathinam, M., Rai, V., Chaudhary, N., & Sreevathsa, R. (2022). Reactive oxygen species in plants: An invincible fulcrum for biotic stress mitigation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(18), 5945–5955. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12138-z>

Upadhyaya, A., Davis, T. D., & Sankhla, N. (1986). Some biochemical changes associated with paclobutrazol-induced adventitious root formation on bean hypocotyl cuttings. *Annals of botany*, 57(3), 309–315.

Velada, I., Cardoso, H., Porfirio, S., & Peixe, A. (2020). Expression Profile of PIN-Formed Auxin Efflux Carrier Genes during IBA-Induced In Vitro Adventitious Rooting in Olea europaea L. *Plants*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/plants9020185>

Velada, I., Grzebelus, D., Lousa, D., M. Soares, C., Santos Macedo, E., Peixe, A., Arnholdt-Schmitt, B., & G. Cardoso, H. (2018). AOX1-Subfamily Gene Members in Olea europaea cv. "Galega Vulgar"—Gene Characterization and Expression of Transcripts during IBA-Induced in Vitro Adventitious Rooting. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020597>

Veloccia, A., Fattorini, L., Della Rovere, F., Sofo, A., D'Angelis, S., Betti, C., Falasca, G., & Altamura, M. M. (2016). Ethylene and auxin interaction in the control of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6445–6458. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw415>

Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16, 1–10.

Wang, G., Wang, F., Huang, Q., Li, Y., Liu, Y., & Wang, Y. (2015). Understanding transcription factor regulation by integrating gene expression and DNase I hypersensitive sites. *BioMed research international*, 2015.

Wang, W., Zhang, X., Deng, F., Yuan, R., & Shen, F. (2017). Genome-wide characterization and expression analyses of superoxide dismutase (SOD) genes in *Gossypium hirsutum*. *BMC Genomics*, 18(1), 376. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3768-5>

Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, 217(6), 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>

Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of botany*, 100(4), 681–697.

Xia, X.-J., Zhou, Y.-H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C. H., & Yu, J.-Q. (2015). Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2839–2856. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv089>

Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., & Wang, C. (2019). The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in plant science*, 10, 1349.

Yoshida, K., Kaothien, P., Matsui, T., Kawaoka, A., & Shinmyo, A. (2003). Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(6), 665–670. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1157-7>

Zandi, P., & Schnug, E. (2022). Reactive Oxygen Species, Antioxidant Responses and Implications from a Microbial Modulation Perspective. *Biology*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/biology11020155>

Zhang, X., Luo, H., Xu, Z., Zhu, Y., Ji, A., Song, J., & Chen, S. (2015). Genome-wide characterisation and analysis of bHLH transcription factors related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Scientific Reports*, 5(1), 11244. <https://doi.org/10.1038/srep11244>