



2014

Efeito do pH e da fonte de azoto na cultura *in vitro* de medronheiro (*Arbutus unedo* L.)

Rui Alexandre Gomes Pereira



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeito do pH e da fonte de azoto na cultura *in vitro* de
medronheiro (*Arbutus unedo* L.)



Rui Alexandre Gomes Pereira

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeito do pH e da fonte de Azoto na cultura *in vitro* de medronheiro (*Arbutus unedo* L.)

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra).

Rui Alexandre Gomes Pereira

2014

Estudo financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, projeto PTDC/AGR-FOR/3746/2012 - *Arbutus unedo* plants and products quality improvement for the agro-forestry sector, com apoio do COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade.

Apoios:



Agradecimentos

No final desta etapa não posso deixar de agradecer a todos aqueles que me acompanharam, apoiaram, incentivaram e contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização do presente trabalho.

Antes de mais, agradeço aos meus pais por todo o apoio e pela confiança em mim depositada. Por me darem a oportunidade de frequentar o ensino superior nesta tão respeitável universidade.

Agradeço ao Professor Doutor Jorge Canhoto por todos os conhecimentos que me transmitiu ao longo do percurso académico. Por me ter aceite no seu grupo de trabalho, por todo o apoio, pela orientação e revisão científica, e sobretudo pela amizade e confiança.

À Dona Eulália Rosa agradeço por toda a ajuda que prestou ao longo de todos os trabalhos desenvolvidos, na manutenção dos meios de cultura, e em especial pelo seu sorriso sempre presente.

À Lara Currais pelo enorme apoio no início das atividades laboratoriais, por me introduzir às técnicas de micropropagação, pela disponibilidade e orientação nas fases iniciais de trabalho laboratorial.

À Sofia Vaz pelas dicas iniciais na micropropagação de medronheiro e pela disponibilização de material vegetal para os ensaios. À Ana e à Elsa pela ajuda e pelas dicas.

A todos os colegas de laboratório pelos bons momentos, pelos sorrisos, pela ajuda e pela amizade. Em especial ao João Martins que sempre se mostrou disponível para me ajudar no trabalho de laboratório e no esclarecimento de dúvidas.

À Patrícia, à Mariana e à Ana Rita por todos os bons momentos, pela amizade e motivação.

Ao meu amigo David Reis, por todos os bons momentos, por todo o apoio, pela revisão deste trabalho e sobretudo pela confiança.

Aos meus amigos Rúben, Maria João, Liliana, Marco, e a todos os outros que me apoiaram, motivaram e foram compreensivos pela minha ausência nalgumas ocasiões.

À Teresa por toda a disponibilidade, por todo o apoio, motivação e carinho que me deu durante este percurso. Por sempre ter acreditado em mim e apoiado nas minhas decisões. A ela, um obrigado muito especial!

A Coimbra por me acolher.

A todos, Muito Obrigado!

Índice

Resumo	vii
Abstract	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Contextualização do trabalho	3
1.2. <i>Arbutus unedo</i> L.	5
1.2.1. Taxonomia	5
1.2.2. Descrição botânica.....	5
1.2.3. Distribuição geográfica.....	7
1.2.4. Importância Económica e Etnobotânica	8
1.2.5. Importância ecológica.....	11
1.3. Propagação de <i>A. unedo</i>	12
1.3.1. Proliferação de meristemas	13
1.3.2. Embriogénese somática	14
1.3.3. Enraizamento	16
1.4. Meios de cultura	18
1.4.1. Efeito do pH.....	18
1.4.2. Efeito da Fonte de Azoto	19
1.5. Objetivos	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Material vegetal	27
2.2. Proliferação de meristemas	27
2.2.1. Meio sólido	27
2.2.2. Meio líquido.....	29

2.3. Embriogénese somática	30
2.4. Enraizamento	31
2.4.1. Fase de indução.....	31
2.4.2. Fase de alongamento radicular	31
2.4.3. Aclimação	32
2.5. Análise estatística	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Proliferação de meristemas	35
3.1.1. Proliferação em meio sólido	36
3.1.1.1. Efeito do pH	36
3.1.1.2. Efeito da fonte de Azoto.....	38
3.1.2. Proliferação em meio líquido.....	40
3.2. Embriogénese somática	42
3.3. Enraizamento	44
4. DISCUSSÃO	49
4.1. Proliferação de meristemas	51
4.1.1. Meio sólido	51
4.1.2. Meio líquido.....	53
4.2. Embriogénese somática	53
4.3. Enraizamento	56
5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Resumo

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.) é um arbusto, ou pequena árvore, comum nas florestas portuguesas. Pertence à família Ericaceae, a mesma que inclui outras espécies interessantes como os mirtilos ou as azáleas. Mede normalmente 3 a 5 metros de altura podendo, em condições excepcionais, atingir os 12 metros. Tolera diferentes condições climáticas, desde a seca às baixas temperaturas (até -12°C), e pode ser encontrado tanto em solos calcários (básicos) como siliciosos (ácidos). Encontra-se largamente distribuído ao longo da bacia do Mediterrâneo.

Apesar de ser tradicionalmente uma espécie NUC (Neglected or Underutilized Crop) é uma planta multifuncional, sendo utilizada para diversos fins. Dos frutos produzem-se compotas ou, por fermentação, é produzida a afamada aguardente de medronho. É atualmente reconhecida como sendo uma espécie com grande potencial, cada vez mais procurada por agricultores que buscam novas formas de rendimento ou que foram afetados pela elevada taxa de incêndios florestais, que ocorrem anualmente em todo o território nacional.

O presente trabalho insere-se num projeto alargado de melhoramento do medronheiro e é um contributo para a otimização das técnicas de micropropagação. Foram estudados os efeitos do pH e da fonte de azoto em diferentes etapas da propagação *in vitro*: *i*) embriogénese somática, *ii*) proliferação de meristemas em meio sólido e meio líquido e *iii*) enraizamento.

As ericáceas estão geralmente adaptadas a uma nutrição baseada em amónio e a pH ácido no solo. No entanto neste estudo foi revelada uma preferência por pH próximo da neutralidade (5,7-6,5) na proliferação de meristemas e em relação à fonte de azoto notou-se uma preferência pela combinação de NH_4^+ e NO_3^- . Contudo, a proliferação em meio líquido revelou que diferentes genótipos têm diferentes preferências por valores de pH no meio de cultura, indicando que este parâmetro deve ser otimizado para cada clone. A embriogénese somática revelou melhores resultados em pH próximo da neutralidade, em 2 dos 3 clones testados, embora a indução tenha ocorrido de forma heterogénea e com o aparecimento de algumas anomalias em relação aos embriões formados bem como ao tecido caloso. Apesar de interessante para a micropropagação desta espécie, esta técnica tem de

ser ainda alvo de um intenso melhoramento de forma a otimizar a resposta dos explantes ao meio de indução para que esta ocorra com o mínimo de anomalias.

O enraizamento é uma etapa fundamental para o sucesso da micropropagação. O número de raízes formadas aumenta em pH 5,7-6,5. A modificação do meio de Knop com a adição de NH_4Cl no lugar de KNO_3 resultou em melhores resultados no número de raízes laterais formadas. Para além disso, o uso destas duas fontes de azoto em simultâneo resulta numa maior taxa de formação de raízes secundárias, aumentando portanto a área de absorção radicular, sendo interessante nas primeiras fases de aclimação das plantas.

Os resultados obtidos neste trabalho são uma contribuição para a compreensão do comportamento do medronheiro face a diferentes valores de pH e fontes de azoto, com vista à otimização de protocolos para a propagação de plantas em larga escala.

Palavras-chave: embriogénese somática, enraizamento, organogénese, proliferação de meristemas.

Abstract

The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) is a shrub or small tree, common in Portuguese forests. It belongs to the Ericaceae family, which includes also other interesting species such as the blueberries and azaleas. The plant reaches about 3 to 5 m high, but individuals reaching 12 m have been reported. Strawberry tree supports a wide range of weather conditions from drought to low temperatures (up to -12°C), being found in both siliceous (acid pH) and calcareous (basic pH) soils. It could be found widely distributed throughout the Mediterranean basin.

Despite being traditionally a NUC species (Neglected or Underutilized Crop) it is a multifunctional plant being used for various purposes. The fruits are used to produce jams or, by fermentation, a Portuguese renowned brandy. It is now recognized as a specie with great potential, being sought by farmers seeking new forms of income or who were affected by the high rate of forest fires that occur annually in all territory, burning large areas of pines and eucalyptus monocultures.

This work is part of an extensive improvement project on the strawberry tree and is a contribution to optimize the micropropagation techniques. Thus, the effects of pH and nitrogen source were studied on different steps of *in vitro* propagation: *i*) somatic embryogenesis, *ii*) axillary shoot proliferation in solid or liquid media and *iii*) rooting.

The Ericaceous are usually adapted to a nutrition based on ammonium and to an acidic pH in the soil. However this study revealed a preference for near neutral pH on shoot proliferation and a combination of NH_4^+ and NO_3^- as the most suitable for shoot formation and development. The culture in a liquid medium showed that different genotypes have preferences for different pH values of the culture medium indicating that this parameter must be optimized for each clone. Somatic embryogenesis showed better results in pH 5,7 to 6,5, in 2 of the 3 tested clones, although the induction occurred in a heterogeneously and with the appearance of some abnormalities in relation to embryos formed as well as the callus tissue formed. Although interesting for micropropagation of this species, the technique has yet to be subject to an intense improvement to optimize the response of the explants to the induction medium in order to minimize the defects observed.

Rooting is a critical step to the success of micropropagation. The number of roots formed increases when pH increased from 5,7 to 6,5. The modification of Knop basal medium, with the addition of NH_4Cl instead of KNO_3 , gave better results when the number of lateral roots formed was the parameter recorded. However, the use of these two nitrogen sources simultaneously resulted in a higher rate of formation of secondary roots, thereby increasing the area of root absorption. This result is interesting in the early stages of acclimatization of the plants.

The results obtained in this work are a contribution to the understanding of strawberry tree propagation under different pH and nitrogen conditions, in order to optimize large-scale plant production.

Keywords: organogenesis, rooting, shoot proliferation, somatic embryogenesis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização do trabalho

O sector agro-florestal português enfrenta, atualmente, grandes desafios. Os povoamentos florestais estão a ser devastados pelos incêndios que ocorrem anualmente em todo o território nacional com maior incidência na zona norte e centro do país devido, em grande parte, às extensas monoculturas de espécies arbóreas como o eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e o pinheiro bravo (*Pinus pinaster*) (Martins, 2012). O abandono da agricultura, e consequente ocupação dos terrenos por formações arbustivas, aliados a uma floresta, regra geral, mal gerida ou simplesmente abandonada, potenciam a deflagração e propagação dos incêndios florestais (Silva, 2007). Este problema constitui também uma ameaça direta às populações naturais de medronheiro (*Arbutus unedo*). Para além disto, o pinheiro bravo tem sido severamente afetado pelo nemátodo da madeira do pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*) obrigando à realização de cortes prematuros, por imposição dos regulamentos fitossanitários. Estes problemas levaram a uma redução de cerca de 27% da superfície total ocupada por pinheiro bravo (ICNF, 2013).

Durante os últimos anos, a pressão antropogénica aliada às elevadas taxas de ocorrência de incêndios e à invasão por outras espécies, levaram a um grande declínio nas populações naturais de medronheiro em Portugal. É, por isso, importante adotar estratégias de conservação desta espécie (Sá *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2012).

Apesar destes problemas, o sector agro-florestal contribui consideravelmente para o PIB do país sendo, um sector estratégico da nossa economia (ICNF, 2013). Para contornar estes problemas, devem ser procuradas soluções que possam ser uma mais-valia para os agricultores. Uma boa solução será a cultura de espécies mediterrânicas, por estarem melhor adaptadas ao nosso território e às condições edafoclimáticas. O medronheiro é uma das alternativas, sendo uma espécie espontânea em diversas regiões do nosso país e da bacia mediterrânica. Possui um papel importante na economia das regiões onde ocorre, sendo a produção de aguardente o principal rendimento para alguns agricultores (Sá *et al.*, 2011).

Embora esta espécie seja usada pelas populações locais para consumo dos frutos em fresco ou para produção de doces ou bebidas alcoólicas, continua a ter pouca importância nos circuitos comerciais, sendo por isso designada como espécie NUC – Neglected or Underutilized Crop (GFU, 2013). Contudo, têm-se unido esforços para um aumento da qualidade e quantidade de frutos produzidos, com vista à valorização do medronheiro e dos seus produtos.

O medronheiro é também importante pela sua composição rica em antioxidantes naturais, cuja procura tem aumentado nos últimos anos, como os carotenóides, vitaminas, fenóis, entre outros metabolitos que conferem um efeito protetor contra radicais livres, ajudando na prevenção de doenças cardiovasculares e cancro (Guerreiro *et al.*, 2013). Muitos destes antioxidantes apresentam ainda capacidade anti-inflamatória, antialérgica e antibacteriana. Em doses apropriadas, os antioxidantes derivados de plantas na dieta humana podem ajudar na redução de risco de muitas doenças (Oliveira *et al.*, 2011a). Esta riqueza química e nutricional justifica a necessidade de preservação e encoraja a investigação nesta e outras espécies selvagens, comestíveis, do ponto de vista nutricional e medicinal (Ruiz-Rodríguez, 2011; Morales *et al.*, 2013).

O presente trabalho insere-se num projeto mais alargado de melhoramento das plantas e qualidade dos produtos de *Arbutus unedo* para o sector agro-florestal. Pretende ser uma contribuição para a otimização de metodologias de cultura *in vitro* para a propagação clonal desta espécie, em particular nos processos de proliferação de meristemas axilares e enraizamento.

1.2. *Arbutus unedo* L.

1.2.1. Taxonomia

O género *Arbutus* pertence à classe Magnoliopsida, ordem Ericales, família Ericaceae e subfamília Arbutoideae, onde se incluem outros 5 géneros: *Arctostaphylos*, *Arctous*, *Comarostaphylis*, *Ornithostaphylos* e *Xylococcus*. A subfamília Arbutoideae é um grupo natural e distinto, dentro da família Ericaceae, que se distingue, não só pela morfologia das flores e frutos como também pela anatomia e características fitoquímicas. O género *Arbutus* engloba cerca de 20 espécies, distribuídas na costa este da América do Norte, México e América Central, Europa de Leste, toda a região Mediterrânica, Norte de África e ainda em partes do Médio Oriente (Hileman *et al.*, 2001). O medronheiro destaca-se pelas características dos seus frutos e pela produção de compostos fenólicos com grande importância económica (Sá *et al.*, 2011; Takrouni *et al.*, 2012). Na região mediterrânica ocorrem três espécies de *Arbutus*: *A. unedo*, *A. Andrachne* e *A. x Andrachnoides*. A última é possivelmente um híbrido entre *A. unedo* e *A. andrachne* (Hileman *et al.*, 2001).

Com morfologia foliar lauróide herdada dos antepassados que colonizaram a Europa durante o Terciário, o medronheiro é uma das poucas plantas que conseguiram suportar os períodos de frio do Quaternário, adaptando-se ao clima mediterrânico (Silva, 2007).

1.2.2. Descrição botânica

O medronheiro (Fig. 1A) é um arbusto (ou pequena árvore) perenifólio e diplóide ($2n = 2x = 26$) (Takrouni *et al.*, 2012), com copa densa e arredondada (Humphries *et al.*, 2005). Em porte arbustivo, tem cerca de 3 a 5 metros de altura. Contudo, em condições excecionais de boa adaptação, pode chegar a atingir entre 9 a 12 metros de altura (Celikel *et al.*, 2008), passando assim ao estatuto de árvore. O seu ritidoma é inicialmente vermelho, ficando retalhado mais tarde e obscurecido por tiras pendentes castanhas. Possui raminhos glandular-pubescentes, rosados ou vermelhos. As folhas são alternas, pecioladas, com 4-11 x 1.5-4 cm, oblongo-

INTRODUÇÃO

lanceoladas, serradas a sub-inteiras, glabras exceto na base, lustrosas e com coloração verde-escura (Fig. 1C).

As flores 5-meras estão reunidas em panículas terminais, bracteadas com bractéolas nulas (Fig. 1B). A floração ocorre no Outono (Outubro-Dezembro). As sépalas são concrescentes na base e cálice com 1,5 mm, verdes e com lobos suborbiculares. Tem uma corola urceolada, branca frequentemente matizada de verde ou rosa, caduca, com lobos curtos, revoltos. Conta com 10 estames de filetes vilosos e anteras com apêndices apicais assovelados. Os frutos são bagas verruculosas, medindo 1.5-3 cm de diâmetro, globosas (Fig. 1D), que variam a coloração ao longo do processo de maturação dos frutos passando de verde por amarelo e escarlata a vermelho escuro (Afonso, 1991; Franco, 1984; Humphries *et al.*, 2005; Takrouni *et al.*, 2012). Os frutos podem ser colhidos de Outubro a Dezembro e cada árvore produz, geralmente, 7 a 10 kg (Gomes e Canhoto 2009).

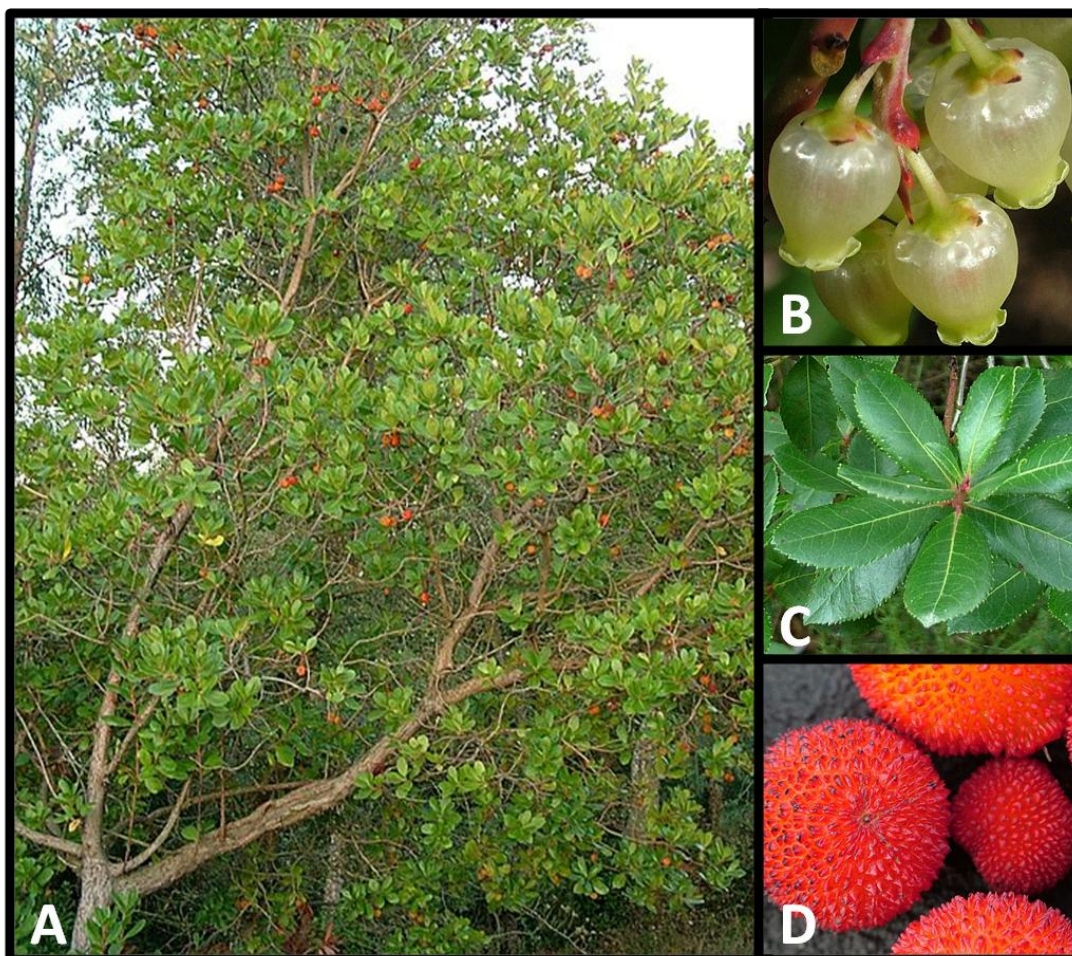


Figura 1: Alguns aspetos referentes à espécie *Arbutus unedo*: A) hábito; B) flores; C) folhas; D) frutos maduros (Fotos de Miguel Porto, adaptado da Flora de Portugal Interativa, 2014, sob licença).

1.2.3. Distribuição geográfica

O medronheiro, ou a strawberry-tree dos ingleses, é uma espécie característica da região mediterrânica (Mendes *et al.*, 2011) sendo hoje considerada uma das relíquias arbustivas dos bosques tropicais e subtropicais do Terciário presentes em Portugal continental (Aguiar, 2007). Encontra-se, largamente distribuído pela Península Ibérica (Fig. 2) e tem uma ocorrência que abrange desde o oeste, centro e sul da Europa, norte de África, oeste da Ásia e ainda Ilhas Canárias, principalmente em áreas costeiras e interiores onde os invernos não são muito frios e os verões não muito secos, preferencialmente em ombrotipo sub-húmido (Torres *et al.*, 2002; Prada e Arizpe, 2008; Lopes *et al.*, 2012). É uma espécie resistente que aguenta Invernos com temperaturas que podem descer até aos -12°C (Mereti *et al.*, 2002). As suas características concederam-lhe a sobrevivência às mudanças climáticas mio-pliocénicas e glaciações pleistocénicas, refugiando-se em climas mais propícios e de baixa altitude próximos do litoral, em vales profundos, escarpas expostas ao sol ou litologias particulares como calcários (Aguiar, 2007).

A nível nacional, as formações de medronhal ocupavam, em 2005, cerca de 0,5% da área florestal do país, correspondendo a cerca de 15.500 ha (Godinho-Ferreira *et al.*, 2005). Atualmente as populações mais extensas ocorrem na região Sul e nas colinas graníticas ou calcárias próximas do mar (Serras da Arrábida, Caldeirão e Monchique), sendo a sua distribuição mais fragmentada no Norte e Centro devido aos programas de florestação intensiva, principalmente de pinheiro e eucalipto, e às baixas temperaturas (Gomes, 2011; Martins, 2012). Embora se apresente em abundância nas florestas mediterrânicas, o medronheiro raramente se mostra como espécie dominante (Quevedo *et al.*, 2013).

É encontrado geralmente entre os 20 e os 1000 metros de altitude (Gomes, 2011) e está adaptado a vários tipos de solo, podendo crescer em solos alcalinos ou relativamente ácidos (pH 5,0-7,2) (Celikel *et al.*, 2008), sendo mais abundante em solos siliciosos mas ocorrendo também em solos calcários (Prada e Arizpe, 2008). A família das ericáceas, onde esta espécie se insere, está, normalmente, melhor adaptada a uma fonte de azoto proveniente de amónio que de nitrato (Britto e Kronzucker, 2002; Fallovo *et al.*, 2009) e a um valor de pH baixo no solo (Allan *et*

al., 1994; Claussen e Lenz, 1999). As populações de medronheiro podem formar sub-bosques muito fechados com tojos, urzes e esteva, entre outras espécies esclerófilas arbustivas de climas mediterrânicos, comumente associado a outras árvores tais como o sobreiro (*Quercus suber*) e o pinheiro bravo (*Pinus pinaster*) (Godinho-Ferreira *et al.*, 2005; Prada e Arizpe, 2008; Takrouni *et al.*, 2012).

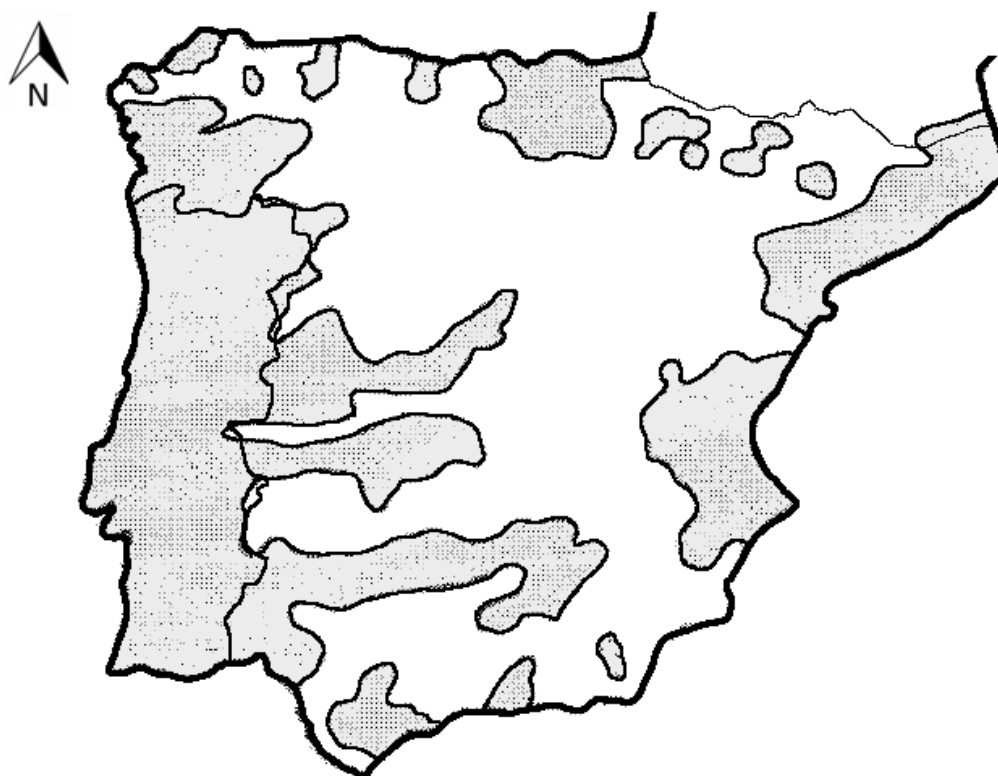


Figura 2: Distribuição de *Arbutus unedo* na Península Ibérica (adaptado de Torres *et al.*, 2002).

1.2.4. Importância Económica e Etnobotânica

O medronheiro, como já foi referido, é considerado uma espécie NUC, o que significa que possui interesse agrícola, nomeadamente para as populações residentes no local de origem, mas por várias razões não é devidamente explorado em termos agrícolas (GFU, 2013; Gomes *et al.*, 2010). Apesar disso, o medronheiro é um dos mais importantes e conhecidos arbustos da bacia mediterrânica, pela sua importância como planta ornamental, melífera, medicinal e pela utilização dos seus frutos e madeira (Silva, 2007).

É uma espécie multifuncional, usada em farmacêutica, cosmética, saúde ou alimentação, como fonte de compostos funcionais e ainda como fonte de fibra (GFU, 2013). Os frutos, medronhos, são comestíveis e podem ser consumidos frescos ou preparados em compotas ou geleias. Podem também ser fermentados e destilados para obtenção de bebidas alcoólicas, algumas com elevado teor de etanol 45-50% (v/v) (Santo *et al.*, 2012), sendo este o seu uso mais importante na atualidade (Gomes *et al.*, 2010). Para a produção de 1 litro de aguardente, são usados cerca de 10 quilos de medronhos frescos (Gomes e Canhoto, 2009). Guerreiro *et al.* (2013) concluíram, com alguns estudos a nível do armazenamento de medronhos frescos, que a uma temperatura de 0°C estes mantêm a cor e o sabor praticamente inalterados durante, pelo menos, 15 dias. Este é um passo importante para a comercialização do fruto nas grandes superfícies comerciais, contornando a rápida degradação deste quando completamente maduro, contribuindo para a valorização do medronheiro como espécie frutícola de interesse.

A composição dos frutos é melhor conhecida que a composição das folhas nesta espécie (Oliveira *et al.*, 2009). Os frutos contêm uma percentagem elevada de açúcares, entre os 42 e 52% de peso seco, e são uma boa fonte de minerais, especialmente de potássio, cálcio e fósforo (Özcan e Haciseferoğulları, 2007). São uma boa fonte de antioxidantes, incluindo compostos fenólicos (antocianinas e outros flavonóides, derivados do ácido gálico e taninos), vitaminas C e E, e carotenóides (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Mendes *et al.*, 2011; Malheiro *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2013). Muitas das funções biológicas atribuídas ao consumo de medronhos estão relacionadas com a sua composição nestes compostos antioxidantes (Oliveira *et al.*, 2011a). Na sabedoria popular os frutos são considerados ricos em etanol, assim sendo, quando comidos em grande quantidade podem causar a sensação de embriaguez (Abreu, 2014). É essa a possível origem do restritivo específico “unedo” de “unus + edo” que significa “comer apenas um” (Cela *et al.*, 2003). No entanto, Oliveira *et al.* (2011b) por análise dos compostos voláteis em medronhos, em vários estados de maturação, verificaram que apesar dos álcoois serem o composto maioritário, nenhum etanol é detetado.

Outros usos têm sido explorados para estes frutos, tais como: iogurte, tartes, bolos, barras de cereais ou cereais para pequeno-almoço (Alarcão-E-Silva *et al.*,

2001). Dado o seu elevado teor de β -caroteno e antocianinas, os medronhos podem também ser usados para produção de corantes alimentares (Molina *et al.*, 2011).

Os medronhos têm sido usados na medicina tradicional como antissépticos, diuréticos e laxativos, enquanto as folhas têm sido largamente usadas como adstringentes, diuréticas, agentes antissépticos urinários e, mais recentemente, como terapia para a hipertensão arterial, arteriosclerose, trombose e diabetes (Ziyyat e Boussairi, 1998; Pallauf *et al.*, 2008; Fortalezas *et al.*, 2010). Estudos sobre propriedades antimicrobianas foram também realizados por Ferreira *et al.* (2012) mostrando a inibição de bactérias Gram-positivas responsáveis por doenças como, por exemplo, a pneumonia.

As folhas de medronheiro podem ser usadas para obtenção de extratos benéficos a nível nutricional e medicinal, como fonte de antioxidantes naturais, para suplementos alimentares, reduzindo o recurso a suplementos sintéticos e aditivos potencialmente tóxicos (Malheiro *et al.*, 2012). Para além disso, os extratos das folhas podem também ser usados como ingrediente funcional em carne processada prevenindo a oxidação de lípidos (Morales *et al.*, 2013). A casca desta pequena árvore possui também compostos com interesse medicinal (Cela *et al.*, 2003). A sua madeira é excelente combustível e pode ser usada para construção (GFU, 2013). Recentemente, Lancellotti *et al.* (2014) conseguiram, pela primeira vez, estabelecer micorrizas arbutóides entre *Tuber borchii* (uma espécie de trufa) e *Arbutus unedo*. Isto representa uma oportunidade económica importante nas zonas mediterrânicas, aliando o cultivo de trufas com a produção de frutos para alimentação.

É valorizada como planta ornamental devido à coloração vermelha intensa dos frutos durante o Outono e Inverno e às suas flores brancas ou rosadas no Outono (Celikel *et al.*, 2008; Sá *et al.*, 2011) e pelo facto destas características de floração e frutificação ocorrerem simultaneamente na mesma planta (Takrouni *et al.*, 2012). Zizzo *et al.* (2009) avaliaram o potencial do medronheiro como planta ornamental, analisando características de floração e frutificação bem como a aparência global do arbusto, e ainda a diversidade genética das várias populações de *A. unedo* na ilha da Sicília na Itália.

As flores de medronheiro são uma boa fonte de néctar e pólen para abelhas (*Apis mellifera*) que produzem, a partir desta espécie, um mel característico bastante apreciado pelo seu aroma, sabor amargo e cor escura devido ao alto teor de compostos fenólicos (Bianchi *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2012). O mel monofloral de medronheiro é um produto típico de algumas regiões mediterrânicas, particularmente da ilha da Sardenha, e tem um valor económico cerca de 6 vezes superior ao mel monofloral obtido de outras espécies (Bianchi *et al.*, 2005). Estudos realizados por Rosa *et al.* (2011) demonstraram elevado potencial antioxidante no mel monofloral de *A. unedo*.

1.2.5. Importância ecológica

O medronheiro, pela sua fisionomia e características adaptativas, é uma espécie que se mostra bastante resistente à seca e possui uma grande capacidade de regeneração após incêndios, criando vários rebentos por toiça, numa regeneração vigorosa (Quevedo *et al.*, 2013). Estas características contribuem bastante para a resiliência dos ecossistemas onde esta espécie está inserida (Vasques *et al.*, 2013). É, por isso, uma espécie interessante para programas de florestação na região mediterrânica, nomeadamente na colonização de solos marginais e na prevenção da propagação de incêndios florestais (Gomes *et al.*, 2014). Além disso apresenta grande importância ecológica por evitar a erosão dos solos, pela água e ar, e por manter a biodiversidade (Lopes *et al.*, 2012; Takrouni *et al.*, 2012, Abreu *et al.*, 2014).

A dispersão de sementes é assegurada por animais, maioritariamente aves e mamíferos, que se alimentam dos frutos (Takrouni *et al.*, 2012), num período do ano em que existe pouca disponibilidade de alimentos para os animais selvagens. Existem espécies intimamente ligadas a este arbusto mediterrânico como é o caso da borboleta-do-medronheiro (*Charaxes jasius*) cujas lagartas estão bastante dependentes das folhas de *A. unedo* para a sua alimentação (Verdasca *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Moreno-Jiménez *et al.* (2008), comparando a resistência de arbustos mediterrânicos a arsénico demonstraram que o medronheiro tem potencial fitoestabilizador, prevenindo a erosão e a lixiviação deste contaminante, acumulando-o somente nas raízes. Deste modo os seus frutos mantêm-se comestíveis, podendo ser consumidos sem risco pelas populações. Isto

foi recentemente comprovado por estudos realizados em Portugal, na mina da Panasqueira, por Abreu *et al.* (2014). Nesta área mineira, os principais contaminantes como o arsénio, cádmio, chumbo, e zinco apresentam níveis baixos na parte aérea do medronheiro, não constituindo, por isso, uma ameaça aos sistemas biológicos e contendo valores de presença nos frutos abaixo dos limites permitidos pela legislação portuguesa para a produção de aguardente.

1.3. Propagação de *A. unedo*

Para o melhoramento vegetal é crucial a existência de métodos de propagação eficientes. A propagação de *A. unedo* é difícil devido às variações genéticas e aos requisitos para a germinação das sementes (Ertekin e Kirdar, 2010). Para além disso, a propagação por métodos convencionais como a estacaria apresentam baixas taxas de enraizamento (Gomes e Canhoto, 2009). Na natureza, as condições meteorológicas são um dos fatores que mais afetam o medronheiro, pois o seu ciclo reprodutivo é mais longo que na maioria das árvores de fruto (Lopes *et al.*, 2012). Por este motivo, a propagação *in vitro* revela-se uma alternativa bastante viável para a propagação desta espécie, especialmente quando se pretende fixar um genótipo de interesse nas plantas propagadas (Canhoto, 2010).

Devido à presença de substâncias inibidoras da germinação difundidas pelo fruto, as sementes de *A. unedo* possuem uma taxa de germinação baixa, não passando dos 4,2% (Hammami *et al.*, 2005). No entanto, recorrendo a tratamentos que simulem as condições naturais ou suprimam requisitos fisiológicos, conseguem obter-se resultados próximos de 100% de germinação como foi demonstrado por estudos levados a cabo por Ertekin e Kirdar (2010) e por Martins (2012). Porém, a germinação de sementes para além de mais demorada, origina plantas com genótipos e fenótipos diferentes, não sendo muito interessantes para a valorização do medronheiro a nível agrícola e económico.

As técnicas de cultura de tecidos *in vitro* apresentam uma alternativa, cada vez mais popular, para a propagação vegetativa de plantas. A propagação clonal *in vitro* é designada por micropropagação (Chawla, 2009). Apesar de apresentar desvantagens como a necessidade de mão-de-obra qualificada, instalações apropriadas ou equipamentos dispendiosos, e ainda, a possibilidade de ocorrência

de variação somaclonal ou de vitrificação (declínio na capacidade de multiplicação), esta metodologia é fundamental em muitos aspetos da biotecnologia vegetal. Contribuem para isso as seguintes potencialidades: *i*) obtenção de elevado número de plantas para ensaios na agricultura num curto espaço de tempo partindo de um explante (material que é colocado no meio de cultura) diminuto; *ii*) propagação de espécies difíceis de clonar por técnicas convencionais; *iii*) produção de clones ou novas variedades; *iv*) essencial na regeneração de plantas a partir de células geneticamente modificadas; *v*) propagação constante durante o ano (inexistência de sazonalidade); *vi*) produção de plantas isentas de vírus através da proliferação de meristemas; *vii*) estabelecimento de bancos de germoplasma (Chawla, 2009; Canhoto, 2010).

O método de micropropagação é já utilizado com sucesso noutras ericáceas tais como *Kalmia latifolia* (Lloyd e McCown, 1980), *Leucopogon verticillatus* (Anthony *et al.*, 2004a), *Conostephium pendulum* (Anthony *et al.*, 2004b), *Oxydenrumarboreum* (Banko e Stefani, 1989), *Rhododendron ponticum* (Almeida *et al.*, 2005), *Vaccinium ashei* (Schuch *et al.*, 2008), *Vaccinium corymbosum* (Isutsa *et al.*, 1994), *Vaccinium cylindraceum* (Pereira, 2006). Em *A. unedo* existem alguns registos na literatura realizados por Mereti *et al.* (2002) e Gomes e Canhoto (2009), em *A. andrachne* por Mostafa *et al.* (2010) e em *A. xalapensis* por Mackay (1996).

1.3.1. Proliferação de meristemas

A cultura de meristemas caulinares é maioritariamente aplicada à propagação em larga escala e é um método de clonagem de plantas. Utiliza-se particularmente quando uma espécie é difícil de manipular por métodos tradicionais ou aquando da produção de novos híbridos em programas de melhoramento vegetal, quando estes são necessários em grandes quantidades, por exemplo, para ensaios de campo ou comercialização (Canhoto, 2010).

Os meristemas apicais, quando cultivados em meios de cultura adequados, proliferam dando origem um novo rebento caulinar formado por vários fitómeros¹. Estes fitómeros podem novamente ser cultivados, dando origem a novos rebentos

¹ Unidade morfogénica constituída por um nó e respetiva folha, o entrenó abaixo e a gema axilar.

caulinares e este processo repetido indefinidamente. Alguns meristemas em cultura originam inúmeros rebentos que se alongam pouco e formam agregados que podem ser divididos em pequenos grupos e subcultivados para obtenção de novas proliferações caulinares. O resultado, em qualquer um dos casos, é a obtenção de clones a partir do material vegetal original. O principal objetivo desta técnica é a produção do maior número possível de propágulos geneticamente uniformes para posterior enraizamento.

Por vezes, em vez de se formar um rebento inicial com vários fitómeros, são formadas massas de rebentos com reduzido alongamento. Neste caso estamos perante um processo designado por organogénese, onde os meristemas são formados *de novo*, ao contrário do que acontece na proliferação de meristemas onde estes já existem (Canhoto, 2010). A organogénese apesar de resultar num maior número de rebentos, compromete o genótipo, podendo levar a alterações genéticas ou epigenéticas nas plantas regeneradas (Gomes, 2011), não sendo muito interessante para fins comerciais.

Desde a cultura de meristemas até à regeneração completa das plantas existem procedimentos que se podem dividir em 5 fases: 1- preparação da planta mãe (origem dos explantes iniciais), 2- estabelecimento dos explantes *in vitro*, 3- multiplicação, 4- enraizamento e 5- aclimatização (Canhoto, 2010).

1.3.2. Embriogénese somática

O zigoto, em condições naturais, é formado por reprodução sexuada onde ocorre a fusão do gâmeta masculino (célula espermática) e do gâmeta feminino (oosfera). Após a formação do zigoto decorrem uma série de divisões celulares e ulterior especialização, originando desta forma o embrião. Desde a primeira divisão do zigoto até à formação do embrião maduro, são definidas várias fases morfológicas (Fig. 3A): i) pró-embrião; ii) fase globular; iii) fase cordiforme; iv) fase torpedo e v) fase cotiledonar.

No entanto não é apenas o zigoto que tem a capacidade de formar embriões (Chawla, 2009). As células do corpo (soma) da planta são totipotentes e têm a capacidade de formar embriões (Fig. 3B), com o mesmo genótipo da planta mãe, num processo que convencionalmente é apelidado de embriogénese somática

(Canhoto, 2010). Desta forma é possível ultrapassar a dificuldade de aceder aos embriões durante o seu desenvolvimento (em condições naturais) possibilitando o estudo citológico e molecular com aplicações importantes na clonagem de plantas e na área da transformação genética (Canhoto, 2010). Esta metodologia foi inicialmente reconhecida por Steward et al. (1958) e Reinert (1958) em culturas de cenoura (*Daucus carota*).

Embriões zigóticos e somáticos diferem em várias características, tais como:

- os embriões zigóticos têm origem unicelular (zigoto) e os embriões somáticos podem ter origem unicelular ou multicelular;
- os embriões zigóticos são formados no interior do saco embrionário, ao passo que os embriões somáticos são formados *in vitro* num meio de cultura com uma composição determinada empiricamente;
- na embriogénese zigótica, as primeiras divisões são bem definidas e características de cada espécie, enquanto na embriogénese somática a primeira divisão parece dar-se ao acaso.

A indução de embriogénese somática é influenciada por vários elementos como o tipo de explante, o meio de cultura ou o genótipo da planta dadora. A formação de embriões somáticos requer, normalmente, a presença de uma auxina ou condições de stress. A auxina mais utilizada é o 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), mas outras como NAA (ácido 1-naftaleno acético), IBA (ácido 3-indol butírico), IAA (ácido indol-3-acético) ou picloram (ácido 4-amino-3,5,5-tricloropicolínico) podem também ser usadas com sucesso (Canhoto, 2010). As auxinas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de embriões somáticos estando envolvidas na manutenção das várias fases morfológicas (Prasad e Dhonukshe, 2013).

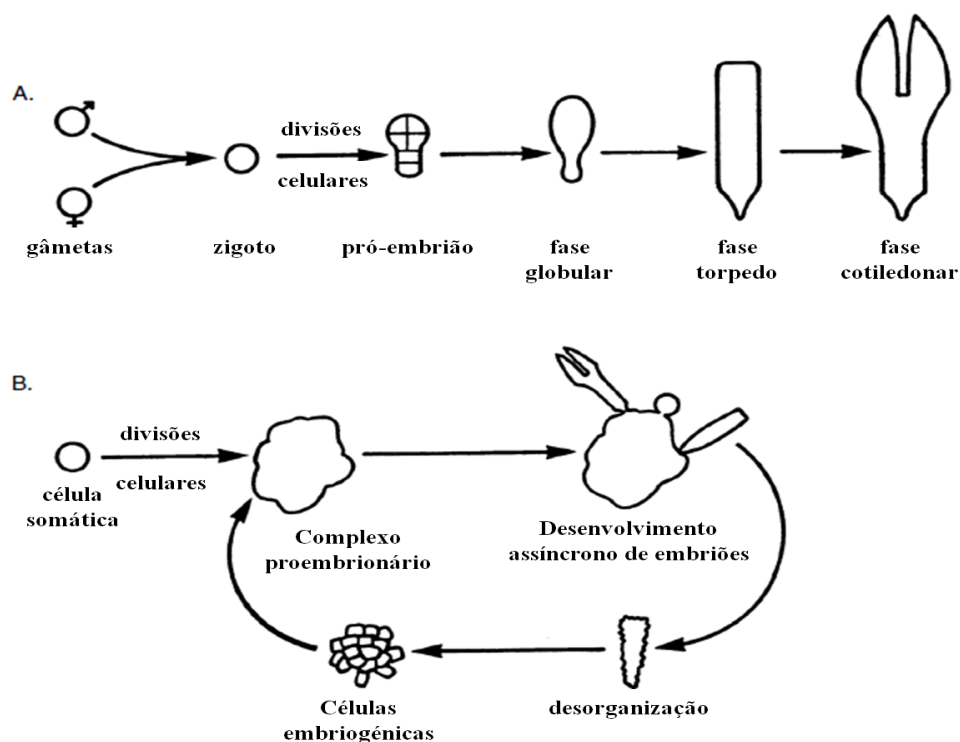


Figura 3: Comparação entre a embriogênese zigótica que ocorre na semente (A) e embriogênese somática ocorrida *in vitro* (B). Observa-se a organização característica da embriogênese zigótica que contrasta com a aleatoriedade e dessincronização que ocorrem quando da embriogênese somática (Trigiano e Gray, 2011).

A embriogênese pode ocorrer por duas vias: direta ou indireta. Na embriogênese direta, a formação de embriões ocorre diretamente do explante sem ocorrência de calo embriogênico, ao passo que na embriogênese indireta existe a formação desse calo que dá posteriormente origem aos embriões somáticos (Canhoto, 2010).

1.3.3. Enraizamento

O enraizamento engloba normalmente 3 fases: indução, iniciação e alongamento. Devido à difícil distinção entre as duas primeiras fases reduz-se, regra geral, o processo a duas fases: iniciação e alongamento (Canhoto, 2010).

A formação de raízes adventícias em algumas espécies ocorre sem nenhum tratamento especial, enquanto noutras espécies é necessária a adição de diferentes reguladores de crescimento, normalmente auxinas (Metaxas *et al.*, 2004). As auxinas mais usadas são o NAA e o IBA sendo esta última, normalmente, mais

eficaz, e usada em medronheiro (Canhoto, 2010; Martins, 2012). As concentrações e tempos de exposição às auxinas variam consoante a espécie. Concentrações muito elevadas de auxina ou períodos de exposição longos podem levar à formação de calos na base dos rebentos caulinares só depois ocorrendo a formação de raízes. Esta situação pode levar a uma deformação na conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes, impedindo a conclusão do processo de micropropagação (Canhoto, 2010). Porém, após a formação das raízes, é necessário transferir os rebentos para um meio sem auxina para promover o crescimento radicular. Essa transferência é feita para um meio contendo carvão ativado que para além de absorver os compostos orgânicos como as auxinas, escurecem o meio de cultura tornando-o mais propício à formação e crescimento das raízes (Trigiano e Gray, 2011; Canhoto, 2010).

Após o enraizamento as plantas são aclimatizadas, passando de condições heterotróficas para autotróficas, ficando sujeitas a severas condições de stresse, principalmente em relação à humidade, temperatura, luz e contaminações, levando frequentemente a elevadas taxas de mortalidade. A dessecação é um dos principais problemas devido, essencialmente, à elevada relação entre as taxas de transpiração e absorção. Isto pode ser explicado pelas quantidades reduzidas de ceras epicuticulares, grande espaço intercelular e deficiências na resposta dos estomas ao stresse hídrico (Canhoto, 2010). Além disso, o sistema radicular recém-formado nos rebentos apresenta, por vezes, fraca conexão vascular com os restantes órgãos, dificultando o transporte de água e nutrientes às regiões em crescimento ativo. A micorrização pode ajudar em muito nesta fase. A associação das raízes com hifas fúngicas permite ultrapassar alguns problemas no que respeita à absorção de água e nutrientes necessários ao desenvolvimento das plantas e facilitar a sua aclimação (Canhoto, 2010). Isto é especialmente evidente no medronheiro como foi demonstrado em estudos conduzidos por Gomes *et al.* (2011, 2013).

Os melhores resultados no enraizamento *in vitro* desta espécie foram conseguidos por Gomes *et al.* (2008) com 100% de enraizamento em diferentes meios de cultura contendo altas concentrações (24,6 - 49,2 μM) da auxina IBA, esta que tinha já mostrado resultados promissores em estudos realizados por Mereti *et al.* (2002) e Metaxas *et al.* (2004).

1.4. Meios de cultura

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* é uma metodologia com algumas dezenas de anos de existência. Contudo, só nas duas últimas décadas se começou a generalizar e a ser encarada não só, como uma curiosidade científica, mas também como um poderoso instrumento de estudo dos mecanismos de morfogénese vegetal e de propagação a larga escala. As culturas podem ser realizadas em meio sólido ou em meio líquido, sendo que no primeiro se utiliza um agente gelificante (por exemplo, agar) que, para além de solidificar o meio, forma um complexo coloidal que facilmente liberta os iões (Canhoto, 2010).

As ericáceas são, regra geral, especializadas numa nutrição baseada em amónio e a valores baixos de pH (Allan *et al.*, 1994; Britto e Kronzucker, 2002).

1.4.1. Efeito do pH

O pH determina muitos aspetos importantes da estrutura e atividade das macromoléculas biológicas. O pH dos meios de cultura *in vitro* é geralmente 5,6-5,8, pois nestas condições todos os iões estão em solução e facilmente disponíveis para as células. Além disso, é um valor de pH próximo daquele que em condições naturais envolve as células vegetais (Canhoto, 2010). Valores de pH acima de 7,0 e abaixo de 4,5 geralmente resultam na inibição do crescimento e desenvolvimento vegetal, para além disso, a gelificação do agar também não é satisfatória, pois torna-se demasiado duro ou demasiado fluído, respetivamente (Chawla, 2009). A disponibilidade de vários elementos no meio, nomeadamente iões de amónio, diminui com valores de pH abaixo de 5 (Anthony *et al.* 2004a; Trigiano e Gray, 2011), como pode ser observado na Fig. 4. Após autoclavagem o pH baixa geralmente entre 0,3 a 0,5 unidades (Chawla, 2009). A medição do pH é feita antes da adição do agente gelificante ao meio e é acertado com recurso a soluções de KOH ou HCl para subir ou descer o pH, respetivamente (0,1-1,0 N). Pode também ser usado hidróxido de sódio para baixar o valor de pH, mas isto levaria a um aumento dos iões de sódio em solução (Trigiano e Gray, 2011).

Na micropropagação de medronheiro, o pH usado normalmente é de 5,7 (Gomes e Canhoto, 2009).

Estudos realizados por Anthony *et al.* (2004a) revelaram que valores de pH acima de 5 aumentavam consideravelmente a produção de embriões somáticos noutra ericácea, *Leucopogon verticillatus*. O valor de pH afeta também o conteúdo em ácidos orgânicos em *Vaccinium macrocarpon* como demonstrado por Allan *et al.* (1994).

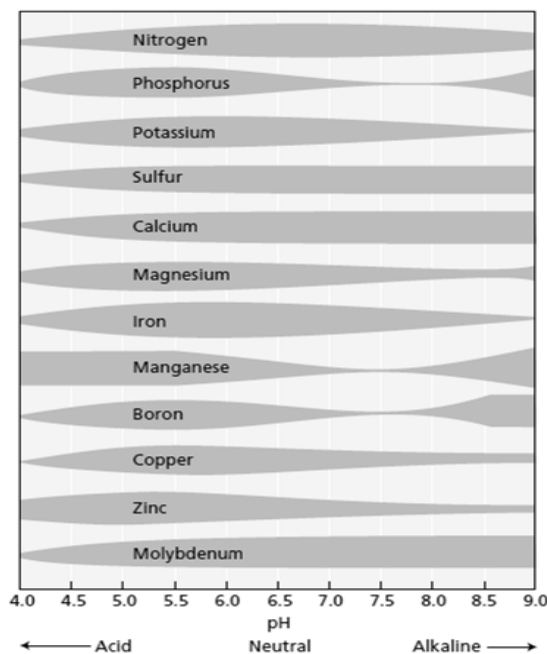


Figura 4: Influência do pH (do solo) na disponibilidade de nutrientes (adaptado de Taiz e Zeiger, 2010).

1.4.2. Efeito da Fonte de Azoto

Apenas certos elementos minerais são essenciais para o crescimento das plantas. Um elemento essencial é aquele cuja ausência priva a planta de completar o seu ciclo de vida ou que tem um papel fundamental no desenvolvimento fisiológico. Se as plantas tiverem acesso a todos estes elementos essenciais bem como à energia provida pela luz, conseguem sintetizar todos os compostos que necessitam para um crescimento normal. Os minerais essenciais são classificados em macro e micronutrientes de acordo com as suas concentrações relativas nos tecidos da planta (Chawla, 2009).

A importância do azoto para as plantas é posta em evidência pelo facto de apenas o carbono, o hidrogénio e o oxigénio entrarem na sua constituição em maior quantidade (Bowsher *et al.*, 2008). Este elemento faz parte da estrutura de

numerosos componentes celulares, incluindo aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas e vitaminas (Chawla, 2009). Assim sendo, a deficiência em azoto inibe rapidamente o desenvolvimento vegetal.

No entanto, ao contrário de outros compostos, o azoto não fica disponível por meteorização das rochas, mas sim por fenómenos elétricos ocorridos na atmosfera (constituída maioritariamente por este elemento na forma de N_2) e chega ao solo por ação da chuva na forma de HNO_3 (em zonas temperadas cerca de 5kg N/ha). Por esta razão, é essencial o recurso a fertilizantes azotados na agricultura para compensar o azoto que é retirado (incorporado nas plantas) aquando das colheitas de material vegetal (Heldt e Piechulla, 2010).

As principais formas de azoto absorvidas pelas plantas são os iões nitrato (NO_3^-) e amónio (NH_4^+), resultantes da fixação biológica. O ião nitrito (NO_2^-) e certos compostos orgânicos simples (aminoácidos, ureia, ácido úrico, etc.) podem também ser absorvidos pelas raízes mas em quantidades reduzidas (Campbell, 1978). Quando fixado sob a forma de amónio ou nitrato, o azoto entra no ciclo biogeoquímico, passando por várias formas orgânicas e inorgânicas voltando, eventualmente, a passar ao estado de azoto molecular. Estes iões são objeto de uma intensa competição entre plantas e microorganismos, por isso e para se manterem competitivas, as plantas desenvolveram mecanismos para absorver rapidamente estes iões do solo, podendo exceder a sua capacidade de assimilação, levando a uma acumulação nos tecidos vegetais. A assimilação de azoto, pelas plantas, requer uma série complexa de reações bioquímicas energeticamente dispendiosas (Taiz e Zeiger, 2010).

Uma estratégia para uma assimilação mais eficiente de azoto e outros elementos minerais é a interação com microorganismos (bactérias ou fungos). Existem bactérias fixadoras de azoto que estabelecem relações simbióticas com plantas, fixando o azoto atmosférico e transformando-o em NH_4^+ , estando assim disponível para a planta (Fig. 5). Em troca a planta oferece um nicho ecológico especializado e uma fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento da bactéria. As micorrizas são outra forma de simbiose, neste caso, entre plantas e fungos. As micorrizas aumentam a capacidade de assimilação não só de azoto mas de outros elementos minerais, sendo particularmente vantajoso para espécies

lenhosas, conferindo uma vantagem tanto na absorção de água e minerais como no crescimento da raiz protegendo-a de stresses bióticos e abióticos (Bowsher *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2013). Um intenso trabalho de investigação neste ramo tem sido realizado por Gomes *et al.* (2011, 2013) na procura de espécies de fungos micorrízicos que melhorem a aclimação das plantas obtidas por micropropagação e o seu desenvolvimento no campo.

As plantas especializadas numa nutrição à base de amónia são na sua maioria (se não totalidade) adaptadas a pH's ácidos (Britto e Kronzucker, 2002). Elevados níveis de amónio são tóxicos para as plantas pois dissipam os gradientes protónicos necessários aos processos fotossintéticos. Por este motivo as plantas assimilam o amónio perto do local de absorção e rapidamente o armazenam em vacúolos para evitar os efeitos tóxicos nas membranas e citosol (Britto e Kronzucker, 2002; Taiz e Zeiger, 2010).

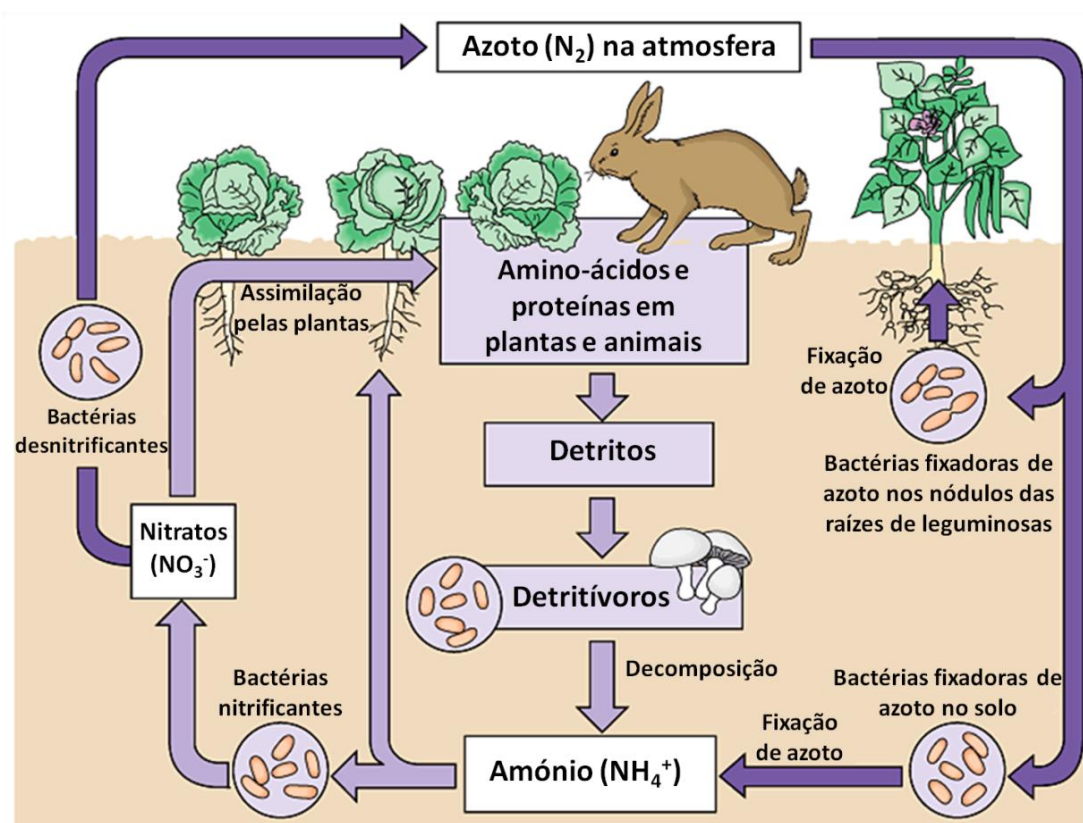
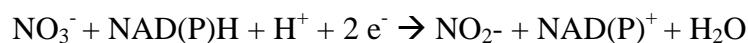


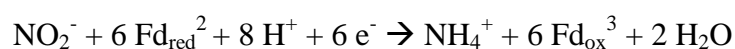
Figura 5: Representação esquemática do ciclo do azoto (adaptado de <http://bioh.wikispaces.com/file/view/36-16-NitrogenCycle-L.gif>)

INTRODUÇÃO

O nitrato é assimilado pelas plantas sob a forma de compostos orgânicos nitrogenados. O primeiro passo, para a assimilação, é a redução do nitrato a nitrito (NO_2^-) no citosol pela enzima nitrato redutase pela seguinte reação:



Este nitrito é um ião altamente reativo e potencialmente tóxico sendo imediatamente transportado do citosol para cloroplastos nas folhas e plastídeos nas raízes. Nestes organelos, a enzima nitrito redutase reduz o nitrito a amónio pela reação:



As células vegetais evitam a toxicidade do amónio produzido quer pela assimilação de nitrato quer pela fotorrespiração, convertendo-o em aminoácidos pela ação das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase (Taiz e Zeiger, 2010).

No meio de cultura *in vitro*, tal como no solo, o azoto é um dos macronutrientes mais importantes sendo geralmente apresentado sob a forma de iões de amónio ou nitrato, embora por vezes possam ser usadas formas orgânicas mais complexas como a ureia ou aminoácidos (Trigiano e Gray, 2011). No presente trabalho as fontes de azoto utilizadas foram o nitrato de potássio (KNO_3) e o cloreto de amónia (NH_4Cl).

² Fd_{red} : ferredoxina reduzida.

³ Fd_{ox} : ferredoxina oxidada.

1.5. Objetivos

O medronheiro é ainda considerado uma espécie subvalorizada, apesar do crescente interesse demonstrado por vários agricultores com vista a um aumento dos seus rendimentos, devido principalmente, à produção de grande quantidade de frutos para diversos fins. Os trabalhos de melhoramento desta espécie são cada vez mais e com resultados bastante promissores. O presente trabalho está inserido num projeto alargado de melhoramento das plantas e qualidade dos frutos da espécie *A. unedo*, numa colaboração, entre outros, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e da Escola Superior Agrária de Coimbra, e pretende ser uma contribuição para uma melhoria nos métodos de propagação da espécie com o intuito de fornecer material vegetal diverso e de qualidade aos agricultores interessados.

Este trabalho teve como principais objetivos testar o efeito do pH (variando entre 4,5 e 6,5) e da fonte de azoto (variando entre o nitrato e o amónio em diferentes concentrações) em várias técnicas de propagação já utilizadas para o medronheiro: i) proliferação de meristemas em meio sólido; ii) proliferação de meristemas em meio líquido; iii) embriogénese somática e iv) enraizamento. Estes ensaios têm em vista uma melhoria das condições de cultura para uma propagação mais rápida e eficiente em futuros trabalhos nesta espécie ou semelhantes.

A otimização das técnicas de propagação é importante para a melhoria da qualidade e o aumento da quantidade de plantas disponíveis para agricultores interessados no cultivo desta espécie, ajudando deste modo na sua valorização tanto a nível nacional como internacional. A busca por genótipos adaptados a diferentes condições do solo é também interessante, para fornecer produtos de qualidade adaptados a diferentes condições edafoclimáticas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Nos ensaios realizados, foram utilizadas plântulas previamente estabelecidas *in vitro*, referentes a 3 clones distintos: P (proveniente da germinação de sementes com origem em Penamacor), C1 (proveniente de uma planta adulta na região de Coimbra) e HP (Provenientes da germinação de sementes com origem em Faro). Foram realizados ensaios de proliferação de meristemas, tanto em meio sólido como em meio líquido, ensaios de indução de embriogénese somática e ensaios de enraizamento dos rebentos caulinares obtidos por proliferação de meristemas. Fizeram-se variar os valores de pH e as fontes de azoto nos vários ensaios, de modo a apurar quais as melhores condições para o desenvolvimento das plântulas de medronheiro nos diferentes testes efetuados.

2.2. Proliferação de meristemas

Os ensaios de proliferação de meristemas foram realizados em meio sólido e em meio líquido de modo a apurar diferenças entre as duas metodologias e qual a mais vantajosa na propagação da espécie *A. unedo*.

2.2.1. Meio sólido

Para a proliferação de meristemas em meio sólido foram utilizadas plântulas de um clone (P) previamente estabelecido *in vitro*. Foi utilizado o meio de cultura de Fossard (De Fossard *et al.*, 1974) modificado, no qual os micronutrientes foram substituídos pelos presentes no meio MS (Murashige e Skoog, 1962). Este meio base foi ainda suplementado com uma fonte de ferro (Fe.EDTA), uma fonte de carbono (3% de sacarose) e a citocinina BA – benziladenina (8,8 µM).

Para a preparação dos meios de cultura, adicionaram-se todos os componentes em balões de Erlenmeyer em agitação com auxílio de uma placa de agitação magnética. Após a adição da sacarose (último componente adicionado) o volume foi acertado com água destilada. Procedeu-se de seguida ao ajustamento dos valores de pH, consoante o ensaio, recorrendo a soluções de HCl e KOH (com 3 concentrações: 1,0; 0,1 e 0,01). Com as soluções preparadas adicionou-se agar como agente gelificante (6 g/L). Aqueceram-se as soluções de forma a dissolver o

agar e distribuíram-se por tubos de ensaio. Os tubos foram rolhados com algodão e gaze e colocados em cestos cobertos com papel celofane para serem de seguida autoclavados a 121°C durante 20 min. O volume utilizado para cada ensaio foi de 400 mL distribuídos por 30 tubos de ensaio para realizar 3 réplicas de 10 tubos.

Para os ensaios referentes ao efeito do pH, acertaram-se os valores de pH das soluções antes da adição do agente gelificante, para 6 valores diferentes: 4,5; 5,0; 5,5; 5,7; 6,0 e 6,5. Para os ensaios referentes ao efeito da fonte de azoto, o meio foi modificado, tendo-se retirado as fontes de azoto presentes nos macronutrientes de Fossard (KNO_3 e NH_4NO_3) e fazendo variar as concentrações de nitrato e amónio sob a forma de KNO_3 e NH_4Cl , respetivamente, a 7 níveis diferentes, como representado na tabela 1.

Os explantes consistiram de plantas com 4/5 nós e respetivas folhas que foram distribuídas pelos 30 tubos em cada ensaio. As culturas foram mantidas durante aproximadamente 5 semanas numa estufa à temperatura de $24\pm 1^\circ\text{C}$ e um fotoperíodo de 16 horas com uma intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. No final desse período anotaram-se os resultados observáveis no crescimento das plantas, tais como, número de rebentos formados na base, número de nós e comprimento de cada rebento, nos diferentes meios testados, de forma a avaliar as diferenças entre os mesmos no desenvolvimento das plantas de medronheiro. Na Fig. 6 está apresentado um esquema ilustrativo do processo de micropropagação através da cultura de meristemas.

Tabela 1: Diferentes meios utilizados nos testes para avaliar o efeito da fonte de Azoto. (C) Controlo.

Designação do meio	Variável ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) mM
N1	20 / 10 (C)
N2	0 / 10
N3	20 / 0
N4	20 / 20
N5	40 / 10
N6	10 / 10
N7	20 / 5

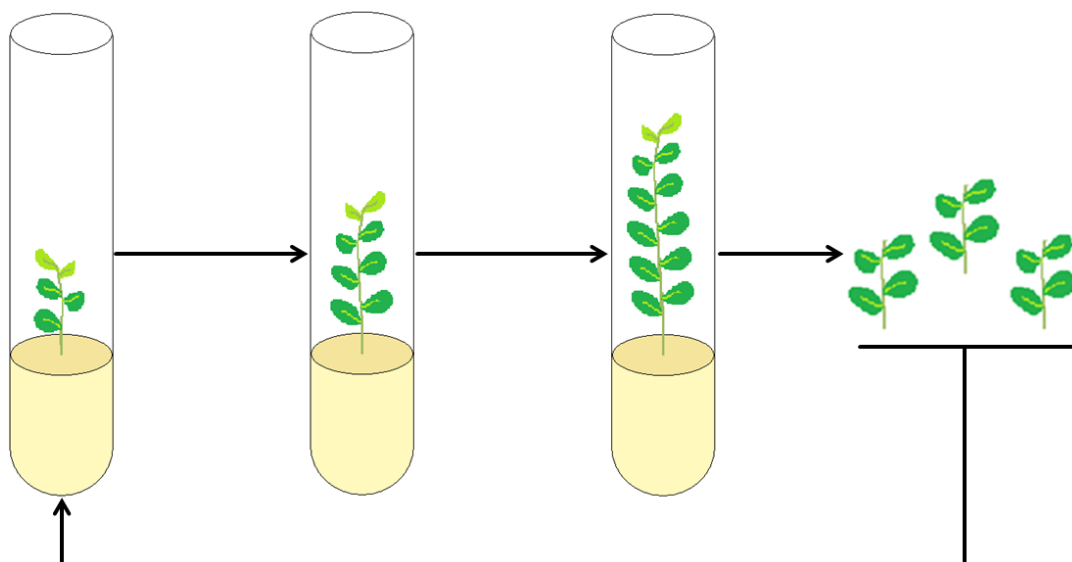


Figura 6: Representação esquemática da proliferação de meristemas em meio sólido. Os segmentos nodais colocados no meio de cultura crescem dando origem a vários fitómeros que são posteriormente sub-cultivados.

2.2.2. Meio líquido

Para avaliar o potencial de crescimento e de multiplicação das plantas em meio de cultura líquido usaram-se os clones P e C1. A composição do meio de cultura foi igual à descrita para o meio sólido mas sem adição do agente gelificante. Foram realizados 3 ensaios para testar o efeito do pH (4,5; 5,7 e 6,5) e 3 para testar a fonte de azoto (correspondentes aos meios N3, N6 e N7, apresentados na tabela 1). O ensaio foi realizado em balões de Erlenmeyer (com capacidade de 100 mL) contendo 30 mL de meio de cultura. Foram colocados em cada balão, 5 rebentos caulinares de medronheiro, com cerca de 5 nós, aos quais foram removidas as folhas (Fig. 7).

O material foi mantido numa incubadora com agitação (para garantir o arejamento das culturas), a $25\pm 1^\circ\text{C}$ e 80 rotações por minuto (rpm), durante 8 semanas. No final deste período foram contabilizadas as plantas emergentes com mais de 1cm de altura.

As plantas resultantes deste ensaio foram depois utilizadas para os ensaios de enraizamento descritos na secção 2.4.

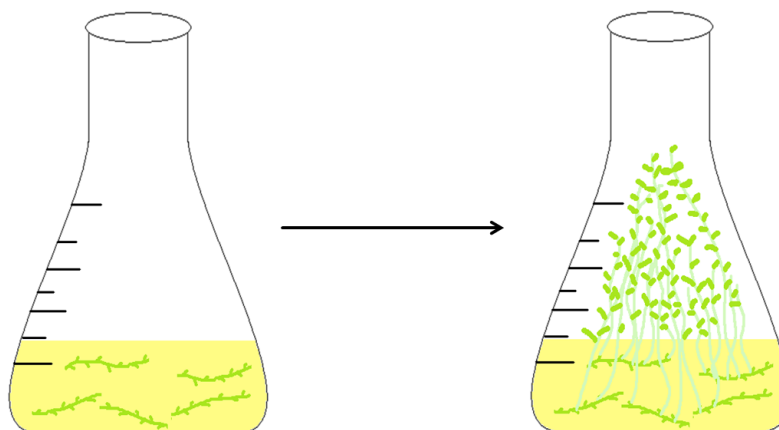


Figura 7: Representação esquemática da proliferação de meristemas em meio líquido. Os segmentos nodais colocados imersos no meio de cultura proliferam dando origem a vários rebentos caulinares.

2.3. Embriogênese somática

Nos ensaios de embriogênese somática foram utilizados 3 clones previamente estabelecidos *in vitro*: C1, HP e P. Os meios de cultura utilizados consistiram de soluções compostas pelos macronutrientes de Anderson (1984), vitaminas de Fossard, micronutrientes de MS, uma fonte de ferro (Fe.EDTA), 3% de sacarose e os reguladores de crescimento BA (8,8 μM) e NAA (26,8 μM). Nesta técnica foram avaliados 6 valores de pH (4,5; 5,0; 5,5; 5,7; 6,0 e 6,5).

Os explantes consistiram em 30 folhas de cada clone repartidas por 3 réplicas. Às folhas utilizadas foram removidos o ápice e o pecíolo e foram realizadas pequenas incisões na página abaxial com um bisturi, em condições assépticas. Os explantes foram colocados em caixas Duchefa e mantidos na obscuridade durante 3 meses numa estufa a $25\pm 1^\circ\text{C}$. No final desse período foram contabilizados: 1- a taxa de formação de calos, 2- a taxa de indução e 3- o número de embriões formados por explante.

2.4. Enraizamento

Para os ensaios de enraizamento foram utilizados como explantes, plantas provenientes da proliferação em meio sólido (2.2.1.) e em meio líquido (2.2.2.). Em ambas as situações os rebentos caulinares utilizados mediam cerca de 3 cm. O processo de enraizamento envolveu três fases: indução, alongamento das raízes e aclimatação.

Os parâmetros avaliados no final do ensaio foram, 1) a taxa de enraizamento, 2) o número de raízes laterais, 3) a presença de raízes secundárias e 4) o comprimento da maior raiz. No decorrer dos processos de enraizamento e aclimatação foram ainda analisadas as taxas de sobrevivência das plantas.

2.4.1. Fase de indução

Para a indução, o meio utilizado consistiu de macronutrientes de Knop (Gautheret, 1959), vitaminas de Fossard, com exceção da riboflavina, micronutrientes de MS sem iodeto de potássio, 1,5% de sacarose e a auxina IBA (24,7 μM). Nesta fase, as plantas foram mantidas durante 8 dias numa estufa à temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, na obscuridade. O pH foi ajustado para 3 valores diferentes (4,5; 5,7 e 6,5). Em relação ao ensaio referente à fonte de azoto, utilizaram-se 2 meios. O meio EN1, composto por macronutrientes de Knop onde foi substituído o KNO_3 por NH_4Cl na mesma proporção (1 mM) e o meio EN2, onde se utilizaram macronutrientes de Knop suplementados com 1 mM de NH_4^+ , tendo por isso, as duas fontes de azoto testadas.

2.4.2. Fase de alongamento radicular

Para a fase de alongamento, a composição do meio foi a mesma utilizada para a indução mas com o dobro da sacarose (3%) e com a adição de 1% (p/v) de carvão ativado. Aquando da transferência das plantas para o meio de alongamento, estas foram mudadas para uma estufa à temperatura de $24\pm 1^\circ\text{C}$ e um fotoperíodo de 16 horas com uma intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, onde permaneceram por 21 dias.

2.4.3. Aclimação

Passadas 3 semanas no meio de alongamento radicular, as plantas foram transferidas para um substrato contendo uma mistura de areia e perlite 1:3, onde permaneceram mais 3 semanas, sendo depois transferidas para um substrato contendo turfa, areia e perlite 2:1:2 (Fig. 8). Aquando da transferência das plantas foram registados os resultados obtidos no processo de enraizamento: taxa de enraizamento, número de raízes laterais formadas, comprimento da maior raiz e ainda foi registada a presença, ou não, de raízes secundárias.

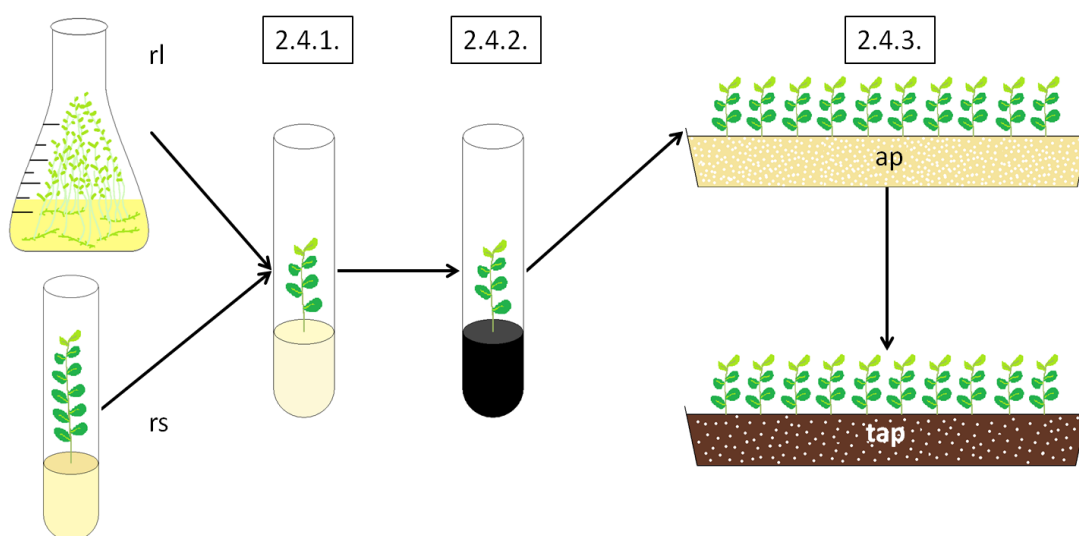


Figura 8: Várias etapas do processo de enraizamento e aclimação: 2.4.1) indução; 2.4.2) alongamento e 2.4.3) aclimação. rl- rebentos provenientes de meio líquido, rs- rebentos provenientes de meio sólido, ap- substrato com areia e perlite, tap- substrato com turfa, areia e perlite.

2.5. Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados obtidos, recorreu-se ao programa STATISTICA 7. Foi feita uma análise de variância (ANOVA) e os parâmetros avaliados onde ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) foram sujeitos a um teste de Duncan para observar onde estas ocorreram. Os resultados expressos em percentagem foram previamente convertidos em valores de arcoseno para serem tratados estatisticamente.

3. RESULTADOS

3.1. Proliferação de meristemas

Os ensaios de multiplicação mostraram que os explantes em cultura se comportaram de forma análoga ao que já tinha sido descrito em ensaios realizados nesta espécie. Assim, foi possível observar que os explantes colocados em cultura, no meio de Fossard, produzem, após 5 semanas, novos rebentos com origem nos meristemas axilares presentes nos segmentos nodais.

Foram realizados ensaios de proliferação de meristemas, tanto em meio de cultura sólido como líquido, e foram avaliados o efeito do pH e da fonte de azoto no desenvolvimento dos rebentos caulinares em ambos os casos. No final de cada ensaio foram analisados os seguintes parâmetros: número de rebentos formados a partir da base do explante, o número de nós por rebento e o comprimento de cada rebento nas várias amostras. Na Fig. 9 estão representados alguns aspetos referentes à proliferação de meristemas em meio sólido.

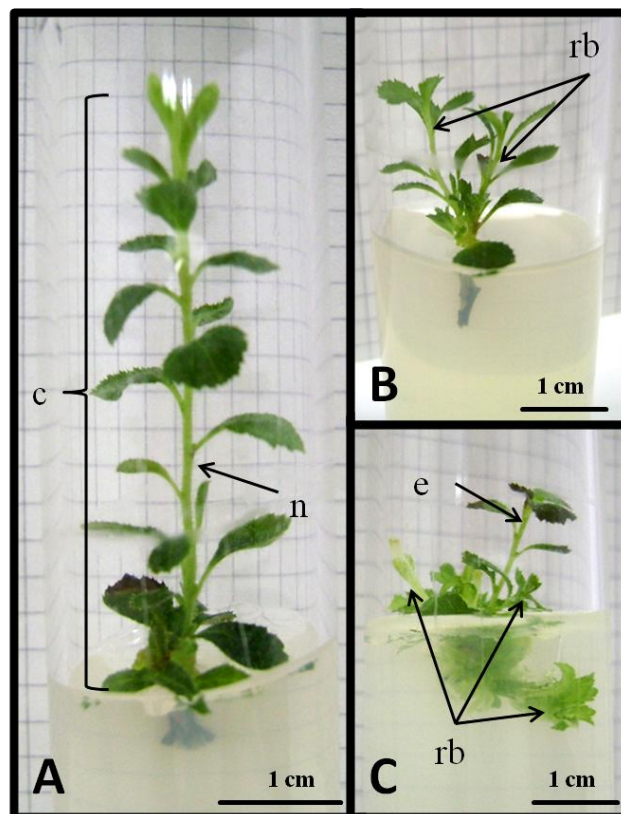


Figura 9: Proliferação de meristemas em meio sólido. A) aspeto de um rebento caulinar após 5 semanas de cultura em meio de Fossard. B) formação de 2 rebentos a partir da base do explante. C) formação de vários rebentos (por organogénese) a partir do explante original, um deles totalmente imerso no meio de cultura. c- comprimento, n- nó, rb- rebentos, e- explante original.

3.1.1. Proliferação em meio sólido

3.1.1.1. Efeito do pH

Os rebentos caulinares mostraram um desenvolvimento normal na maioria dos meios testados com diferentes valores de pH. No entanto, foram reveladas diferenças significativas entre os ensaios, nomeadamente, no número de rebentos formados (Fig. 11A) e no número de nós por rebento (Fig. 11B). É importante notar que nos meios mais ácidos (4,5 e 5,0) foram verificadas com alguma frequência, áreas foliares mais reduzidas (Fig. 10A) e cloroses nas folhas (Fig. 10B) de alguns rebentos. Os meios com pH 5,0 e 6,5 foram os que registaram maior número de rebentos ($\approx 1,45$ por explante com resposta), formados por organogénese, com ocorrência de um número elevado de rebentos (5-6) nalguns explantes. No que respeita ao número de nós, observa-se que existe uma relação entre o aumento deste e do valor de pH, sendo que o pH de 6,5 apresenta, em média, 9,66 nós por planta. Contudo, o comprimento das plantas (Fig. 11C) não apresenta diferenças significativas entre os 6 meios testados. Os valores apresentados nos gráficos da Fig. 11 são baseados em 6 repetições do mesmo ensaio (cada uma com duração de 5 semanas).

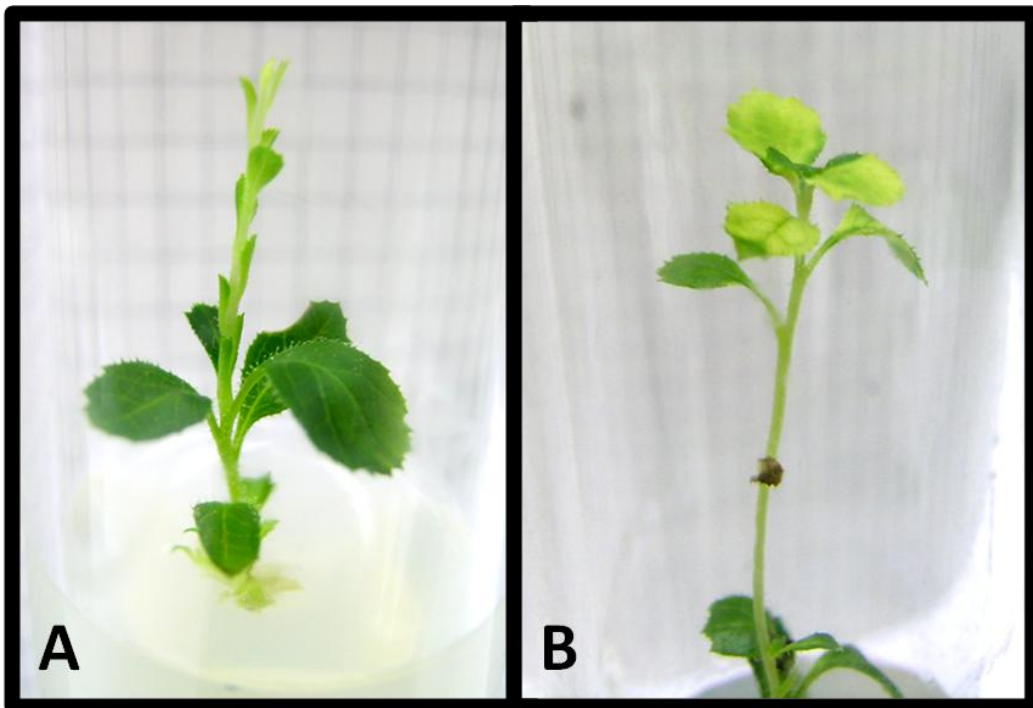


Figura 10: Aspeto de alguns rebentos em meio ácido (pH=4,5). A) redução da área foliar. B) cloroses nas folhas.

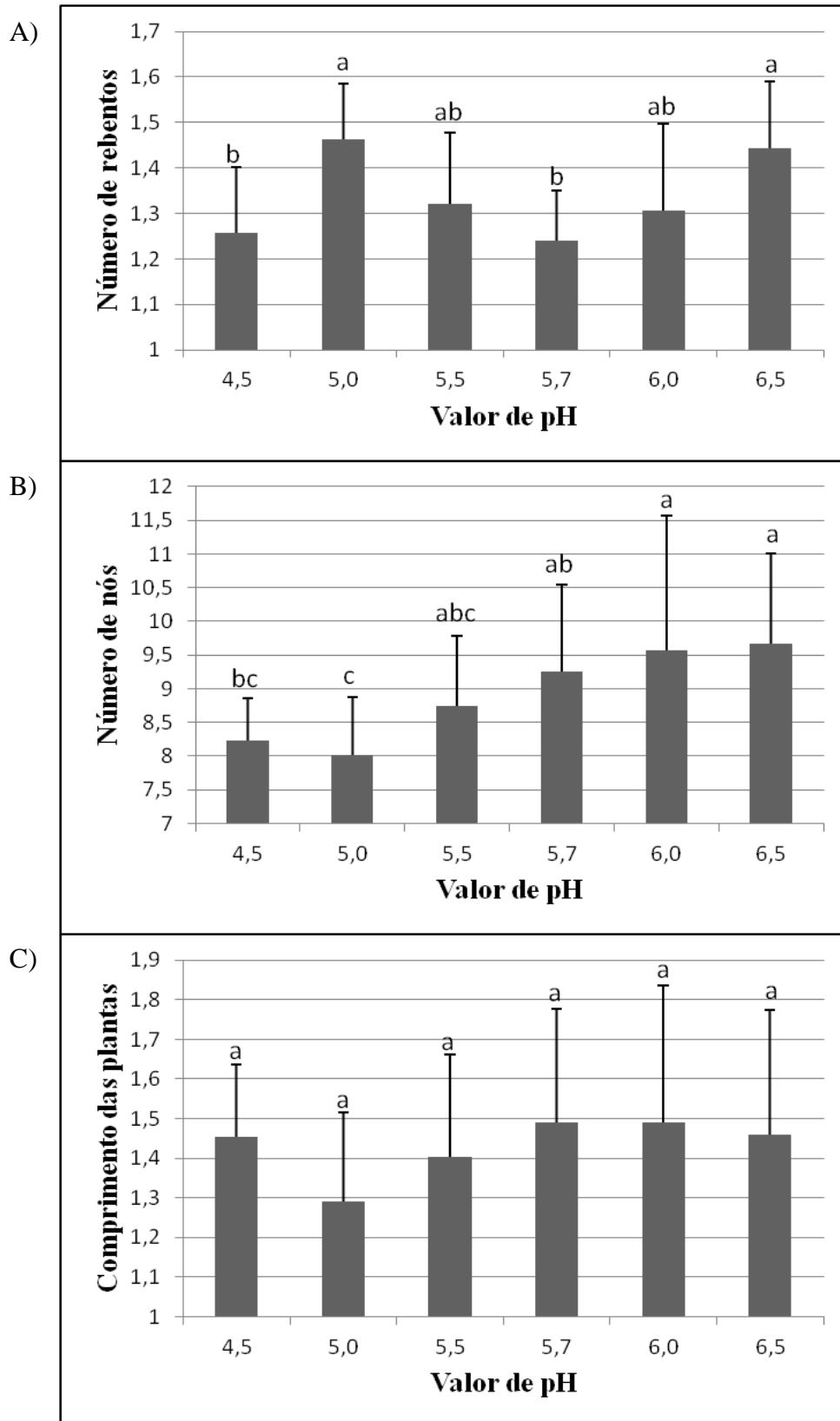


Figura 11: Efeito do pH na proliferação de meristemas axilares. A) número de rebentos formados por explante; B) número de nós por rebento; C) comprimento dos rebentos. Os valores apresentados correspondem à média e respectivo desvio padrão entre as réplicas. Valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) segundo o teste de Duncan.

3.1.1.2. Efeito da fonte de Azoto

Os ensaios de proliferação de meristemas, com vista a testar o efeito da fonte de azoto, foram repetidos 6 vezes, cada uma com duração de 5 semanas. Ao fim de 3 repetições, foram observadas elevadas taxas de mortalidade (32-36%) nos meios N2 (20mM de NH_4^+) e N5 (40mM de NO_3^- e 10mM de NH_4^+), como se observa na Fig. 12. Por esta razão, a proliferação nestes meios foi descontinuada. As maiores diferenças observadas entre os testes da fonte de azoto notaram-se ao nível do número de rebentos por explante. Verifica-se, pela análise da Fig. 13A, que o meio apenas com nitrato como fonte de azoto apresenta um valor elevado de rebentos por explante (1,82) formados por organogénese, ainda assim é o meio que apresenta menor número de nós (Fig. 13B) e o menor comprimento por rebento (Fig. 13C). Os meios N4 (20mM NO_3^- , 20mM NH_4^+) e N6 (10mM NO_3^- , 10mM NH_4^+) apresentaram um número muito reduzido de rebentos por explante, 1,09 e 1,23 respetivamente.

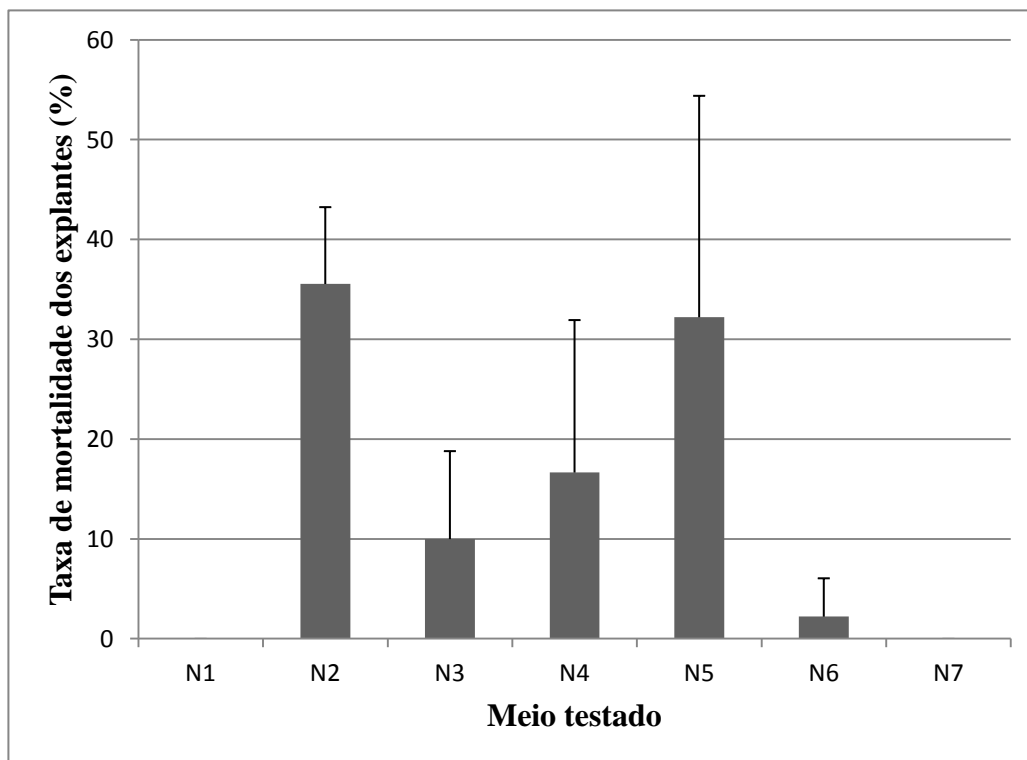


Figura 12: Taxa de mortalidade (%) observada após 3 repetições dos ensaios para testar o efeito da fonte de azoto na proliferação de meristemas em meio sólido.

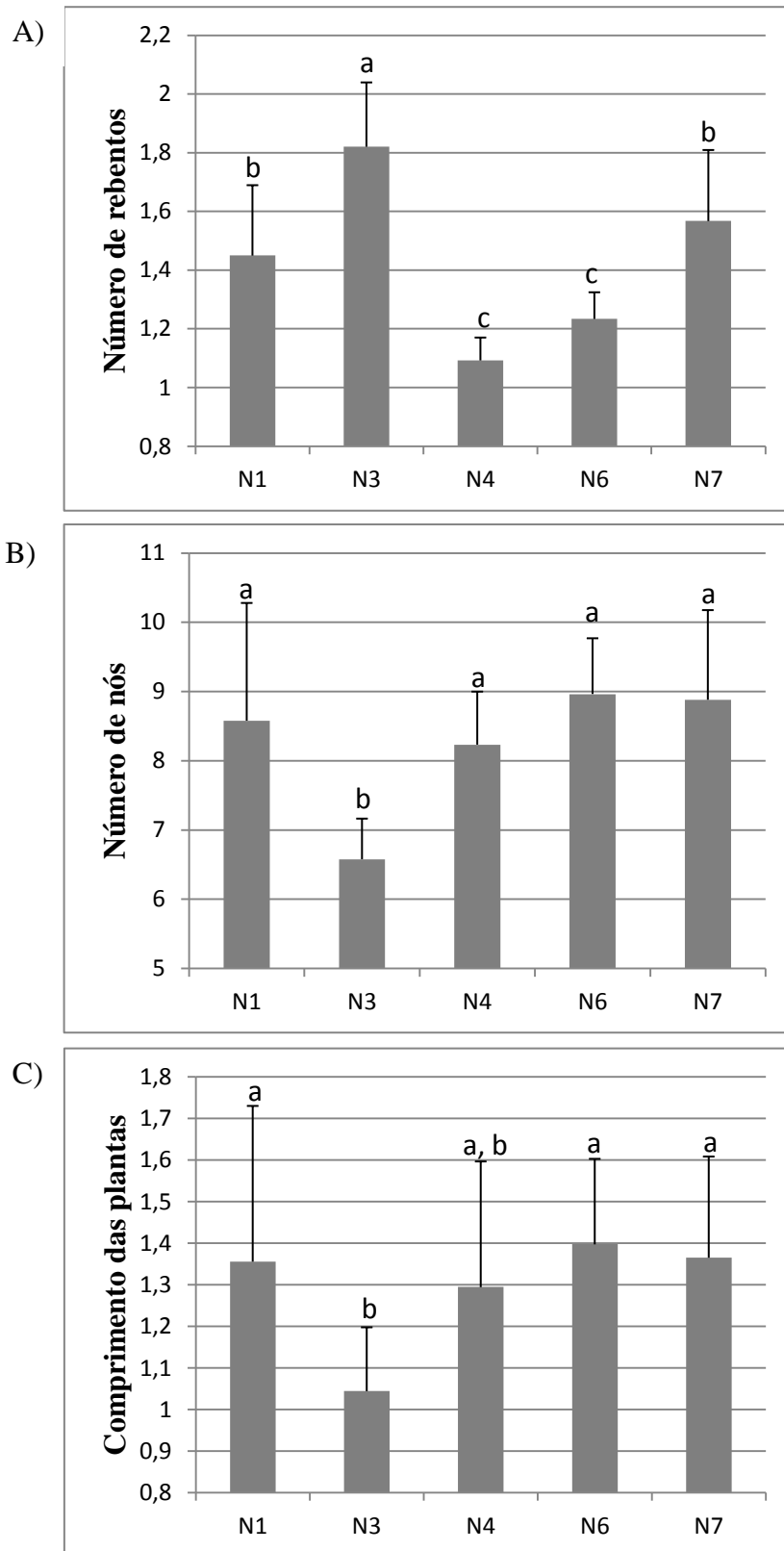


Figura 13: Efeito da fonte de azoto na proliferação de meristemas axilares. A) número de rebentos formados por explante; B) número de nós por rebento; C) comprimento dos rebentos. Os valores apresentados correspondem à média e ao respetivo desvio padrão entre as réplicas. Valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) segundo o teste de Duncan.

3.1.2. Proliferação em meio líquido

Na proliferação de meristemas axilares em meio líquido, procurou avaliar-se o comportamento de 2 clones sujeitos a diferentes condições de cultura, variando os valores de pH e as fontes de azoto, como ocorreu com a proliferação em meio sólido. Na Fig. 14A podem ser observados alguns aspetos dos rebentos caulinares obtidos neste ensaio. A resposta morfogénica é um pouco diferente em relação àquilo que se observa em meio sólido. Nos meios líquidos, o alongamento do explante inicial produz novos nós (figura 14B), a partir dos quais ocorre proliferação, situação que não se verifica nos meios sólidos. Para além disso, em meio líquido o explante original tem tendência a formar raízes (figura 14B). Desta forma, a resposta morfogénica é muito semelhante à produção de rebentos, em condições naturais, a partir de um órgão subterrâneo ou de um caule rastejante.

Foram observados o número de rebentos (Fig. 15A) por explante (apenas os que emergiram do meio de cultura e com comprimento superior a 1cm) e o comprimento do maior rebento (Fig. 15B). Pela análise dos resultados verifica-se que o clone P tem uma preferência por pH mais básico, ao passo que o clone C1 demonstra maior aptidão para pH ácido, no que respeita ao número de rebentos formados. Em relação à fonte de azoto observou-se que, quando os rebentos têm acesso apenas a amónio, como ocorre no meio EN1, não existe formação de novos

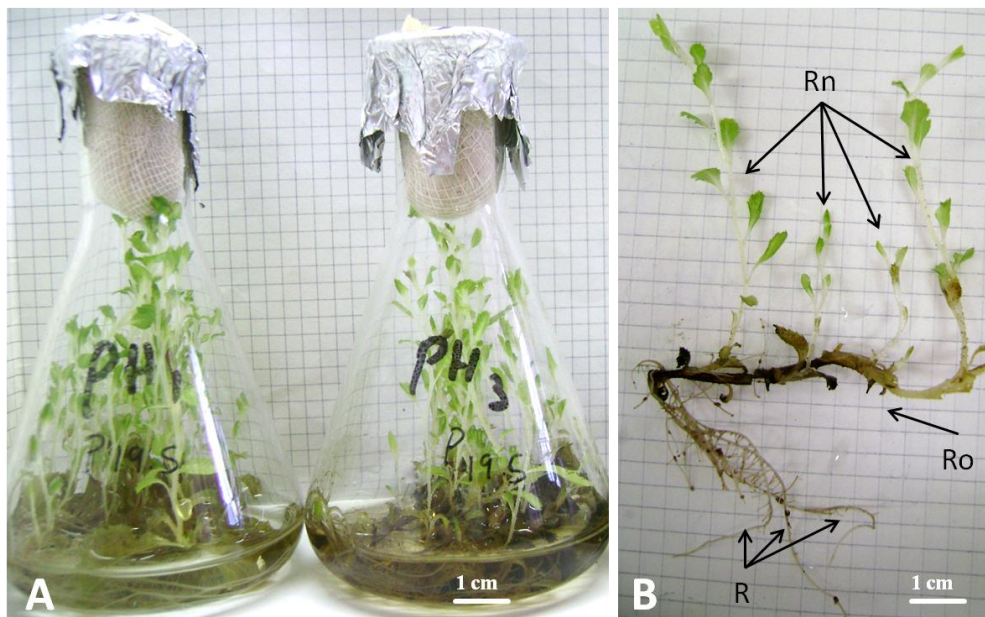


Figura 14: Proliferação em meio líquido: A) rebentos caulinares nos Erlenmeyer onde se observam vários rebentos emergentes. B) pormenor de um rebento (Ro) que deu origem a 4 novos rebentos (Rn) e onde se observa o desenvolvimento de um sistema radicular (R).

rebentos caulinares. Num meio onde as plantas têm acesso apenas a nitrato (EN2), o crescimento é normal mas formam-se menos rebentos e de menores dimensões, facto que se altera um pouco quando adicionados 5mM de amónio, verificando-se um ligeiro aumento no número de rebentos formados e no comprimento dos mesmos. O pH do meio foi medido no fim dos ensaios para avaliar as diferenças entre o início e o fim da experiência (tabela 2), e verificou-se uma grande capacidade de tamponização do meio pelos explantes em cultura.

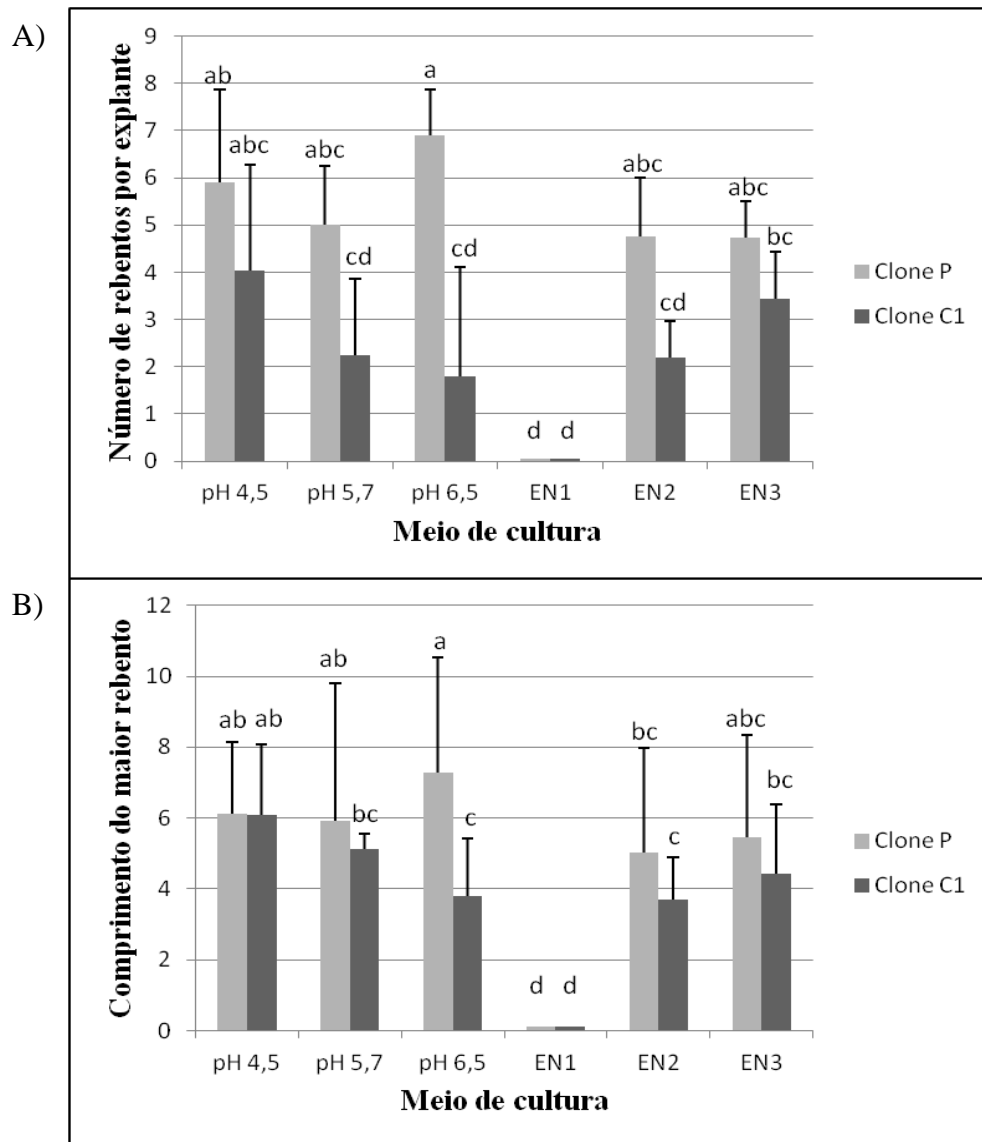


Figura 15: Diferenças visíveis no comportamento dos explantes, dos clones P e C1, no meio de cultura líquido com diferentes valores de pH e fontes de azoto. A) número de rebentos formados por explante; B) comprimento do maior rebento. Os valores apresentados correspondem à média e ao respetivo desvio padrão entre as réplicas. Valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$), segundo o teste de Duncan.

RESULTADOS

Tabela 2: Diferenças nos valores de pH no início e no fim dos ensaios de proliferação em meio líquido. Os valores correspondem às médias e respectivos desvios padrão de cada conjunto de 3 réplicas.

Clone	pH 4,5		pH 5,7		pH 6,5	
	Início	Fim	Início	Fim	Início	Fim
P	4,5±0,00	5,94±0,14	5,7±0,00	5,35±0,28	6,5±0,00	5,95±0,02
C1	4,5±0,00	5,81±0,10	5,7±0,00	5,86±0,51	6,5±0,00	5,83±0,81

3.2. Embriogénese somática

Na embriogénese somática foram realizados ensaios para testar vários valores de pH e a resposta dos explantes a essas alterações. Foram tidos em conta aspetos como a formação de calos, a percentagem de indução de embriogénese e o número de embriões formados por explante. Os dados são apresentados na tabela 3.

Regra geral, verificam-se elevadas percentagens de formação de calo (sempre acima de 50%), sendo que os clones P e C1 são os que melhores resultados demonstraram. Valores de pH mais elevados tendem a originar uma percentagem de indução mais reduzida, o que é visível, principalmente quando comparados os meios com valores de 4,5; 5,5 e 6,5, entre os clones P e C1.

Quanto ao número de embriões por explante, os melhores resultados foram obtidos, mais uma vez, nos clones P e C1. Contudo, o clone P exibiu uma melhor resposta, com maior número de embriões formados, em pH ácido, e o clone C1 revelou uma preferência por pH mais básico. O clone HP, que regista os piores resultados, revela uma formação de calo superior em pH ácido mas a indução de embriogénese é maior em valores de pH intermédios 5,0 – 6,0, e o número de embriões formados parece aumentar com o aumento de pH.

Os embriões observados apresentavam-se muitas vezes em aglomerados e em diferentes fases de desenvolvimento (Fig. 16A, B, C e E). Durante o registo de resultados foram também observados outros aspetos menos comuns: embriões anómalos (Fig. 16C), massas calosas onde se formaram apenas raízes (Fig. 17A) ou de aspeto friável (Fig. 17D) e embriões precocemente germinados com desenvolvimento de raízes (Fig. 17E), cotilédones (Fig. 17B), ou ambos (Fig. 17C).

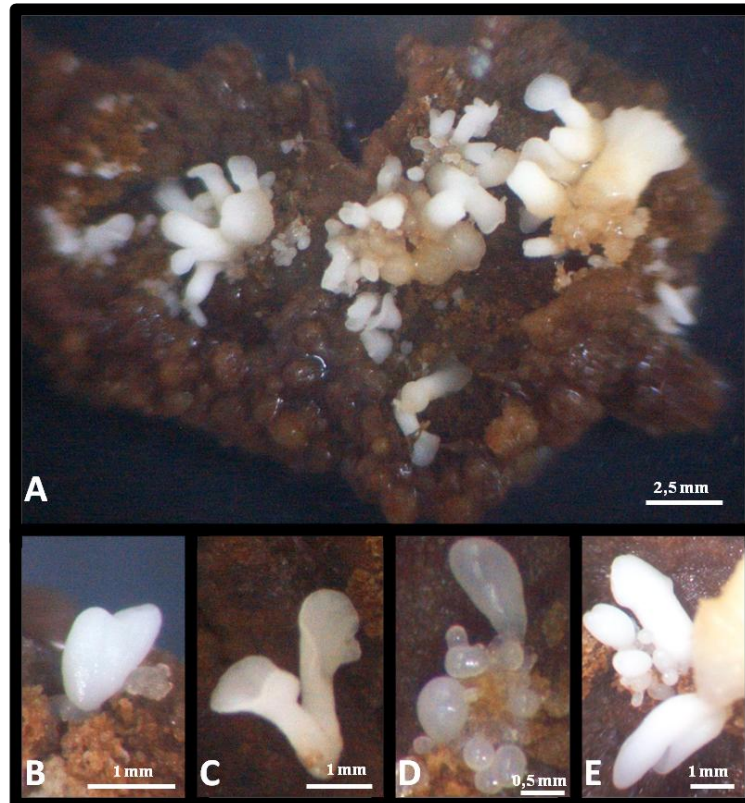


Figura 16: Embriogênese somática em medronheiro. A) aglomerados de embriões em várias fases de desenvolvimento. B) embrião na fase cordiforme. C) dois embriões anômalos onde se observa a presença de apenas um cotilédone. D) grupo de embriões no estado globular numa fase precoce do desenvolvimento. E) grupo de embriões em várias fases de desenvolvimento.

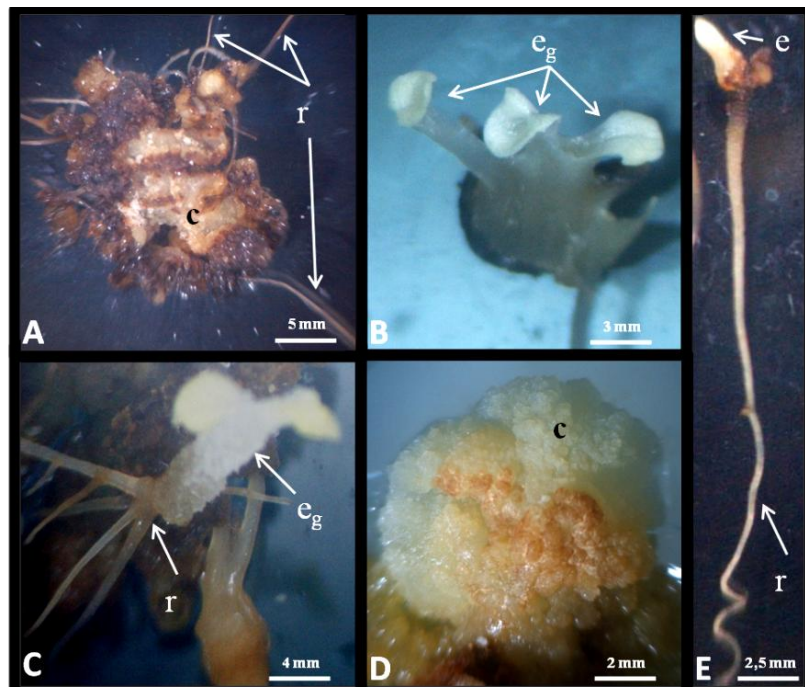


Figura 17: Aspectos menos frequentes na indução de embriogênese somática. A) calo onde se formaram apenas raízes. B) embrião precocemente germinado onde se observa o desenvolvimento dos cotilédones. C) embrião precocemente germinado onde para além dos cotilédones desenvolveu também um sistema radicular. D) calo com aspeto friável. E) embrião precocemente germinado onde se observa o alongamento de uma raiz. c- calo, r- raiz, e_g- embrião germinado. e- embrião.

RESULTADOS

Tabela 3: Diferenças registadas na indução de embriogénese somática, entre os diferentes meios de cultura e clones testados. Valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferenças significativas ($P > 0,05$) pelo teste de Duncan.

Clone	pH	Formação de Calos (%)	Indução (%)	Nº de Embriões
HP	4,5	73,33±45,77 ^{ab}	6,67±25,82 ^b	0,067±0,26 ^b
	5,0	86,67±35,19 ^a	46,67±51,64 ^a	0,867±1,06 ^b
	5,5	60,00±50,71 ^{ab}	33,33±48,79 ^a	0,933±1,44 ^b
	5,7	53,33±51,64 ^b	20,00±41,40 ^{ab}	0,400±0,91 ^b
	6,0	60,00±50,71 ^{ab}	40,00±50,71 ^a	2,267±3,99 ^a
	6,5	53,33±51,64 ^b	33,33±48,79 ^a	0,667±1,05 ^b
P	4,5	100,00±0 ^a	93,33±25,82 ^a	10,87±6,29 ^a
	5,0	100,00±0 ^a	66,67±48,79 ^{ab}	8,33±14,13 ^{ab}
	5,5	93,33±25,82 ^a	53,33±51,64 ^b	2,53±5,32 ^c
	5,7	100,00±0 ^a	66,67±48,79 ^b	3,40±3,72 ^{bc}
	6,0	86,66±35,19 ^a	66,67±48,79 ^b	3,60±4,90 ^{bc}
	6,5	86,66±35,19 ^a	33,33±61,72 ^b	0,53±1,13 ^c
C1	4,5	93,33±25,82 ^a	66,67±48,79 ^a	4,27±4,83 ^a
	5,0	86,67±35,19 ^{ab}	53,33±51,64 ^a	2,07±2,87 ^a
	5,5	53,33±51,64 ^c	53,33±51,64 ^a	1,40±1,99 ^a
	5,7	100,00±0 ^a	60,00±50,71 ^a	5,53±5,95 ^a
	6,0	66,67±48,79 ^{bc}	53,33±51,64 ^a	1,40±2,06 ^a
	6,5	66,67±48,79 ^{bc}	33,33±51,64 ^a	5,80±11,25 ^a

3.3. Enraizamento

No enraizamento dos rebentos caulinares obtidos nos ensaios de proliferação de meristemas, tanto em meio sólido como em meio líquido, foram avaliados parâmetros relativos à parte radicular dos mesmos. A percentagem de enraizamento, número de raízes formadas, formação ou não de raízes adventícias e comprimento da maior raiz, foram avaliados para cada uma das amostras. Os ensaios consistiram em: indução do enraizamento (Fig. 18A), alongamento das raízes (Fig. 18B) e aclimação das plantas (Fig. 18E). Os resultados relativos aos ensaios de enraizamento são apresentados na tabela 4.

Em relação ao pH, no clone P, houve uma elevada taxa de enraizamento, atingindo os 100% em 2 dos meios testados (pH 4,5 e 6,5). O valor mais básico (6,5) registou o maior número de raízes laterais (Fig. 18C) formadas ($11,87 \pm 7,67$), embora tenha registado o menor comprimento das mesmas ($15,5 \pm 3,41$ mm).

Registou, ainda, a maior taxa de formação de raízes secundárias ($60,00 \pm 49,8\%$) (Fig. 18D). No pH mais ácido o número de raízes formadas foi menor ($9,33 \pm 6,01$) mas com maior comprimento ($17,5 \pm 4,11$ mm). A troca de KNO_3 por NH_4Cl nos macronutrientes de Knop levou a um aumento do número de raízes formadas ($12,39 \pm 6,30$), com um comprimento médio de $17,5 \pm 2,59$ mm, embora a taxa de formação de raízes secundárias se tenha ficado pelos $34,44 \pm 48,37\%$. Na presença de KNO_3 e NH_4Cl em simultâneo, apesar da taxa de enraizamento ter sido ligeiramente inferior ($93,33 \pm 11,55\%$), o número de raízes, comprimento e, principalmente, a formação de raízes secundárias ($75,00 \pm 44,10\%$) foram muito satisfatórios.

Nos rebentos do clone P provenientes de cultura em meio líquido os resultados foram um pouco diferentes dos observados anteriormente. Os rebentos provenientes de culturas em meio líquido revelaram-se mais difíceis de enraizar. As taxas de enraizamento em todos os testes referentes ao pH rondaram os 80%, sendo que os melhores resultados foram observados em pH 5,7 com a formação de $4,75 \pm 3,55$ raízes, medindo $16,2 \pm 4,79$ mm e com $62,10 \pm 49,45\%$ de raízes secundárias. Nos meios modificados com NH_4Cl o enraizamento atingiu os 90% e o número de raízes laterais formadas foi maior $5,48 \pm 4,30$. Na utilização de NH_4Cl e KNO_3 a taxa de enraizamento foi a mais baixa ($70,00 \pm 17,32\%$).

No clone C1 as taxas de enraizamento foram ligeiramente menores. Os testes de pH revelaram resultados similares, no entanto o pH 5,7 foi o que produziu um maior número de raízes laterais ($10,40 \pm 6,76$), embora tenha apresentado a menor taxa de formação de raízes secundárias ($47,04 \pm 50,79\%$). O meio com NH_4Cl nos macronutrientes de Knop levou, como aconteceu no clone P, a um aumento do número de raízes formadas ($10,63 \pm 8,52$), com um comprimento médio de $15,3 \pm 3,37$ mm, embora a taxa de formação de raízes secundárias se tenha ficado pelos $23,33 \pm 43,02\%$. Na presença de KNO_3 e NH_4Cl em simultâneo, o número de raízes laterais formadas foi reduzido ($6,92 \pm 5,14$), assim como o comprimento das mesmas ($13,0 \pm 5,23$ mm) e a taxa de raízes secundárias formadas ($41,48 \pm 50,12\%$).

Após 3 semanas em areia e perlite, as plantas foram transferidas para uma mistura contendo também turfa (Fig. 19C). Na passagem das plantas para a segunda fase de aclimação observou-se que as plantas dos clones P e C1, provenientes de

RESULTADOS

cultura em meio sólido, apresentavam um sistema radicular bem desenvolvido (Fig. 19A, B), ao passo que os rebentos provenientes de meio líquido apresentavam um sistema radicular muito pouco desenvolvido, tendo sido registada alguma mortalidade nas plantas durante a primeira fase de aclimação (cerca de 13% no total, sendo que 4,7% ocorreram em plantas provenientes do meio EN2, 2,7% do meio EN1 e pH 5,7; 2% do meio pH 6,5 e 1,3 do meio pH 4,5). Nas plantas dos clones P e C1 as taxas de sobrevivência foram de 96,7 e 100% respetivamente.

Tabela 4: Diferenças registadas durante o enraizamento dos rebentos, entre os diferentes meios de cultura e clones testados. Valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferenças significativas ($P > 0,05$) pelo teste de Duncan. (C) controlo, (L) meio líquido.

Clone	Meio de Cultura	Enraizamento (%)	Nº de Raízes laterais	Comprimento da > raiz (mm)	Raízes secundárias (%)
P	pH = 4,5	100,00±0,00 ^a	9,33±6,01 ^a	17,5±4,11 ^a	56,67±50,40 ^{ab}
	pH = 5,7 (C)	96,67±5,77 ^a	10,98±6,48 ^a	16,8±2,91 ^a	55,19±50,61 ^{ab}
	pH = 6,5	100,00±0,00 ^a	11,87±7,67 ^a	15,5±3,41 ^a	60,00±49,83 ^{ab}
	EN1	96,67±5,77 ^a	12,39±6,30 ^a	17,5±2,59 ^a	34,44±48,37 ^b
	EN2	93,33±11,55 ^a	11,41±6,88 ^a	16,5±3,01 ^a	75,00±44,10 ^a
P (L)	pH = 4,5	83,33±5,77 ^a	3,52±2,17 ^a	14,3±5,14 ^{ab}	55,16±50,99 ^a
	pH = 5,7 (C)	80,00±10,00 ^a	4,75±3,55 ^a	16,2±4,79 ^a	62,10±49,45 ^a
	pH = 6,5	80,00±17,32 ^a	3,76±2,04 ^a	12,3±4,47 ^b	35,19±48,15 ^a
	EN1	90,00±0,00 ^a	5,48±4,30 ^a	15,8±2,94 ^a	59,26±50,07 ^a
	EN2	70,00±17,32 ^a	4,85±3,62 ^a	15,1±2,93 ^{ab}	46,67±51,17 ^a
C1	pH = 4,5	96,67±5,77 ^a	8,95±5,00 ^a	17,5±4,11 ^a	62,22±49,38 ^a
	pH = 5,7 (C)	93,33±5,77 ^a	10,40±6,76 ^a	16,8±4,97 ^a	47,04±50,79 ^{ab}
	pH = 6,5	90,00±10,00 ^a	9,76±4,95 ^a	17,0±4,35 ^a	54,81±50,64 ^{ab}
	EN1	100,00±0,00 ^a	10,63±8,52 ^a	15,3±3,37 ^a	23,33±43,02 ^b
	EN2	96,67±5,77 ^a	6,92±5,14 ^a	13,0±5,23 ^b	41,48±50,12 ^{ab}

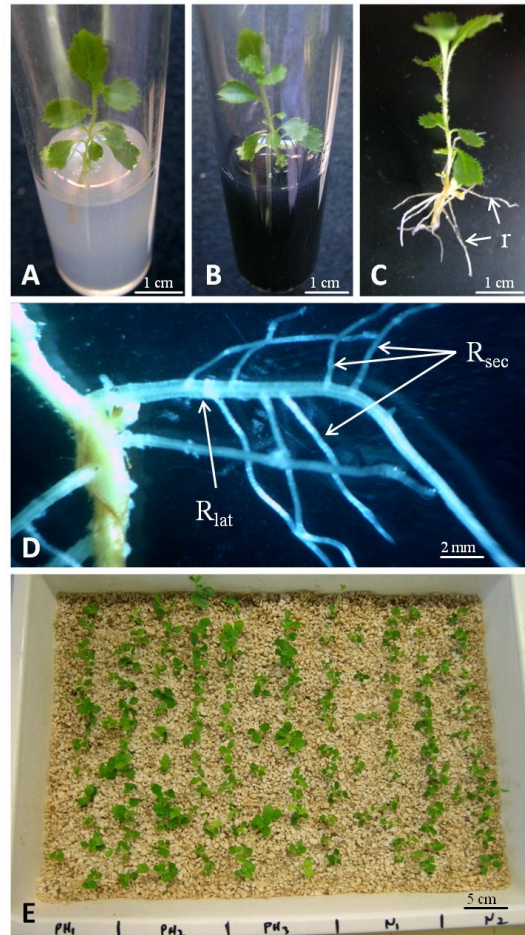


Figura 18: Enraizamento e aclimação de rebentos caulinares obtidos na proliferação de meristemas. A) fase de indução. B) fase de alongamento das raízes. C) rebento após o alongamento das raízes. D) pormenor de uma raiz lateral onde se observam várias raízes secundárias. E) plantas no substrato contendo areia e perlite. r- raiz, R_{lat} - raiz lateral, R_{sec} - raízes secundárias.

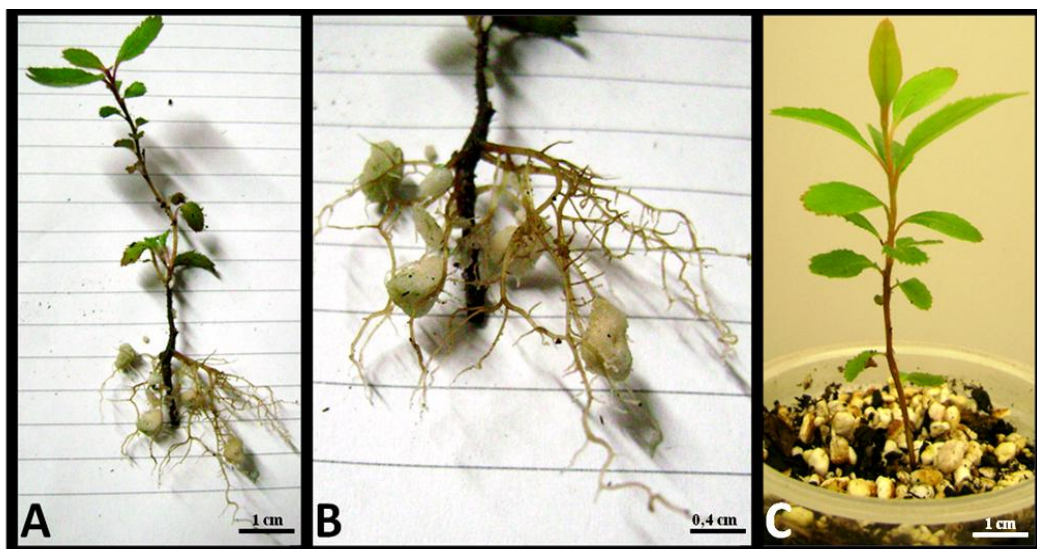


Figura 18: Transferência de plantas da mistura de areia e perlite para a mistura contendo turfa, areia e perlite. A) planta com um sistema radicular bem desenvolvido e aspeto saudável. B) pormenor do sistema radicular onde se observam várias raízes laterais e secundárias. C) planta com 5 semanas na mistura de turfa, areia e perlite.

4. **DISCUSSÃO**

A micropropagação engloba um conjunto de técnicas de cultura *in vitro* maioritariamente aplicadas à propagação em larga escala, para ensaios de campo ou para suprimir necessidades de mercado (Chawla, 2009; Canhoto, 2010). É normalmente utilizada para espécies difíceis de propagar por outras vias ou para fixar génotipos de interesse (Canhoto, 2010). No medronheiro esta metodologia tem sido utilizada com sucesso para obtenção de um elevado número de plantas de qualidade para ensaios de laboratório, de campo e para satisfazer agricultores que procuram nesta espécie um maior rendimento económico (Gomes *et al.*, 2010).

Alguns grupos de ericáceas encontram-se bem adaptados a níveis baixos de pH no solo e a uma nutrição especializada em NH_4^+ , como é o caso do género *Vaccinium* (Claussen e Lenz, 1999; Britto e Kronzucker, 2002). No entanto, os resultados verificados em *A. unedo*, no que respeita à micropropagação, são um pouco diferentes como podemos observar seguidamente.

No decorrer do presente trabalho procurou avaliar-se qual o pH ótimo e qual a fonte de azoto mais indicada para o melhor rendimento em diversas etapas da micropropagação: *i*) proliferação de meristemas (em meio sólido e líquido), *ii*) embriogénese somática e *iii*) enraizamento.

4.1. Proliferação de meristemas

A constituição do meio de cultura utilizado na proliferação de meristemas axilares e de outros métodos de micropropagação é fundamental para a obtenção de resultados satisfatórios, sendo o pH e a fonte de azoto dois aspetos essenciais para o sucesso da propagação.

4.1.1. Meio sólido

Tendo em consideração os testes de pH efetuados, observa-se que os explantes do clone P reagem geralmente melhor a valores de pH entre os 5,7 e 6,5. Isto é evidente, principalmente, no que concerne ao número de nós e ao comprimento dos rebentos. Para valores ácidos de pH (4,5 e 5,0) verificou-se uma redução da área foliar e cloroses nas folhas de alguns rebentos caulinares, o que sugere que estes valores de pH podem interferir com a disponibilidade de nutrientes (Trigiano e Gray, 2011) para a planta ou que limitam, de alguma forma, a sua absorção do meio de cultura. No entanto, valores de pH de 4,8 ou 5,2 são usados

normalmente para a proliferação de outras ericáceas do género *Vaccinium* (Pereira, 2006; Schuch *et al.*, 2008).

Os ensaios onde se testou a fonte de azoto mostraram que o bom desenvolvimento dos rebentos ocorre na presença simultânea de NO_3^- e NH_4^+ . Quando o azoto foi adicionado ao meio de cultura na forma exclusiva de NH_4^+ , registou-se uma elevada taxa de mortalidade, provavelmente devido à sua toxicidade, como indicam estudos realizados por Britto e Kronzucker (2002). Por sua vez, no meio sem NH_4^+ , apesar de ocorrer uma maior formação de rebentos por organogénese, estes possuíam um reduzido número de nós de pequeno comprimento, não permitindo assim a propagação efetiva por proliferação de meristemas axilares. Estes dados permitem concluir que, no caso do medronheiro, o amónio é inibidor do desenvolvimento caulinar, mas absolutamente necessário para o seu desenvolvimento ulterior. Deste modo, e em termos de ensaios futuros, seria interessante avaliar a taxa de micropropagação fazendo uma cultura inicial dos segmentos nodais em meio sem amónio, seguida de uma transferência para meio de cultura contendo azoto nas formas de nitrato e amónio. A organogénese, apesar de resultar num maior número de rebentos, compromete o genótipo, podendo levar a alterações genéticas ou epigenéticas nas plantas regeneradas (Gomes, 2011). Elevados níveis de nitrato (40mM) resultam também em elevadas taxas de mortalidade, talvez devido à basificação do meio de cultura.

De entre as fontes de azoto testadas, as que se revelaram mais promissoras foram, 10mM de NO_3^- e NH_4^+ (N6) ou 20mM de NO_3^- e 5mM de NH_4^+ (N7). Estes meios apresentam os melhores resultados na globalidade dos parâmetros testados, mostrando-se como uma alternativa ao meio até agora utilizado para obtenção de um maior número de plantas a longo prazo, embora o meio N7 apresente alguma indução de organogénese. Este facto deve ser tido em conta na propagação das plantas pela possibilidade de variações no genótipo. A utilização de NO_3^- e NH_4^+ em simultâneo no meio de cultura pode resultar em menores variações de pH. Como tal, a junção destas duas fontes de azoto é mais indicada, não só, para a proliferação de meristemas, como também para outras técnicas de micropropagação (Woodward *et al.*, 2006).

4.1.2. Meio líquido

No que respeita à proliferação em meio líquido, verifica-se uma preferência por pH próximo da neutralidade (6,5) no clone P, ao contrário do que acontece para o clone C1 onde se nota maior aptidão para valores baixos de pH (4,5). No final dos ensaios, o pH foi medido novamente, revelando que independentemente dos valores iniciais, o valor final rondou sempre os 5,8. Esta observação sugere que as plântulas de medronheiro possuem uma forte capacidade de tamponizar o meio, ajustando o pH para adaptação às novas condições a que são sujeitas. Para compreensão da forma como as plantas ajustam o pH é necessário que se realizem estudos mais aprofundados, no entanto é conhecido o papel que as H⁺-ATPases do plasmalema desempenham neste processo (Taiz e Zeiger, 2010).

Em relação à fonte de azoto verifica-se que, apenas na presença de amónio, não se formam novos rebentos caulinares em nenhum dos clones testados. Este teste sugere que a nutrição baseada exclusivamente em amónio pode ser tóxica (Britto e Kronzucker, 2002) e que o nitrato é essencial para o bom desenvolvimento dos rebentos. Na presença apenas de nitrato como fonte de azoto, ou de 20mM de NO₃⁻ e 5mM de NH₄⁺, a proliferação dá-se de forma normal embora o número de rebentos e comprimento dos mesmos sejam, na maioria dos casos, inferiores aos observados no teste controlo.

Contudo, devem ser realizados mais testes em relação a estes fatores, com a utilização de um maior número de réplicas, para obtenção de dados mais concretos. Para além disso, devem ser testados novos génotipos de forma a avaliar com maior exatidão quais as melhorias a aplicar nos meios de cultura, para otimizar a proliferação de meristemas na espécie, e em cada génotipo particularmente. A adaptação dos diferentes génotipos a diferentes valores de pH é interessante e deve ser explorada para a obtenção de plantas destinadas a diferentes tipos de solos.

4.2. Embriogénese somática

A embriogénese somática apresenta vantagens na obtenção de plantas de um dado génotipo de interesse, uma vez que o génotipo dos embriões somáticos formados é o mesmo da planta mãe dos explantes que lhes deram origem (Chawla,

2009). A embriogénese somática, no medronheiro, dá-se de forma indireta, com a formação prévia de um calo onde posteriormente se formam os embriões (Gomes e Canhoto, 2009).

O efeito do pH, na embriogénese somática, tinha sido já testado noutra ericácea por Anthony *et al.* (2004a). Este estudo mostrou que na espécie *Leucopogon verticillatus* a formação de embriões somáticos se revela mais eficaz em valores de pH entre 6,0 e 7,0. Estudos sobre o efeito do pH em *Aquilaria malaccensis* mostraram uma preferência por pH 5,7 em relação a um pH de 5,0; 5,5 ou 6,0, utilizando o meio MS suplementado com 1,1µM NAA e 2,2µM de BA (Jayaraman *et al.*, 2014).

No presente trabalho, verifica-se uma resposta distinta nos três clones testados. Apesar da elevada taxa de formação de calos, apenas nalguns se verificou a indução de embriogénese, começando os embriões a aparecer após 7-8 semanas. Nesta técnica, o mais relevante é o número de embriões formados e, quanto a isso, verifica-se que o clone P é claramente mais eficiente, nomeadamente em meio ácido, onde o pH se mantém nos 5,0 ou acima. Já no clone C1, apesar do menor número de embriões, é preferível a utilização de um meio mais básico. O clone HP mostrou uma resposta embriogénica bastante mais reduzida que os demais sendo, no entanto, observável uma aptidão para valores de pH mais básicos. Nos testes de embriogénese somática foram encontradas poucas diferenças significativas, devido em grande parte, à heterogeneidade na resposta dos explantes e ao elevado desvio padrão daí decorrente. Grande parte dos calos formados apresentava uma acentuada oxidação e níveis de indução bastante reduzidos. Isto poderá ser mitigado em futuros ensaios através da manipulação dos explantes em água, como proposto por Anthony *et al.* (2004b), onde se observaram melhores resultados na indução de embriogénese somática de uma ericácea da espécie *Conostephium pendulum*.

A manipulação dos valores de pH nesta técnica necessita de ser otimizada, pois o processo de indução é muito longo, facto que, dada a capacidade que os tecidos têm para tamponizar o meio, pode conduzir a resultados enganadores. Isto em virtude de, nos vários ensaios, o pH final dos meios poder diferir muito do observado inicialmente. Uma alternativa a este tipo de ensaios poderá passar pela aplicação de choques de pH, ou seja, valores extremos de pH durante curtos

períodos de tempo seguindo-se a transferência para meios com valores de pH idênticos aos valores normalmente utilizados (5,5-5,8). Ensaio deste tipo realizados no laboratório com *Feijoa sellowiana* evidenciaram que valores extremos de pH são capazes de induzir embriogénese somática mesmo na ausência do efeito estimulador das auxinas (Marques, 1997). O transporte polar de auxinas é influenciado pelo pH e é um mecanismo importante no desenvolvimento embrionário (Prasad e Dhonukshe, 2013).

Aquando dos testes de indução de embriogénese somática, foram observados alguns aspetos menos frequentes como a formação de raízes adventícias nos calos. Este facto deve-se, provavelmente, à exposição prolongada à auxina NAA, visto que esta estimula, também, a indução de enraizamento (Canhoto, 2010). Para além disso, os embriões formados apresentavam geralmente reduzidas dimensões tendo por isso de ser transferidos para um meio sem reguladores de crescimento até reunirem condições para ser germinados. A formação de embriões anómalos ou a germinação precoce foram outros aspetos que com alguma regularidade se observaram. Estas características menos desejáveis foram reportadas noutros estudos efetuados nesta espécie por Martins (2012). De forma a mitigar o aparecimento destes aspetos indesejáveis, mais estudos deverão ser efetuados no que concerne à constituição do meio de cultura, ou mesmo em relação ao tipo de explante usado ou à maneira como este é manipulado. A perda de capacidade embriogénica dos calos apresenta uma limitação que deve ser analisada para uma utilização plena das vantagens desta técnica de micropropagação.

Futuramente devem também ser realizados ensaios para testar o efeito da fonte de azoto, que neste trabalho, devido a alguns imprevistos, não revelaram nenhum tipo de resposta por parte dos explantes.

4.3. Enraizamento

O enraizamento dos rebentos micropropagados é um passo crucial para o sucesso da propagação (Chawla, 2009, Gomes, 2011). Estudos a este nível foram levados a cabo por Mereti *et al.* (2002) e por Gomes (2011) obtendo resultados semelhantes (próximos de 100%) utilizando a auxina IBA (10 e 24,7 μ M, respetivamente) como agente promotor do enraizamento.

No decurso deste trabalho obtiveram-se taxas de enraizamento bastante satisfatórias em todos os meios testados (80 – 100%), apesar de ocorrerem algumas diferenças, nomeadamente no número de raízes laterais formadas e na presença de raízes secundárias. Os resultados obtidos no enraizamento de rebentos, provenientes de cultura em meio sólido, dos clones P e C1, foram bastante semelhantes. O enraizamento de rebentos provenientes da cultura em meio líquido revelou limitações, com a formação de um número reduzido de raízes.

Valores de pH próximos da neutralidade (6,5) favorecem a formação de raízes no clone P (11,87 \pm 7,67), ao passo que valores mais baixos (5,7) são mais indicados para o clone C1 (10,40 \pm 6,76) ou mesmo para o enraizamento de rebentos provenientes da cultura em meio líquido (4,75 \pm 3,55). Esta preferência por valores de pH semelhantes aos que habitualmente rodeiam as células vegetais (Canhoto, 2010) deve-se certamente ao facto de haver uma maior disponibilidade de elementos minerais (Trigiano e Gray, 2011) essenciais ao bom desenvolvimento das raízes e das plantas. O facto de génotipos diferentes responderem de maneira diversa aos valores de pH do meio é um aspeto bastante interessante, pois significa que nem todas as plantas respondem igualmente a este importante fator do meio. Esta constatação poderá ser relevante na utilização de génotipos adaptados a tipos particulares de solo, mais ou menos ácidos. Sendo o medronheiro uma espécie com uma vasta área de distribuição no nosso país e atendendo ao interesse crescente na cultura desta espécie em diferentes locais, importa definir quais os génotipos mais adaptados a cada tipo de solo.

A fonte de azoto influencia também a formação de raízes laterais e secundárias. Com a modificação da solução de Knop, trocando o KNO₃ por NH₄Cl é evidente a formação de um maior número de raízes laterais (12,39 \pm 6,30 para o

clone P, $10,63 \pm 8,52$ para o clone C1 e $5,48 \pm 4,30$ para o clone P proveniente de meio líquido), embora a formação de raízes secundárias seja baixa, exceto para rebentos provenientes de meio líquido (60%). Quando presentes em simultâneo KNO_3 e NH_4Cl na solução de Knop observa-se uma formação de 75% de raízes secundárias em plantas do clone P, numa média de $11,41 \pm 6,88$ raízes laterais formadas, indicando que este meio é indicado para um aumento da área radicular neste clone.

Na maioria dos casos, aquando da aclimação, as plantas desenvolveram bastante os sistemas radiculares. Inclusive, algumas onde o enraizamento não se tinha verificado em tempo devido, formaram raízes já durante a fase de aclimação. O mesmo não aconteceu nos rebentos provenientes de culturas em meio líquido onde os sistemas radiculares se mostraram muito pouco desenvolvidos. Isto deve-se, provavelmente, ao facto das fases de indução e alongamento das raízes ocorrer em meio sólido e as plantas estarem adaptadas à nutrição em meio líquido. As taxas de mortalidade apresentadas neste caso foram também elevadas, atingindo uma totalidade de 13,3% nos 5 meios testados. Estes dados sugerem que a proliferação em meio líquido apesar de originar um grande número de rebentos, não é ainda uma boa opção para a propagação desta espécie, necessitando o protocolo de ser otimizado. De modo a ultrapassar estas dificuldades no enraizamento poderão ser cultivados os rebentos (provenientes da proliferação em meio líquido) em meio sólido, numa etapa anterior ao enraizamento, de modo a ultrapassar as dificuldades de enraizamento, que podem estar ligadas à fragilidade dos rebentos.

Para além das modificações causadas no meio de cultura, também o genótipo das plantas utilizadas teve influência nos resultados obtidos. Futuramente devem ser realizados ensaios de enraizamento com outros clones e uma junção das variáveis testadas com melhores resultados, aliando os melhores valores de pH com a melhor fonte de azoto para cada caso específico.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O recurso às várias técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, de espécies vegetais, tem-se revelado uma ferramenta bastante útil para a compreensão de processos fisiológicos, fixação de genótipos de interesse e propagação de plantas em larga escala (principalmente quando estas apresentam dificuldades na multiplicação por métodos convencionais, como é o caso do medronheiro). Da indução de embriogénese somática, à proliferação de meristemas, passando pelo enraizamento e culminando na aclimação das plantas, todos os processos de micropropagação devem ser analisados para otimizar a obtenção de plantas de qualidade em larga escala. A valorização do medronheiro como espécie frutícola de interesse depende em grande parte do sucesso na sua micropropagação. Deste modo, pode passar a assumir um papel importante, não só como fonte de rendimento, mas também, como elemento essencial à gestão das florestas portuguesas, de forma a diminuir a incidência e propagação de incêndios florestais, garantindo a preservação da biodiversidade característica do nosso território.

A otimização de protocolos com vista às melhorias da micropropagação é essencial e o presente trabalho pretendeu ser um contributo para o aperfeiçoamento das condições de cultura *in vitro* na espécie *Arbutus unedo*, podendo estender-se a outras espécies do mesmo género ou família.

A proliferação de meristemas axilares revela-se uma técnica bastante eficaz para a propagação de medronheiro. Pode ser melhorada equilibrando os níveis de azoto nas formas de NO_3^- e NH_4^+ , de maneira a diminuir flutuações no pH do meio. Este, de acordo com os resultados obtidos, deve ser ajustado consoante o clone que se utiliza. A indução de organogénese verificada em alguns dos meios testados pode comprometer o genótipo das plantas, devendo ser evitada com a otimização dos protocolos. A proliferação em meio líquido, apesar de permitir a obtenção de um grande número de rebentos num curto espaço de tempo, coloca limitações nas fases de enraizamento e aclimação das plantas daí resultantes, pondo em causa a sua utilização como método eficaz de micropropagação. Esta metodologia, embora de grande potencial, deve ser otimizada em ensaios futuros.

Na embriogénese somática, a transição ineficiente de massas calosas pró-embriogénicas em embriões desenvolvidos, bem como a indução assíncrona dos embriões e as anomalias verificadas, são aspetos que devem ser aperfeiçoados. Isso pode ser conseguido com recurso a novas composições nos meios de cultura ou mesmo com uma abordagem diferente no manuseamento dos explantes. Com este

trabalho verificou-se que o pH tem influência na indução de embriogénica que pode ser rentabilizada de acordo com o clone em teste para a produção do maior número de embriões possível.

O enraizamento é uma etapa fundamental para o sucesso da micropropagação, pois é nesta fase que os rebentos caulinares, obtidos nos diversos métodos de proliferação de meristemas, são convertidos em plantas para que possam ser depois utilizados no campo. A formação de raízes é afetada pelos níveis de pH e pela fonte de azoto disponível. O nível de pH ótimo varia consoante o clone testado. Por outro lado, em relação à fonte de azoto, o uso de NH_4Cl revelou a formação de maior número de raízes, mas a maior taxa de formação de raízes secundárias ocorreu com a presença em simultâneo de KNO_3 . Futuramente, será vantajoso o uso de maior concentração de NH_4Cl mantendo os níveis base de KNO_3 no meio.

Todas as etapas de micropropagação devem ser otimizadas para que o material vegetal, posto à disponibilidade de potenciais interessados, mantenha um custo competitivo em relação a outras alternativas de mercado. Ensaio de campo com as plantas micropropagadas devem ser realizados futuramente. Estes ensaios são fundamentais para avaliar o potencial e qualidade das plantas, bem como as condições edafoclimáticas ideais para cada genótipo.

As plantas são uma fonte interessante de compostos bioativos que podem ser utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética ou alimentar. O medronheiro é rico em alguns compostos interessantes, sendo este também um aspeto a ter em conta para a valorização da espécie. A constituição do medronheiro nestes compostos interessantes deve ser também avaliada consoante o tipo de solo onde os diferentes genótipos crescem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, M. M., Godinho, B., & Magalhães, M. C. F. (2014). Risk assessment of *Arbutus unedo* L. fruits from plants growing on contaminated soils in the Panasqueira mine area, Portugal. *Journal of Soils and Sediments*, 14(4), 744-757.
- Afonso, M. D. L. R. (1991). *Plantas do Algarve*. Serviço Nacional de Parques, Reservas e conservação da Natureza.
- Aguiar, C.; Pinto, B. (2007) - Paleo-história e história antiga das florestas de Portugal continental: até à Idade Média. In Silva, J. Sande Árvores e florestas de Portugal: floresta e sociedade, uma história comum. Lisboa: Jornal Público, Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Liga para a Proteção da Natureza. p. 15-53. ISBN 978-989-619-104-7
- Alarcão-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G., & Leitão, M. C. A. (2001). The arbutus berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(1), 27-35.
- Allan, D. L., Cook, B. D., & Rosen, C. J. (1994). Nitrogen form and solution pH effect on organic acid content of cranberry roots and shoots. *HortScience*, 29(4), 313-315.
- Almeida, R., Gonçalves, S., & Romano, A. (2005). In vitro micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodiversity & Conservation*, 14(5), 1059-1069.
- Anderson, W. C. (1984). A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109, 343-347.
- Anthony, J. M., Senaratna, T., Dixon, K. W., & Sivasithamparam, K. (2004a). Somatic embryogenesis for mass propagation of Ericaceae – a case study with *Leucopogon verticillatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(2), 137-146.
- Anthony, J. M., Senaratna, T., Dixon, K. W., & Sivasithamparam, K. (2004b). The role of antioxidants for initiation of somatic embryos with *Conostephium pendulum* (Ericaceae). *Plant cell, tissue and organ culture*, 78(3), 247-252.
- Banko, T.J. and Stefani, M.A. (1989) In vitro propagation of *Oxydendrum arboretum* from mature trees. *HortScience* 24, 683–685.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bianchi, F., Careri, M., & Musci, M. (2005). Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterization of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food chemistry*, 89(4), 527-532.
- Bowsher, C., Steer, M., & Tobin, A. (2008). *Plant biochemistry*. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC.
- Britto, D. T., & Kronzucker, H. J. (2002). NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159(6), 567-584.
- Campbell, C. A. (1978). Soil organic carbon, nitrogen and fertility. In Schnitzer, M., & Khan, S. U. (Eds.). (1975). *Soil organic matter* (Vol. 8). Elsevier, 4, 173-265.
- Canhoto J. M., 2010. *Biotechnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Cela, P. G., Viñas, J. I. G., & Gamarra, R. G. (2003). *Árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Madrid.
- Celikel, G. *et al* (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 118(2), 115-119.
- Chawla, H. S. (2009). Introduction to plant biotechnology. Third edition. Enfield: Science Publishers.
- Claussen, W., & Lenz, F. (1999). Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant and Soil*, 208(1), 95-102.
- De Fossard, R. A., Myint, A., & LEE, E. (1974). A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum*) pith tissue callus. *Physiologia Plantarum*, 31(2), 125-130.
- Ertekin, M., & Kirdar, E. (2010). Breaking Seed Dormancy of Strawberry Tree (*Arbutus unedo*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(1), 57-60.
- Falovo, C., Colla, G., Schreiner, M., Krumbein, A., & Schwarz, D. (2009). Effect of nitrogen form and radiation on growth and mineral concentration of two *Brassica* species. *Scientia horticulturae*, 123(2), 170-177.

- Ferreira, S., Santos, J., Duarte, A., Duarte, A. P., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2012). Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Natural product research*, 26(16), 1558-1560.
- Flora de Portugal Interativa. (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt/#/1Arbutus+unedo (Acedido a 15/06/2014).
- Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P. M., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R. B., & Santos, C. N. (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2(2), 214-229.
- Franco, J. A. (1984). Nova Flora de Portugal, Vol II. *Sociedade Astória, Lda.*, Lisboa.
- Gautheret, R. J. (1959). La culture des tissues végétaux, techniques et réalisations. Masson, Paris.
- GFU: Global Facilitation Unit for Underutilized Species. <http://www.underutilized-species.org> (Acedido a 15/06/2013).
- Godinho-Ferreira, P., Azevedo, A., & Rego, F. (2005). Carta da tipologia florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana*, 13(1), 1-34.
- Gomes, F. (2011). Strategies for the improvement of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree): in vitro propagation, mycorrhization and diversity analysis. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra.
- Gomes, F., & Canhoto, J. M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(1), 72-82.
- Gomes, F., Gama, J., Figueiredo, P., Santos, A. R., & João, C. (2014). Clonagem de plantas selecionadas de medronheiro e a sua avaliação de campo. Disponível em <http://www.greenclon.pt/artigofgomesalgarve.pdf> (acedido a 17/06/2014).
- Gomes, F., Lopes, M. L., Santos, T., & Canhoto, J. M. (2008). Micropropagation of Selected Trees of *Arbutus unedo* L. through Axillary Shoot Proliferation and Somatic Embryogenesis. In *International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: BIOTECHFRUIT2008*. 839 (pp. 111-116).
- Gomes, F., Machado, H., San Martin, E., Portugal, A., & Canhoto, J. M. (2013). Mycorrhizal synthesis between *Pisolithus arhizus* and adult clones of *Arbutus unedo* in vitro and in nursery. *Journal of Forestry Research*, 24(4), 659-670.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gomes, F., Simões, M., Lopes, M. L., & Canhoto, J. M. (2010). Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L.(strawberry tree). *New biotechnology*, 27(6), 882-892.
- Guerreiro, A. C., Gago, C. M., Miguel, M. G., & Antunes, M. D. (2013). The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. *Scientia Horticulturae*, 159, 96-102.
- Hammami, I., Jellali, M., Ksontini, M., & Rejeb, M. N. (2005). Propagation of the strawberry tree through seed (*Arbutus unedo*). *Int. J. Agric. Biol*, 7, 457-459.
- Heldt, H. W., & Piechulla, B. (2010). *Plant biochemistry*. Academic Press. 307-320.
- Hileman, L. C., Vasey, M. C., & Thomas Parker, V. (2001). Phylogeny and biogeography of the Arbutoideae (Ericaceae): implications for the Madrean-Tethyan hypothesis. *Systematic Botany*, 26(1), 131-143.
- Humphries, C. J., Press, J. R., & Sutton, D. A. (2005). Árvores de Portugal e Europa, 282-283.
- ICNF, 2013. *IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental. Resultados preliminares*. [pdf], 34 pp, Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. Lisboa.
- Isutsa, D. K., Pritts, M. P., & Mudge, K. W. (1994). Rapid propagation of blueberry plants using ex vitro rooting and controlled acclimatization of micropropagules. *HortScience*, 29(10), 1124-1126.
- Jayraman, S., Daud, N. H., Halis, R., & Mohamed, R. (2014). Effects of plant growth regulators, carbon sources and pH values on callus induction in *Aquilaria malaccensis* leaf explants and characteristics of the resultant calli. *Journal of Forestry Research*, 25(3), 535-540.
- Lancellotti, E., Iotti, M., Zambonelli, A., & Franceschini, A. (2014). Characterization of *Tuber borchii* and *Arbutus unedo* mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 1-6.
- Lloyd, G.B. and McCown, B.H. (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30, 421-427.
- Lopes, L., Sá, O., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2012). Genetic diversity of Portuguese *Arbutus unedo* L. populations using leaf traits and molecular markers: An approach for conservation purposes. *Scientia Horticulturae*, 142, 57-67.

- Mackay, W. A. (1996). Micropropagation of Texas madrone, *Arbutus xalapensis* HBK. *HortScience*, 31(6), 1028-1029.
- Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2012). *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 473-478.
- Marques, M. R. (1997). Embriogénese somática e outros métodos de regeneração em *Feijoa sellowiana* Berg. Tese de mestrado. Universidade de Coimbra.
- Martins, J. F. S. (2012). Estudos de cultura *in vitro* de medronheiro (*Arbutus unedo* L.) aplicados ao seu melhoramento. Tese de mestrado. Universidade de Coimbra.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., & Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2285-2291.
- Mereti, M., Grigoriadou, K., & Nanos, G. D. (2002). Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Scientia horticultrae*, 93(2), 143-148.
- Metaxas, D. J., Syros, T. D., Yupsanis, T., & Economou, A. S. (2004). Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant growth regulation*, 44(3), 257-266.
- Molina, M., Pardo-De-Santayana, M., Aceituno, L., Morales, R., & Tardío, J. (2011). Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two Spanish forests. *Forestry*, cpr031.
- Morales, P., Ferreira, I. C., Carvalho, A. M., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M., Cámara, M., & Tardío, J. (2013). Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(2), 176-185.
- Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J. M., Carpena-Ruiz, R. O., & Esteban, E. (2008). Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere*, 71(3), 466-473.
- Mostafa, S. E., Karam, N. S., Shibli, R. A., & Alali, F. Q. (2010). Micropropagation and production of arbutin in oriental strawberry tree (*Arbutus andrachne* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(1), 111-121.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2011a). Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(5), 1401-1407.
- Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2009). Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1507-1511.
- Oliveira, I., Guedes de Pinho, P., Malheiro, R., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2011b). Volatile profile of *Arbutus unedo* L. fruits through ripening stage. *Food Chemistry*, 128(3), 667-673.
- Özcan, M. M., & Haciseferoğulları, H. (2007). The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 1022-1028.
- Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J. C., Del Castillo, M. D., Cano, M. P., & de Pascual-Teresa, S. (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 273-281.
- Pereira, M. J. (2006). Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(1), 65-68.
- Prada, M. A., & Arizpe, D. (Eds.). (2008). *Riparian Tree and Shrub Propagation Handbook: An Aid to Riverine Restoration in the Mediterranean Region*. Generalitat Valenciana.
- Prasad, K & Dhonukshe, P., 2013. Polar Auxin Transport: Cell Polarity to Patterning. In: R. Chen and F. Baluska (eds.), *Polar Auxin Transport, Signaling and Communication in Plants* 17, DOI 10.1007/978-3-642-35299-7_2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Quevedo, L., Arnan, X., & Rodrigo, A. (2013). Selective thinning of *Arbutus unedo* coppices following fire: Effects on growth at the individual and plot level. *Forest Ecology and Management*, 292, 56-63.
- Reinert, J. (1958). Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaften*, 45(14), 344-345.

- Rosa, A., Tuberoso, C. I. G., Atzeri, A., Melis, M. P., Bifulco, E., & Dessì, M. A. (2011). Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. *Food Chemistry*, 129(3), 1045-1053.
- Ruiz-Rodríguez, B. M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., & Tardío, J. (2011). Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, 44(5), 1244-1253.
- Sá, O., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2011). Optimization of DNA Extraction for RAPD and ISSR Analysis of *Arbutus unedo* L. Leaves. *International journal of molecular sciences*, 12(6), 4156-4164.
- Santo, D. E., Galego, L., Gonçalves, T., & Quintas, C. (2012). Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International*, 47(1), 45-50.
- Schuch, M. W., Damiani, C. R., Silva, L. C. D., & Erig, A. C. (2008). Micropropagation as a rejuvenation technique in rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar climax. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(3), 814-820.
- Silva J (2007) *Árvores e Florestas de Portugal Vol. V, Floresta e Sociedade*. Público pp 143-155 ISBN 978-989-619-102-3
- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 705-708.
- Taiz. L., Zeiger, E. (2010). *Plant physiology*, 5th ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- Takrouni, M. M., Ben El Haj Ali, I., Messaoued, C., & Boussaid, M. (2012). Genetic variability of Tunisian wild strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) populations interfered from isozyme markers. *Scientia Horticulturae*, 146, 92-98.
- Torres, J. A., Valle, F., Pinto, C., Garcia-Fuentes, A., Salazar, C., & Cano, E. (2002). *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology*, 160(2), 207-223.
- Trigiano, R. N., & Gray, D. J. (Eds.). (2011). *Plant tissue culture, development, and biotechnology*. CRC Press.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vasques, A., Chirino, E., Vilagrosa, A., Vallejo, V. R., & Keizer, J. J. (2013). The role of seed provenance in the early development of *Arbutus unedo* seedlings under contrasting watering conditions. *Environmental and Experimental Botany*, *96*, 11-19.
- Verdasca, M. J., Leitão, A. S., Santana, J., Porto, M., Dias, S., & Beja, P. (2012). Forest fuel management as a conservation tool for early successional species under agricultural abandonment: the case of Mediterranean butterflies. *Biological Conservation*, *146*(1), 14-23.
- Woodward, A. J., Bennett, I. J., & Pusswonge, S. (2006). The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on *in vitro* shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*. *Scientia horticultrae*, *110*(2), 208-213.
- Ziyyat, A., & Boussairi, E. H. (1998). Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy Research*, *12*(2), 110-113.
- Zizzo, G., Aprile, S., La Mantia, A. & Lazzara, S., (2010). Investigations on the Biodiversity of the Strawberry Tree (*Arbutus unedo*) in Sicily (Southern Italy) as Resource for the Floricultural Sector. VII International Symposium, New Floriculture Crops, Buenos Aires, Argentina. P1-15.