



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudos de cultura *in vitro* em medronheiro (*Arbutus unedo* L.) aplicados ao seu melhoramento

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 (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Augusto Manuel Ferreira Dinis (Universidade de Coimbra)

João Filipe da Silva Martins

2012

AGRADECIMENTOS

No final da realização deste trabalho, não posso deixar de agradecer às várias pessoas que por diversas razões tornaram possível a sua concretização.

Aos Professores Doutores Jorge Canhoto e Augusto Dinis, pela orientação

Ao Doutor Dias, pela ajuda na realização dos cortes histológicos e por todos os excelentes conselhos.

Ao Professor Doutor Xavier Coutinho, pela ajuda na técnica da acetólise.

À Doutora Sandra Correia pela paciência no esclarecimento das pequenas dúvidas relacionadas com estatística e biologia molecular.

À D. Eulália Rosa, pela simpatia e por toda a ajuda prestada ao longo do trabalho.

À Elisa Figueiredo, por me ter iniciado no fascinante mundo do PCR.

À Lara Currais, por todos os conselhos e ajuda com o material.

À Mónica Zuzarte, pela ajuda na obtenção de imagens em SEM.

Aos colegas de laboratório Carla e Renato, pelo companheirismo e simpatia.

À Ana, pela amizade.

À minha família, por todo o apoio, sem esquecer o Spike que sempre me recebeu calorosamente.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	ix
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TRABALHO	3
1.2. <i>ARBUTUS UNEDO</i> L.	4
1.2.1. Taxonomia.....	4
1.2.2. Descrição botânica	4
1.2.3. Distribuição	6
1.2.4. Ciclo Fenológico	7
1.2.5. Importância Ecológica, Económica e Etnobotânica.....	8
1.3. PROPAGAÇÃO DE PLANTAS	11
1.3.1. Germinação de sementes	12
1.3.2. Embriogénese zigótica e somática	13
1.3.3. Organogénese	17
1.3.4. Variação somaclonal	19
1.4. MELHORAMENTO DE PLANTAS.....	20
1.4.1. Embriogénese polínica	21
1.4.2. Poliploidização	24
1.5. OBJECTIVOS.....	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1. PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MEDRONHEIRO.....	29
2.1.1. Germinação de sementes	32
2.1.2. Indução de embriogénese somática.....	31
2.1.3. Organogénese	34
2.1.4. Multiplicação em meio líquido.....	33
2.1.5. Avaliação da variação somaclonal, através de marcadores moleculares (RAPDs), nas plantas propagadas	35
2.2. ENSAIOS DE MELHORAMENTO DE MEDRONHEIRO	36
2.2.1. Polinização artificial.....	36
2.2.2. Ensaio de embriogénese polínica.....	37
2.2.3. Ensaio de poliploidização	38
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40

2.4. ESTUDOS MORFOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS	40
2.4.1. Acetólise dos grãos de pólen	40
2.4.2. Técnica histológica.....	41
3. RESULTADOS	31
3.1. PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO MEDRONHEIRO	31
3.1.1. Germinação de sementes	31
3.1.2. Embriogênese somática.....	47
3.1.3. Organogênese	55
3.1.4. Crescimento em meio líquido	57
3.1.5. Avaliação da variação somaclonal, através de marcadores moleculares (RAPDs), nas plantas propagadas	58
3.2. ENSAIOS DE MELHORAMENTO DE MEDRONHEIRO	60
3.2.1. Polinização artificial.....	60
3.2.2. Ensaio de embriogênese polínica.....	63
3.2.3. Ensaio de poliploidização	66
4. DISCUSSÃO	69
4.1. PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO MEDRONHEIRO	71
4.1.1. Germinação de sementes	71
4.1.2. Embriogênese somática.....	72
4.1.3. Organogênese	73
4.1.4. Crescimento de plantas em meio líquido	75
4.1.5. Avaliação da variação somaclonal, através de marcadores moleculares (RAPDs), nas plantas propagadas	75
4.2. ENSAIOS DE MELHORAMENTO EM MEDRONHEIRO	76
4.2.1. Polinização artificial.....	76
4.2.2. Embriogênese polínica	77
4.2.3. Poliploidização	78
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

RESUMO

A espécie *Arbutus unedo* (Ericaceae) possui porte arbustivo ou arbóreo. O medronheiro é capaz de suportar temperaturas baixas (até -12°C) e é tolerante à seca. Encontra-se largamente distribuído ao longo da bacia do Mediterrâneo, desde Espanha até à Turquia, algumas zonas do Norte de África e ilhas Mediterrânicas, e ainda na costa Atlântica, incluindo Irlanda e Portugal. O medronheiro tem várias aplicações: estabilização de solos, programas de reflorestação, floricultura e na produção de compota, geleia, aguardente mel e biomassa. Apesar de ser tradicionalmente uma espécie NUC (www.underutilized-species.org), o medronheiro tem também sido a aposta de vários agricultores, sendo actualmente reconhecida como uma espécie com elevado potencial. O presente trabalho insere-se num projecto mais alargado de melhoramento do medronheiro e é mais uma contribuição para um melhor conhecimento dos processos de propagação desta espécie.

Foram estudadas diferentes técnicas de propagação: germinação de sementes, embriogénese somática, organogénese e multiplicação em meio líquido. Relativamente à germinação de sementes, a baixa percentagem de germinação pode ser contornada com pelo menos 14 dias de estratificação a 4°C, obtendo-se assim percentagens de germinação próximas de 100%. Apesar de não assegurar a manutenção do genótipo, é uma técnica simples de aplicar. Em relação à embriogénese somática, vários genótipos foram avaliados, não se tendo verificado diferenças na percentagem de indução. Os embriões somáticos passavam pelos estados de desenvolvimento típicos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, embora com algumas variações relativamente a este padrão geral. Uma percentagem considerável dos embriões formados apresentava algum tipo de anomalia, o que pode comprometer o uso desta técnica para fins de propagação. Nos estudos relacionados com a organogénese, verificou-se que a multiplicação do medronheiro por esta técnica apresenta grande potencial, devido ao considerável número de plantas obtidas. No entanto, esta técnica deve ser alvo de estudos mais pormenorizados, de forma a perceber os mecanismos envolvidos e assim explorar todo o seu potencial. O crescimento em meio líquido de plantas de medronheiro revelou-se bastante eficaz na sua multiplicação, no entanto, o enraizamento das plantas obtidas foi muito reduzido. Assim, para que a técnica possa ser aplicada, esta limitação deve ser contornada. A estabilidade genética das plantas propagadas foi testada através de

marcadores moleculares. Não se verificaram diferenças entre perfis, pelo que provavelmente não existem diferenças entre as plantas-mãe e as plantas *in vitro* testadas. No entanto, uma análise mais pormenorizada deve ser realizada.

Nos ensaios de melhoramento, foram abordadas três técnicas distintas: polinização artificial, embriogénese polínica e poliploidização. No que diz respeito à polinização artificial, a germinação do pólen no estigma foi observada. Os tubos polínicos percorreram todo o comprimento do estilete em 20-24 h. Este resultado foi obtido nos ensaios realizados *in vitro* e *in vivo*, o que abre boas perspectivas para possíveis cruzamentos entre diferentes genótipos. Relativamente à embriogénese polínica, quando as anteras foram colocadas em cultura não se obtiveram embriões, mas sim calo que não revelou capacidade embriogénica. Foi também estabelecida uma relação entre a morfologia dos botões florais e o estado de desenvolvimento dos micrósporos, o que pode ser útil em futuras tentativas de obtenção de haplóides. Nos ensaios de poliploidização usou-se colquicina e orizalina. Os tratamentos com orizalina e em meio líquido foram mais agressivos para as plantas. Apesar de a ploidia das plantas obtidas não ter sido testada, verificou-se um crescimento reduzido, o que pode indicar diferenças na sua ploidia.

Apesar de preliminares, os resultados obtidos abrem boas perspectivas no que diz respeito a diferentes técnicas de propagação do medronheiro. No entanto, para que possam ser utilizadas de forma efectiva na propagação em massa, alguns estudos mais detalhados terão de ser levados a cabo, no sentido de otimizar algumas das técnicas. No melhoramento do medronheiro, este trabalho representa um pequeno avanço. Os resultados da polinização artificial são especialmente interessantes, e permitirão a realização de um programa de cruzamentos de genótipos, no sentido de obter variedades com características vantajosas.

Palavras-chave: embriogénese somática; germinação de sementes; organogénese; polinização artificial; poliploidização; RAPDs.

ABSTRACT

Arbutus unedo (Ericaceae) is a small shrub or tree that can stand low temperatures (until -12°C) and is tolerant to water stress. This species is spread around the Mediterranean basin, from Spain to Turkey, some areas in the North Africa and Mediterranean islands, and also in the Atlantic coast, including Ireland and Portugal. The strawberry tree has innumerable applications such as soil stabilization, reforestation programs, floriculture, and production of jams, spirits, honey and biomass. Although being traditionally considered a NUC species (www.underutilized-species.org), the great interest recently shown by farmers and other stakeholders has increased the potential of this tree. The present work is part of a more broad project which the main goal is the improvement of strawberry tree.

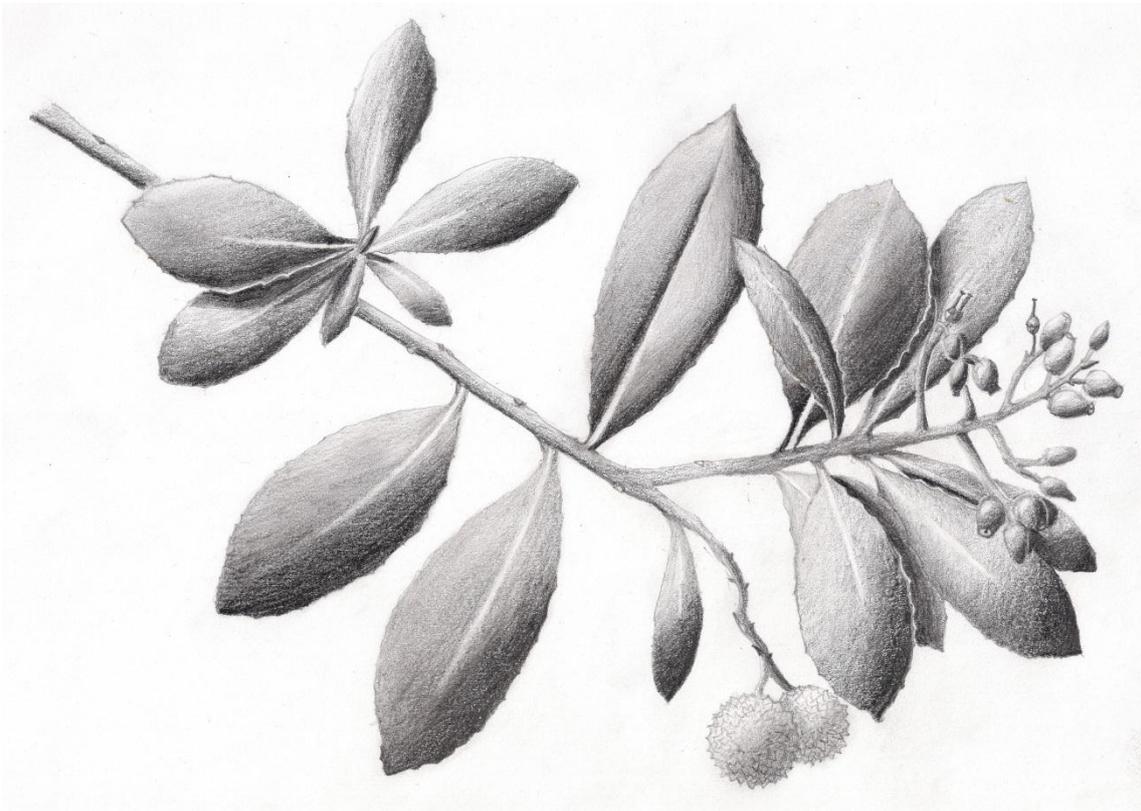
Different propagation techniques were studied: seed germination, somatic embryogenesis, organogenesis and multiplication in liquid medium. The results concerning seed germination showed that the rates were low. However, stratification at 4°C (for at least 14 days) increased germination to values close to 100%. Although this technique does not assure propagation of selected trees it is easy to apply and can be used to increase variability and to better germinate hybrid seeds between genotypes. Somatic embryogenesis induction was tested in different genotypes, and no significant differences were observed. In spite of some variations, somatic embryo morphology was similar to the general pattern, going through globular, hearth, torpedo and cotyledon stages. A considerable rate of abnormal somatic embryos was observed which can compromise the use of this technique for propagation purposes. The propagation of the strawberry tree through organogenesis has a great potential since a large number of plants can be obtained. However, more work must be carried out before it can be used for propagation purposes. The results also showed that strawberry tree plants can be propagated in liquid medium opening the way for the use of bioreactors. However, these plants were difficult to root. Therefore, this limitation must be overcome, in order to apply this technique for propagation purposes. The genetic stability of propagated plants was tested, and no differences were found between the mother plants and the *in vitro* propagated plants. Nevertheless, a more detailed analysis must be carried out with more primers and more plants.

Regarding plant breeding, three different techniques were used: artificial pollination, pollen embryogenesis and polyploidization. Concerning the artificial pollination, pollen germination in stigma was observed and the growth of the pollen tubes through the style occurs in 20-24 h. This result was obtained not only *in vitro* but also in *in vivo* pollinations, which offers good perspectives to control artificial hybridization. With regard to pollen embryogenesis, callus were obtained but without embryogenic or organogenic potential. A relation between flower buds and microspore development stage was established which may be useful in further attempts to obtain haploids through microspore culture. In polyploidization assays, colchicine and oryzalin were used. The treatments with oryzalin and liquid medium were showed to be more aggressive to the plants. Although the ploidy level was not assessed, a low growth rate was observed, which can indicate different ploidy levels among the plants.

These preliminary results opened new ways of research for the breeding of *Arbutus unedo* and are one more contribution to the study of this species. However, in order to use these techniques for mass propagation, more studies must be carried out. The pollination results are especially interesting, for future crossbreeding assays and for the obtention of plants with new characteristics.

Key-words: artificial pollination; organogenesis; polyploidization; RAPDs; seed germination; somatic embryogenesis.

1. INTRODUÇÃO



1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TRABALHO

Nos últimos anos a floresta portuguesa tem-se debatido com uma série de factores desfavoráveis que ameaçam a sua integridade e o impacto que tem na nossa economia. O caso mais conhecido é o do nemátode-do-pinheiro e o impacto extremamente negativo que tem no pinheiro-bravo, com várias zonas do país extremamente afectadas e sem que se vislumbre uma solução para o problema (Webster & Mota, 2008). Também o eucalipto, uma espécie que, devido ao seu carácter exótico, passou durante muito tempo ao lado de problemas fitossanitários graves, sofre actualmente algumas ameaças como acontece com o gorgulho-do-eucalipto. A sul, os montados de sobreiro mostram também alguns problemas, o mais negativo sendo talvez a pouca renovação dos materiais vegetais.

Tendo em conta esta situação, alguns agricultores têm procurado noutras espécies, alternativas de produção. De entre estas destaca-se o pinheiro-manso, uma espécie que tem sido bastante cultivada na zona sul do país. O medronheiro, tradicionalmente uma espécie NUC (www.underutilized-species.org) (Underutilized-species, 2008), tem também sido a aposta de vários agricultores, sendo actualmente reconhecida como uma espécie com elevado potencial.

Desde há cerca de 5 anos, o Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, em estreita colaboração com a Escola Superior Agrária de Coimbra, têm desenvolvido um intenso trabalho de investigação sobre esta espécie, ao mesmo tempo que têm procurado aumentar o interesse dos produtores por esta pequena árvore. O resultado, em termos de investigação, foi a selecção e desenvolvimento de métodos de clonagem *in vitro*, enquanto em termos de divulgação, muitos agricultores têm procurado obter plantas seleccionadas para cultura. Apesar do trabalho realizado, muito há ainda a fazer, visto a investigação nesta espécie ser ainda muito limitada.

O presente trabalho insere-se nesse projecto mais alargado de melhoramento do medronheiro e é mais uma contribuição para um melhor conhecimento dos processos de propagação desta espécie.

1.2. *ARBUTUS UNEDO* L.

1.2.1. Taxonomia

O género *Arbutus* pertence à classe Magnoliopsida, ordem Ericales, família Ericaceae, a qual abarca cerca de 2% da diversidade das eudicotiledóneas (Stevens, 2001; Hammami *et al.*, 2005). Inclui cerca de vinte espécies, distribuídas pela costa Oeste da América do Norte, América Central, Europa Ocidental, bacia Mediterrânica, Norte de África e Médio Oriente (Heywood, 1993). Algumas destas espécies apresentam características tipicamente mediterrânicas, tais como *Arbutus canariensis* Lindl., endémico da Macaronésica, e *Arbutus menziesii* Pursh, espontâneo na costa Oeste da América do Norte (Piotto *et al.*, 2001). Pela morfologia particular da flor e do fruto, este género faz parte da sub-família Arbutoideae, juntamente com outros cinco géneros. Em termos filogenéticos, a sub-família Arbutoideae está relacionada com as sub-famílias Vaccinioideae e Ericoideae, das quais fazem parte os géneros *Vaccinium* e *Rhododendron*, respectivamente, ambos de grande importância económica e alvo de intensos programas de melhoramento (Gomes, 2011).

A espécie *A. unedo*, de nome vulgar medronheiro, coexiste em alguns locais com uma espécie muito semelhante, *A. Andrachne* L., com a qual por vezes hibridiza (*A. x andrachnoides* Lint.). *A. x androsterilis* Salas, Acebes & Arco é outro híbrido reconhecido, o qual é obtido artificialmente através do cruzamento de *A. unedo* e *A. canariensis* (Torres *et al.*, 2002; Prada & Arizpe, 2008).

1.2.2. Descrição botânica

O medronheiro possui porte arbustivo ou arbóreo, crescendo normalmente até aos três metros de altura (Figura 1 A). As folhas, perenes e pecioladas, são oblonga-lanceoladas geralmente serradas, de cor verde intenso. Apresentam morfologia lauróide, herdada dos antepassados que colonizaram a Europa num ambiente subtropical, durante o Terciário (Silva, 2007). As flores são hermafroditas, em forma de campânula, esbranquiçadas a levemente rosadas, e encontram-se dispostas em panículas pendentes (até 30 flores), sendo a corola constituída por cinco simpétalas (Figura 3 B). A polinização é realizada por insectos (entomófila), do género *Bombus* (Prada & Arizpe, 2008) (Figura 1 B). O fruto é o medronho, uma baga esférica, com cerca de 20 mm de

diâmetro, coberta de papilas cónicas (Figura 3 C e D). Contém geralmente 10 a 50 sementes de pequenas dimensões, que são dispersas por endozoocoria (Piotto *et al.*, 2001; Gomes, 2011).

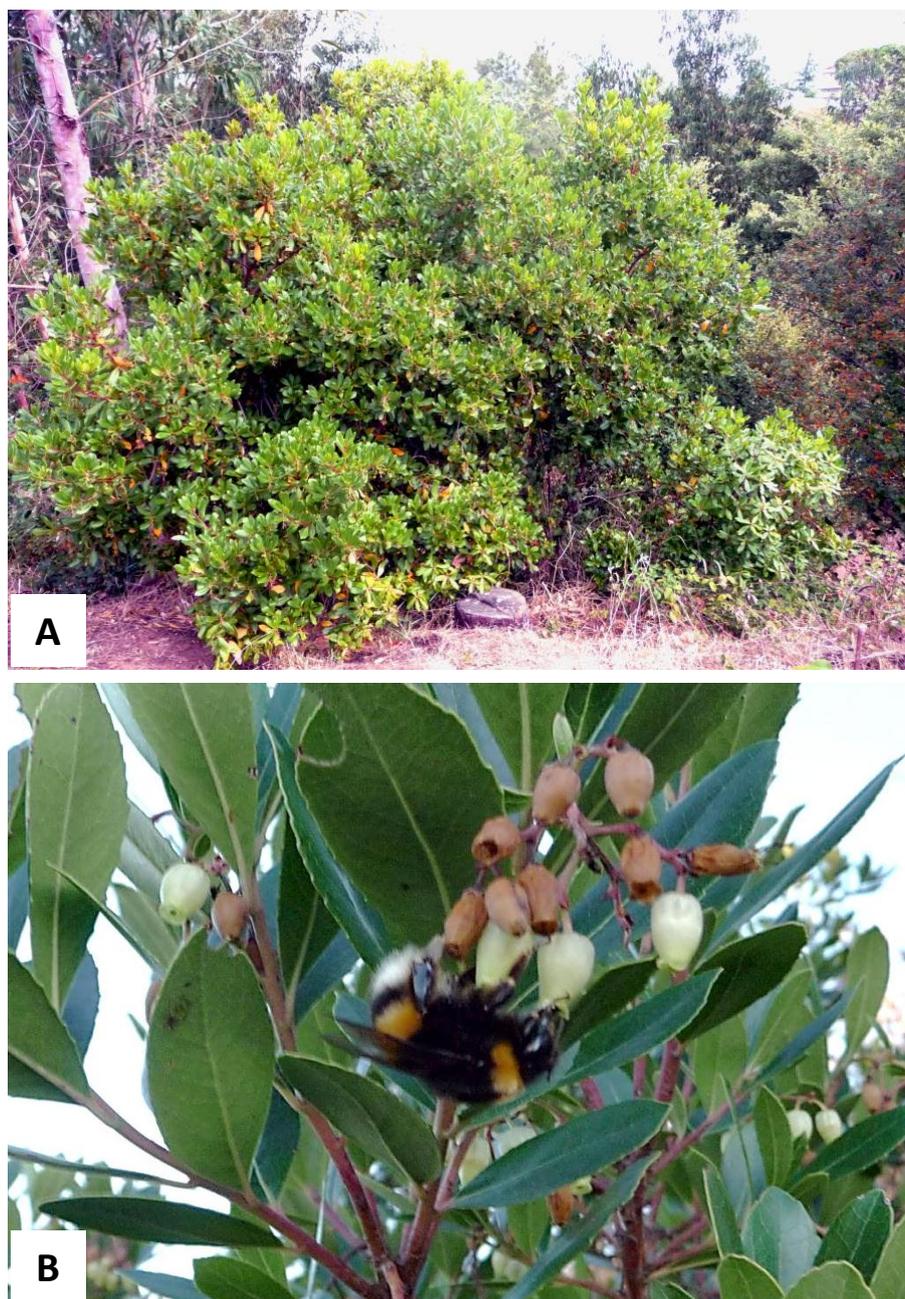


Figura 1. *Arbutus unedo*. (A) Planta. (B) Insecto do género *Bombus* no decurso da polinização.

1.2.3. Distribuição

O medronheiro foi das poucas espécies que suportou os períodos de frio do Quaternário, tendo-se adaptado ao clima mediterrânico e colonizado diversos ambientes (Silva, 2007). A estratégia de adaptação da espécie ao clima Mediterrâneo é evidente especialmente ao nível da folha. No entanto, apesar desta adaptação, a actividade fotossintética da planta e a eficiência do uso da água reduzem-se drasticamente durante o período de seca (Tenhunen *et al.*, 1982; Gratani & Ghia, 2002).

O medronheiro cresce geralmente em solos ácidos (Mereti *et al.*, 2002; Ertekin & Kirdar, 2010), rochosos e bem drenados. É capaz de suportar temperaturas baixas (até -12°C) (Mereti *et al.*, 2002) e é tolerante à seca (Gomes *et al.*, 2010), encontrando-se largamente distribuído ao longo da bacia do Mediterrâneo, desde Espanha até à Turquia, algumas zonas do Norte de África e ilhas Mediterrânicas, e ainda na costa Atlântica, incluindo Irlanda e Portugal (Figura 2). Cresce associado a comunidades arbustivas ou em florestas de *Quercus* e *Pinus* (Prada & Arizpe, 2008). Em Portugal, 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 e às baixas temperaturas (Silva, 2007; Gomes, 2011).



Figura 2. Distribuição de *Arbutus unedo* na bacia mediterrânica e costa Atlântica. (Fonte: http://fieldart.blogspot.pt/2010_12_01_archive.html).

1.2.4. Ciclo Fenológico

O ciclo fenológico do medronheiro é muito lento, prolongando-se por quase dois anos. Durante este período podem observar-se três estádios bem distintos: botões florais, flores em antese e frutificação (Figura 4; Rosalba, 1982). Os primeiros botões florais começam a formar-se em Junho e permanecem num estado de aparente quiescência até Outubro, período em que se inicia a antese, que decorre até Janeiro. Após a fecundação segue-se um período de vários meses, de Novembro a Maio, em que o processo de desenvolvimento está praticamente suspenso. A partir dessa altura, o processo de frutificação é retomado, prolongando-se por mais seis meses (Figura 4). A cor do fruto varia ao longo do processo de maturação, passando por verde, amarelo, alaranjado e vermelho quando maduro (Figura 3 D). No Outono é possível encontrar em simultâneo flores e frutos, dando à árvore um aspecto colorido (tricolor) bastante atractivo e que faz do medronheiro uma espécie ornamental por excelência.

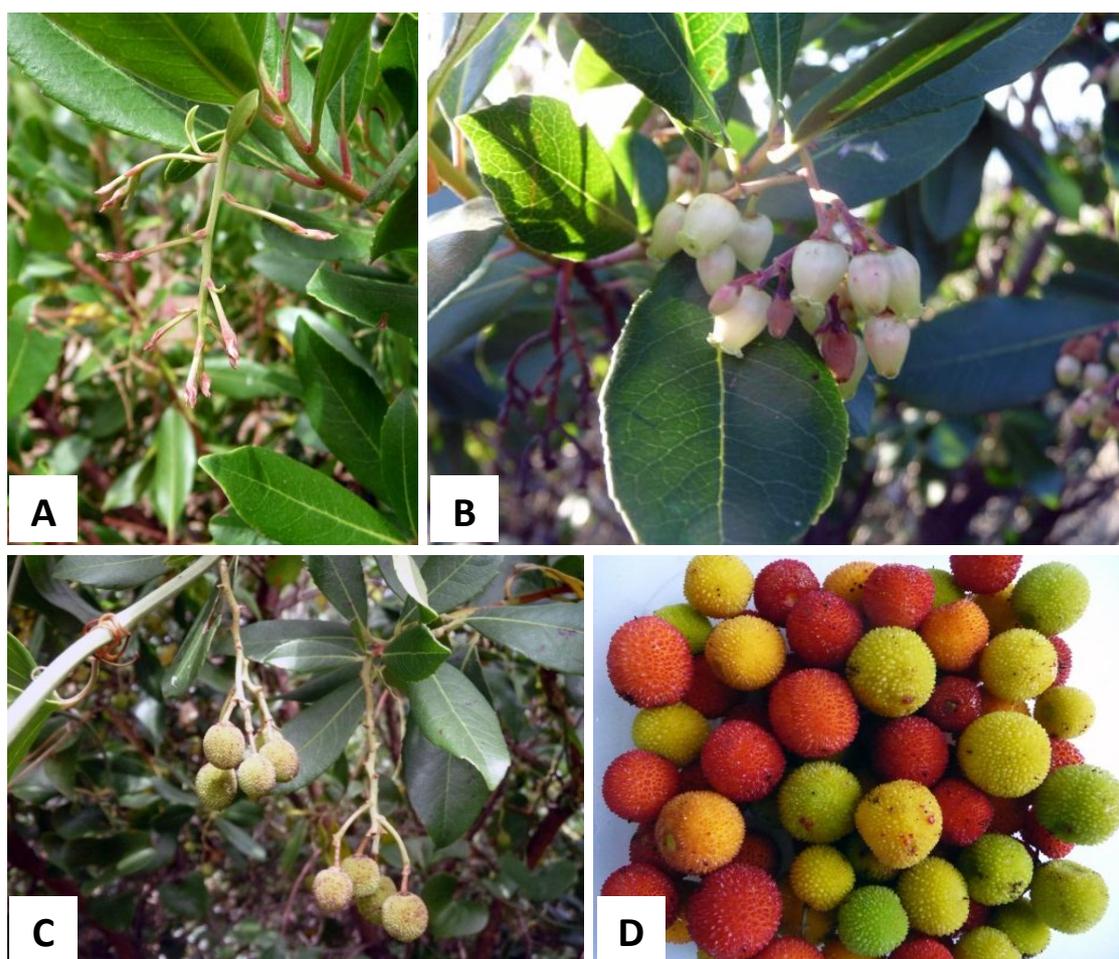


Figura 3. Aspectos do ciclo fenológico do medronheiro. (A) Botões florais (Julho). (B) Panículas pendentes, em antese (Janeiro). (C) Infrutescências em desenvolvimento (Julho). (D) Frutos em diferentes estados de maturação (Novembro).

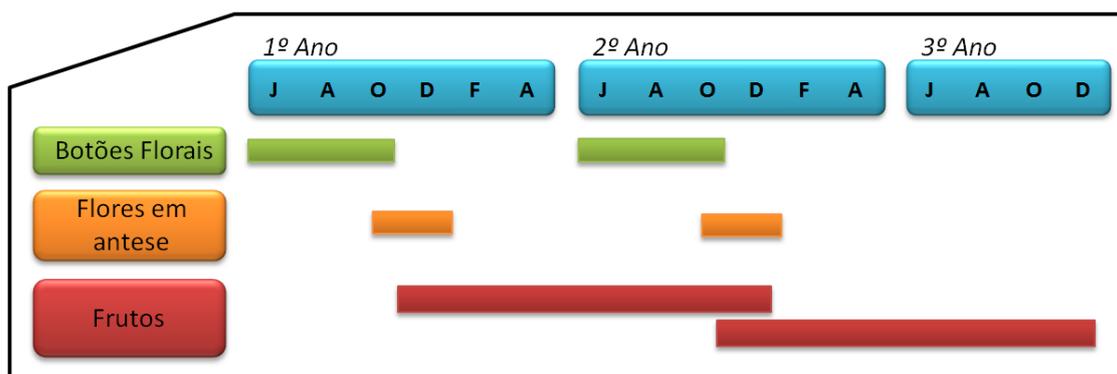


Figura 4. Ciclo fenológico do medronheiro, considerando duas florações e frutificações (cerca de dois anos e meio). É caracterizado por dois períodos de aparente quiescência correspondentes ao estado de botões florais e à maturação do fruto, que decorre de forma lenta ao longo de cerca de um ano (adaptado de Rosalba, 1982).

1.2.5. Importância Ecológica, Económica e Etnobotânica

As características do medronheiro fazem dele uma espécie bastante importante sob o ponto de vista ecológico, fundamentalmente na estabilização de solos, tornando-os menos susceptíveis à erosão, na sua grande capacidade de regeneração após fogos e na contribuição para a manutenção da biodiversidade, servindo de alimento a diversos animais (Piotto *et al.*, 2001). No contexto global em que a quantidade de solo disponível para a agricultura tem vindo a diminuir, a possibilidade desta espécie colonizar solos marginais é também uma característica interessante. A capacidade de regeneração após fogos (Figura 5) torna a espécie interessante para programas de reflorestação, especialmente em países do Sul da Europa como Portugal, Espanha, Itália e Grécia, onde os fogos florestais são comuns.

Segundo um estudo de Moreno-Jiménez *et al.* (2008), relacionado com a contaminação de solos por arsénio e o seu restauro, apesar de o medronheiro não ter sido capaz de extrair uma quantidade suficiente do metal de forma a ser considerada uma planta fitoextractora, mostrou um grande potencial como fitoestabilizador, prevenindo a erosão e a lixiviação do contaminante. Um trabalho de Godinho *et al.* (2010) revelou que o medronheiro é uma espécie tolerante a quantidades elevadas de vários metais no solo, apresentando concentrações baixas na parte aérea e, portanto, com potencial para ser usado em programas de fitoestabilização de escombrelas.



Figura 5: Regeneração de um espécime de medronheiro após um fogo florestal (Chaves, 2011).

Castaldi *et al.* (2009) demonstraram a importância de determinados metabolitos secundários, produzidos pelo medronheiro, na regulação do ciclo do azoto. Os dados obtidos neste estudo sugerem que os compostos fenólicos produzidos poderão inibir o processo de nitrificação, bloqueando assim as emissões de N_2O , gás relacionado com o efeito de estufa.

Os medronhos são comestíveis e apresentam um teor em lípidos e proteínas baixo, mas altos teores de carboidratos, com uma alta percentagem de frutose, responsável pelo sabor açucarado (Barros *et al.*, 2010). As quantidades de vitamina C são também bastante significativas e o β -caroteno está igualmente presente na sua composição, ainda que em quantidades reduzidas. Os frutos são também uma fonte de antioxidantes, possuindo compostos fenólicos (taninos, substâncias derivadas do ácido gálico, antocianinas e outros flavonóides), vitaminas C e E e ainda carotenóides (Barros *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2011). Devido ao facto de possuírem algum etanol, os medronhos são normalmente consumidos em pequenas quantidades (unedo significa

“come apenas um”) e, por isso, raramente se encontram em supermercados. No entanto, são habitualmente utilizados na confecção de produtos tradicionais como compota, geleia e aguardente (medronheira). Cada árvore produz em média 7 a 10 kg de frutos, sendo normalmente necessários 10 kg para produzir 1L de bebida (Gomes & Canhoto, 2009).

Os méis feitos a partir do néctar desta espécie são um produto típico da região Mediterrânica (Tuberoso *et al.*, 2010), em particular da ilha italiana da Sardenha (Cherchi *et al.*, 1995), que é provavelmente a maior produtora mundial deste mel. Pelo seu sabor característico, é conhecido como mel amargo, apresentando um odor intenso e cor âmbar, em estado líquido, ou acastanhada, quando cristalizado. É por vezes utilizado como remédio natural e, uma vez que a produção por colmeia é baixa, devido ao facto de na época de floração a actividade das abelhas ser reduzida, o seu preço pode atingir 4 a 8 vezes mais que o do mel doce (Tuberoso *et al.*, 2010).

Em várias regiões de Portugal (Trás-os-Montes, Alentejo e Algarve), os frutos crus ou em licores, e também a casca e as raízes, são usadas como anti-inflamatório, laxativo, digestivo e cardiotónico (Barros *et al.*, 2010). A literatura refere o uso das folhas do medronheiro na diabetes, como diurético, depurativo e antihipertensivo (Ziyyat *et al.*, 1997) e o extracto aquoso da planta apresenta actividade antihipertensiva e vasorelaxante (Ziyyat & Boussairi, 1998; Ziyyat *et al.*, 2002).

Devido à grande quantidade de taninos presentes na casca, esta é também utilizada no curtume de peles (Gomes *et al.*, 2010). Recentemente, o medronheiro tem sido igualmente utilizado como fonte de biomassa para produção de energia e ainda na floricultura (Metaxas *et al.*, 2004).

Em termos culturais o medronheiro é também uma planta importante. Está presente em diversas obras, como o painel central do quadro “O Jardim das Delícias Terrenas”, da autoria do holandês Hieronymus Bosch, actualmente no Museu do Prado. Um medronheiro juntamente com um urso é o símbolo da cidade de Madrid.

Apesar das várias aplicações desta espécie, os frutos são habitualmente colhidos pelas populações locais em plantas a crescer de forma espontânea na natureza, havendo muito poucos cultivares estabelecidos. O medronheiro é inclusive considerado como “Neglected or Underutilized Crop” pela Global Facilitation Unit for Underutilized

Species, que considera o potencial da espécie em determinadas áreas (por exemplo farmacêutica e cosmética) como muito relevante (www.underutilized-species.org).

Recentemente, vários proprietários e associações florestais têm demonstrado grande interesse na espécie, quer para a produção de frutos quer como ornamental. A selecção de plantas com características interessantes, baseada na produção de frutos e outras características importantes, apresenta-se por isso como muito relevante em termos económicos. Segundo Gomes & Canhoto (2009), a implementação em Portugal de um programa de melhoramento do medronheiro é de grande importância.

1.3. PROPAGAÇÃO DE PLANTAS

A existência de métodos eficazes de propagação é essencial quando se pretende melhorar uma espécie. A propagação pode ser feita através de métodos convencionais, como a estacaria, o que em alguns casos pode ser difícil devido a baixas taxas de enraizamento (Gomes & Canhoto, 2009). A utilização de sementes é outra possibilidade ainda que, apesar de promover a diversidade genética, possam igualmente ser encontradas algumas limitações, como por exemplo a dificuldade de germinação das sementes. No sentido de contornar estas limitações, as técnicas de micropropagação *in vitro* surgem como uma alternativa eficaz em relação aos métodos convencionais, sendo especialmente úteis quando o objectivo é a manutenção de um determinado genótipo de interesse nas plantas propagadas (Canhoto, 2010; Gomes, 2011).

Apesar de algumas desvantagens, como a necessidade de instalações adequadas e mão-de-obra qualificada, possibilidade de ocorrência de variação somaclonal e vitrificação (Chawla, 2010), as técnicas de cultura *in vitro* apresentam várias vantagens: pequena quantidade de material necessário, pouco espaço requerido, produção uniforme ao longo do ano (inexistência de sazonalidade), possibilidade de armazenar o material por longos períodos de tempo e o facto de todo o processo ser realizado em condições assépticas e controladas (Chawla, 2010; Gomes, 2011).

As técnicas de micropropagação mais usadas na propagação de plantas lenhosas são a embriogénese somática, a organogénese e a proliferação de rebentos (Gomes & Canhoto, 2009), podendo estes últimos ser resultantes da cultura de ápices ou de segmentos nodais. De entre estas técnicas, a proliferação de rebentos caulinares a partir de gemas axilares é a mais usada na propagação de ericáceas. Várias espécies desta

família foram já propagadas através deste método, incluindo o medronheiro, quer a partir de material jovem (Mereti *et al.* 2002) quer de material adulto (Gomes & Canhoto 2009).

1.3.1. Germinação de sementes

Em muitos casos, as sementes são viáveis, mas não germinam mesmo em condições ambientais favoráveis (Smiris *et al.*, 2006; Demirsoy *et al.*, 2010). A inibição de germinação pode ser devida à impermeabilidade da testa, à dormência do embrião ou a ambos (Smiris *et al.*, 2006). As espécies de *Arbutus* têm dormência da semente (Tilki, 2004; Demirsoy *et al.*, 2010), o que torna difícil a propagação do medronheiro através deste método (Ertekin & Kirdar, 2010). A dormência fisiológica é a dormência primária presente neste género (Tilki, 2004). Este tipo de dormência é causado pela desregulação no balanço entre as substâncias que causam a inibição e o crescimento do embrião. É sabido que o ABA (ácido abscísico) desempenha um papel importante na inibição da germinação enquanto as giberelinas aparentam ser as substâncias que desempenham o papel mais significativo no processo germinativo (Smiris *et al.*, 2006).

Existem diferentes métodos para ultrapassar a dormência em Angiospérmicas e Gimnospérmicas, como a estratificação, escarificação e aplicação de giberelinas (Tilki, 2004; Demirsoy *et al.*, 2010; Ertekin & Kirdar, 2010). Ceccherini *et al.* (1998) referem que é prática comum as sementes de várias espécies serem colocadas a 1-10°C para ultrapassar a dormência. Huxley *et al.* (1992) referem que as sementes de *Arbutus* necessitam de uma estratificação de 4 a 6 semanas. De facto, a estratificação a temperaturas adequadas é um dos métodos mais importantes de quebrar este tipo de dormência (Smiris *et al.*, 2006). Tratamentos prolongados, especialmente a baixas temperaturas, resultam em taxas de germinação mais elevadas, muito embora um tratamento demasiado prolongado possa aumentar a probabilidade de as sementes sofrerem ataques por fungos (Ertekin & Kirdar, 2010). Porém, a necessidade de estratificação pode ser parcialmente substituída pelo uso de giberelinas exógenas. Alguns estudos mostram que a combinação de GA₃ (ácido giberélico) com a estratificação apresenta os melhores resultados (Smiris *et al.*, 2006), tendo já sido obtidos resultados positivos em algumas espécies de *Arbutus* (Tilki, 2004; Demirsoy *et al.*, 2010).

O estudo da dormência e germinação de sementes de medronheiro apresenta um grande interesse prático e comercial, uma vez que se apresenta como uma técnica de proliferação simples (Smiris *et al.*, 2006).

1.3.2. Embriogénese zigótica e somática

A embriogénese zigótica é o processo natural de formação do embrião, o qual resulta de um processo de reprodução sexuada, ou seja, da fusão de dois gâmetas, um deles masculino, formado no grão de pólen, e outro feminino, a oosfera, que se desenvolve no saco embrionário formado no interior do óvulo. A fusão dos dois gâmetas origina o zigoto e, desde a primeira divisão deste até à formação do embrião maduro, são definidas várias fases morfológicas (Figura 6):

- i) Pró-embrião: estrutura existente desde a primeira divisão do zigoto até à formação da protoderme. A primeira divisão do zigoto (assimétrica) origina duas células, a célula apical, que forma o embrião, e a célula basal, que origina o suspensor. Esta última estrutura é muito importante para o desenvolvimento do embrião, uma vez que estabelece uma ligação com os tecidos maternos estando envolvida também na produção e transporte de hormonas.
- ii) Fase globular: embrião com simetria radial, formado por uma massa esférica e compacta de células com intensa actividade mitótica.
- iii) Fase cordiforme: embrião com simetria bilateral, em que ocorre uma acumulação de auxinas nas zonas em que se diferenciam os cotilédones e em que os meristemas apicais do caule e da raiz se começam a organizar.
- iv) Fase torpedo: embrião com uma forma mais alongada onde a diferenciação dos cotilédones se acentua. Nesta fase, os meristemas apicais estão já completamente formados, o suspensor degenerou e as células acumulam substâncias de reserva.
- v) Fase cotiledonar: embrião com todas as suas células preenchidas com grandes quantidades de substâncias de reserva e em que os cotilédones estão já completamente desenvolvidos. Nesta fase, o desenvolvimento embrionário chega ao fim com a perda de grandes quantidades de água e, em algumas espécies, o embrião entra num estado de dormência.

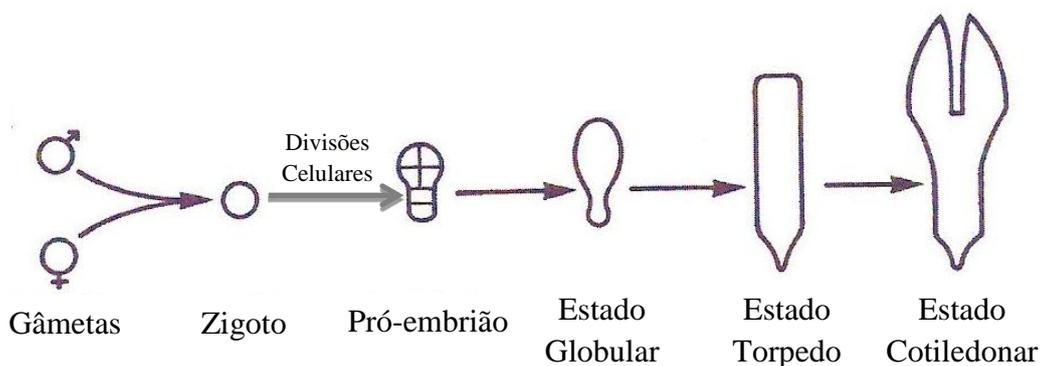


Figura 6: Fases morfológicas no desenvolvimento embrionário. Da fusão dos gâmetas masculino e feminino resulta o zigoto, a partir do qual se forma o embrião, que passa por várias fases (pró-embrião, globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) até à sua maturação (Slater, 2008).

Do desenvolvimento do ovário após a fecundação resulta o fruto, enquanto que do óvulo resulta a semente, que consiste geralmente de um embrião, endosperma (tecido de reserva) e tegumento. Algumas sementes não possuem endosperma, ou este está presente em quantidades muito reduzidas, pelo que são designadas de não-endospérmicas. Outras possuem grande quantidade de substâncias de reserva, sendo designadas sementes endospérmicas. Estas substâncias variam segundo as espécies mas são geralmente hidratos de carbono, lípidos e proteínas. Em alguns casos, quantidades consideráveis de alcalóides e compostos fenólicos são também acumuladas nas sementes (Canhoto, 2010).

No medronheiro, o ovário é penta-loculado, contendo cada lóculo diversos óvulos (Takrouni & Boussaid, 2010). Segundo Rosalba (1982), os óvulos encontram-se dentro dos botões florais formados em Junho, mas não estão ainda organizados. Só em Setembro se organiza o nucelo e os óvulos assumem a sua posição definitiva – anátropos. A macrogametogénese origina o gametófito 8-nucleado e após a fecundação forma-se o zigoto, que permanece num estado de aparente quiescência durante cerca de seis meses. Depois deste período iniciam-se as primeiras divisões, sendo o desenvolvimento do embrião bastante lento, pelo que são necessários vários meses até à sua completa formação (Figura 7).

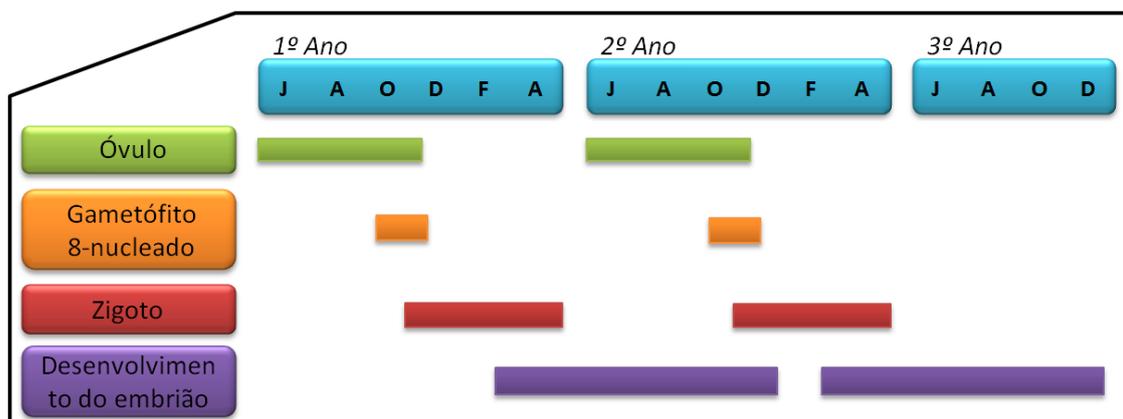


Figura 7: Ciclo reprodutivo bienal do medronheiro, caracterizado por dois períodos de aparente quiescência correspondentes ao estado de óvulo e zigoto. O desenvolvimento do embrião ocorre de forma lenta ao longo de cerca de seis meses (adaptado de Rosalba, 1982).

As plantas possuem outras células, para além do zigoto, com potencial para formar embriões. Estes embriões, por serem originados a partir de células do soma, são designados somáticos e são, de uma forma geral, semelhantes aos embriões zigóticos, sendo equivalentes em termos de funcionalidade (Gray, 2005). No entanto, apesar das semelhanças existem também algumas diferenças, nomeadamente nas fases iniciais de desenvolvimento, que ocorrem de forma ordenada no caso da embriogénese zigótica e de forma variável na formação de embriões somáticos. As fases seguintes são, no entanto, idênticas, passando os embriões também pelos estados globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Canhoto, 2010).

Na embriogénese zigótica as substâncias nutritivas chegam ao embrião, não só através do suspensor, mas também do corpo do embrião. Já no caso dos embriões somáticos, o suspensor é normalmente a única ligação entre o embrião e as substâncias nutritivas. Outra diferença entre os dois tipos de embriões é o facto de os zigóticos se encontrarem confinados a um espaço limitado, ao contrário dos somáticos que, por esta razão, tendem a ser de maiores dimensões (Gray, 2005). Outra diferença importante prende-se com o facto de os embriões zigóticos terem origem unicelular enquanto a origem dos embriões somáticos é variável, podendo ser unicelular ou multicelular (Chawla, 2010).

A embriogénese somática pode ocorrer por duas vias: directa ou indirecta. No caso da embriogénese directa a formação de embriões ocorre directamente do explante sem a formação de um calo. No caso da embriogénese indirecta, que é mais frequente,

os embriões desenvolvem-se a partir de um calo previamente formado (calo embriogénico) (revisto por Chawla, 2010).

Na indução da embriogénese somática diferentes tecidos podem ser usados como explantes, embora normalmente se usem tecidos meristemáticos de embriões zigóticos imaturos ou maduros, cotilédones e hipocótilos. Podem também ser usadas raízes, caules e ápices caulinares, folhas jovens, sépalas, pétalas e anteras (Gray, 2005; Canhoto, 2010). No caso de se usarem anteras, ocorre um tipo de embriogénese somática específica que será tratada em maior detalhe no capítulo 1.4.2.

A embriogénese somática é normalmente afectada por diversas variáveis, tais como o genótipo e o estado fisiológico da planta dadora, a composição do meio e condições de cultura e o tipo de explante (Gray, 2005; Canhoto, 2010; Chawla, 2010). Assim, em algumas espécies qualquer tecido pode ser usado como explante enquanto noutras apenas determinados órgãos respondem em cultura (Chawla, 2010). O genótipo também pode ser importante, havendo alguns estudos que demonstram que alguns genótipos têm maior capacidade de sofrer embriogénese que outros (Canhoto, 2010). As condições de luz e temperatura são também relevantes (Chawla, 2010) sendo as condições óptimas de cultura variáveis de espécie para espécie. Em alguns casos é necessária luz contínua, enquanto noutros a obscuridade permite uma melhor resposta do material vegetal. No que respeita à temperatura, os explantes são normalmente mantidos entre 24-27°C (Canhoto, 2010).

Apesar de as variáveis referidas anteriormente serem bastante importantes, a composição dos meios de cultura é talvez a mais importante, nomeadamente no que toca à composição em hormonas e em hidratos de carbono (Canhoto, 2010). No caso das hormonas, as auxinas (por vezes em combinação com citocininas) são especialmente importantes e, de todas elas, o 2,4-D é a mais utilizada (Canhoto, 2010; Chawla, 2010). A adição de carvão activado pode também ser importante no desenvolvimento de embriões somáticos (Chawla, 2010).

Também importante é a sequência de meios utilizados e, em especial, os reguladores de crescimento usados. Para algumas espécies é usado um meio para a formação e manutenção de calo (normalmente com auxina), um segundo meio para a maturação dos embriões e ainda um outro que permita o crescimento destes em plântulas (Chawla, 2010).

Para além da embriogénese somática constituir uma ferramenta importante para o estudo do desenvolvimento das plantas, permitindo uma comparação com a embriogénese zigótica, os embriões obtidos podem ser usados na produção de sementes artificiais. Além disso, pode ser também usada na propagação clonal (Gray, 2005). No entanto, apresenta também alguns problemas que podem comprometer o seu uso, especialmente quando o objectivo é propagar plantas. Entre eles salientam-se a ausência de sincronização no desenvolvimento dos embriões, expressão do potencial embriogénico apenas durante um determinado período de tempo, grande probabilidade de mutações, dificuldade de indução de embriões em algumas espécies e grande quantidade de embriões anómalos noutras, fenómeno que pode estar relacionado com a deficiente composição dos meios de cultura (Gray, 2005; Canhoto, 2010).

Um protocolo de indução de embriogénese somática, bem como de conversão de embriões e aclimação de plantas de medronheiro foi já estabelecido por Gomes *et al.* (2009).

1.3.3. Organogénese

No seu sentido literal e mais lato, a organogénese é o processo de morfogénese que leva à formação de qualquer órgão. No entanto, na terminologia da cultura *in vitro*, a designação organogénese, significa a formação de rebentos caulinares a partir de meristemas caulinares induzidos de novo (adventícios) (Schwarz *et al.*, 2005; Chawla, 2010). Durante este processo formam-se estruturas unipolares, havendo o desenvolvimento de tecidos condutores que fazem a ligação com o tecido usado como explante.

A organogénese pode ser conseguida *in vivo*, através de métodos convencionais, ou *in vitro* (Schwarz *et al.*, 2005). Apresenta-se como um método eficaz em várias espécies de plantas e utilizando diferentes explantes, como hipocótilos, raízes, caules, folhas, sépalas e pétalas (Canhoto, 2010). Apesar de se poderem utilizar vários tecidos, meristemáticos ou não, a organogénese é mais eficaz com tecidos imaturos, e mitoticamente mais activos, sendo necessário, em algumas espécies, um tipo particular de explante (Chawla, 2010).

Existem dois métodos de organogénese: directa e indirecta (Figura 8). Na organogénese directa formam-se meristemas adventícios directamente a partir do

explante, os quais, depois de desenvolvidos, originam rebentos caulinares. Na organogénesis indirecta, mais comum, ocorre a formação de gemas a partir de um calo previamente formado.

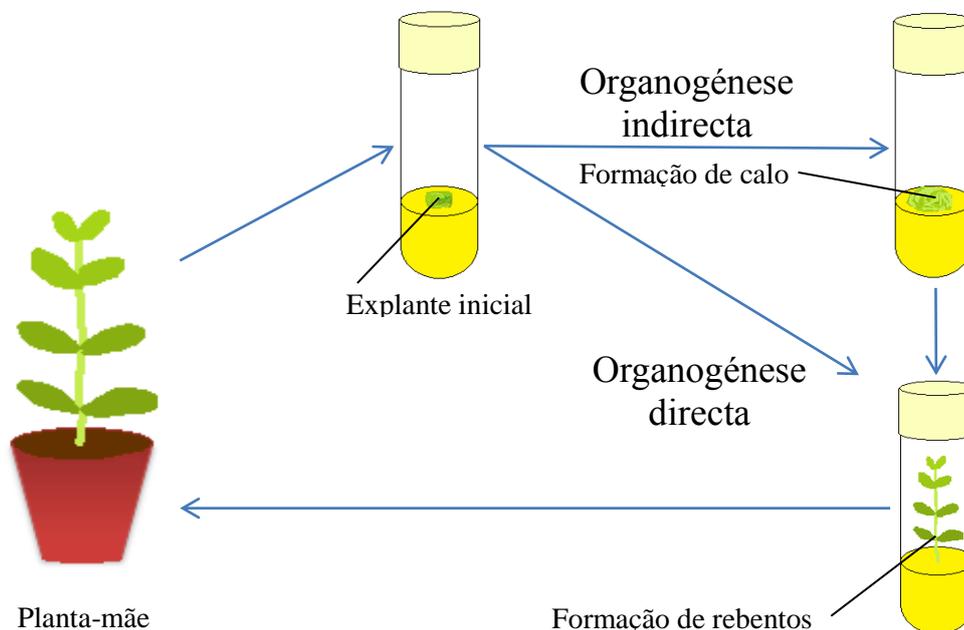


Figura 8: Representação esquemática dos dois tipos de organogénesis: directa e indirecta.

De um modo geral, a organogénesis engloba três fases: início das culturas (em que o material a propagar é devidamente preparado), formação de meristemas (em que ocorre a formação de meristemas que originam plântulas) e enraizamento e aclimatização (durante a qual ocorre a formação de raízes e as novas plantas são colocadas em substrato e ambientadas a condições *ex vitro*) (Schwarz *et al.*, 2005).

Apesar de ser possível a formação espontânea de caules adventícios a partir de explantes colocados em meios sem quaisquer reguladores de crescimento, na maioria das espécies é necessária a adição destes reguladores (Chawla, 2010). No caso das culturas *in vitro*, são os constituintes do meio, e em particular a relação auxina/citocinina, que determinam a via de regeneração que os tecidos vão tomar (Slater *et al.*, 2008).

A organogénesis tem grande potencial para a propagação em massa, pois a partir de um único explante podem formar-se centenas de rebentos (Chawla, 2010). Apresenta contudo algumas desvantagens, tais como a oxidação de fenóis ou a formação de plantas

vitrificadas (Canhoto, 2010), que são especialmente notórias em algumas espécies. A organogênese indirecta pode ainda aumentar a possibilidade de ocorrer variação na constituição cromossómica (Schwarz *et al.*, 2005).

No caso do medronheiro foi já observada a capacidade de formação de calo, sem no entanto se ter verificado, nas condições de cultura testadas, a formação de rebentos, mas apenas de folhas morfológicamente anómalas em alguns casos esporádicos (Gomes *et al.*, 2010).

1.3.4. Variação somaclonal

A ocorrência de variação genética nas plantas propagadas é um dos maiores problemas das culturas *in vitro* (Yuan *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Rathore *et al.*, 2011; Leva & Petruccelli, 2012). Esta variação somaclonal ocorre sobretudo em resposta ao stress imposto na planta sob pelas condições *in vitro* e manifesta-se sob a forma de metilações do DNA, rearranjos dos cromossomas e mutações pontuais (Kumar *et al.*, 2010). A frequência da variação depende dos explantes e do tipo de regeneração, da composição do meio e das condições de cultura (Rathore *et al.*, 2011). A utilização de hormonas, particularmente auxinas, como o 2,4-D, bem como de outros componentes do meio de cultura, é considerado um factor importante na ocorrência de variação somaclonal (Taji *et al.*, 2002). De acordo com a estabilidade genética que proporcionam, as técnicas de propagação utilizadas podem ser ordenadas (da maior estabilidade para a menor) do seguinte modo: micropropagação de ápices e gemas, formação de rebentos adventícios, embriogénese somática e organogénese. A micropropagação a partir de meristemas axilares é considerada de baixo risco em termos de instabilidade genética, uma vez que os meristemas organizados são geralmente mais resistentes a alterações genéticas que os tecidos calosos pouco organizados (Leva & Petruccelli, 2012).

Nos últimos anos, a indução de mutações e a variação somaclonal derivada do processo de cultura de tecidos têm sido usadas como novas fontes de variabilidade (Miñano *et al.*, 2009). No entanto, desde a primeira observação deste acontecimento, a variação somaclonal permanece um dos maiores problemas na multiplicação de muitas plantas, limitando seriamente a utilidade da micropropagação (Rathore *et al.*, 2011). Este facto é especialmente indesejado na propagação clonal de plantas geneticamente

transformadas ou para programas de propagação em larga escala (Heinze & Schmidt, 1995). No estabelecimento de cultivares comerciais é igualmente importante que a conservação das suas características seja garantida (Miñano *et al.*, 2009). Por estas razões, é importante testar a homogeneidade genética das plantas regeneradas (Jayanthi & Mandal, 2001), bem como identificar as plantas que mantêm a estabilidade genética em relação à planta mãe, para controlo de qualidade na cultura de tecidos (Kumar *et al.*, 2010).

As variações somaclonais podem ser determinadas ao nível morfológico, citológico, bioquímico e molecular através de várias técnicas (Rathore *et al.*, 2011). As técnicas de marcadores são actualmente ferramentas poderosas e fidedignas para analisar a estabilidade genética (Liu *et al.*, 2011; Rathore *et al.*, 2011), sendo a técnica de Random Amplified DNA (RAPD) uma das mais usadas (Miñano *et al.*, 2009). Esta técnica é simples, rápida e relativamente pouco dispendiosa (Yuan *et al.*, 2009), tendo sido reportada como uma ferramenta importante na análise da variação entre plantas regeneradas *in vitro* (Jayanthi & Mandal, 2001).

1.4. MELHORAMENTO DE PLANTAS

O melhoramento de plantas visa a obtenção de plantas com características vantajosas e, por isso, em qualquer programa de melhoramento é necessário identificar e/ou produzir variabilidade genética, relacionada com as características consideradas interessantes (Cagliari, 2001). A selecção de plantas com as características desejadas (selecção artificial) e o seu posterior cruzamento é o método mais convencional que pode ser usado com esse propósito. Uma vez obtidas plantas com as características desejadas, é necessário multiplicá-las para que o seu potencial possa ser explorado. As técnicas de multiplicação *in vitro* descritas anteriormente apresentam grande potencial para este efeito (Cagliari, 2001). No entanto, outras técnicas *in vitro* podem também ser importantes no melhoramento das espécies, como é o caso da embriogénese polínica (Canhoto, 2010) e da poliploidização (Väinölä, 2000; Gepts, 2003; Kanchanapoom & Koarapatchaikul, 2012).

1.4.1. Embriogénese polínica

Os haplóides possuem o mesmo número de cromossomas do gametófito e a sua ocorrência natural foi já observada em várias espécies de plantas, ainda que numa frequência demasiado baixa para que possam ser usados em programas de melhoramento. Assim, no sentido de contornar esta limitação, foram desenvolvidas técnicas que permitem a obtenção de plantas haplóides. Uma das mais eficazes é a cultura de anteras e micrósporos (Shivanna, 2003), não só pelo grande número de micrósporos por antera mas também por ser de fácil aplicação. Através desta técnica, designada embriogénese polínica ou androgénese, foram obtidos haplóides em mais de 200 espécies (Shivanna, 2003). Apesar de a maioria destes haplóides terem sido obtidos em gramíneas, crucíferas e solanáceas, foram também recentemente obtidos haplóides em lenhosas (Canhoto, 2010).

A embriogénese polínica envolve geralmente duas fases: indução e desenvolvimento de embriões. Aparentemente, os tecidos da parede da antera favorecem a indução de embriões, mas são prejudiciais ao seu desenvolvimento, provavelmente devido à libertação de substâncias inibitórias por parte dos tecidos da antera que degeneram. Em algumas espécies forma-se um calo a partir dos tecidos da antera, que compete com os tecidos formados a partir do micrósporo. Quando os micrósporos em cultura originam um calo em vez de embriões, o calo é geneticamente heterogéneo, uma vez que resulta da divisão de vários micrósporos. Por estas razões, a cultura dos micrósporos pode ser vantajosa em relação à cultura de anteras (Shivanna, 2003).

A formação de plantas haplóides pode ocorrer directamente a partir das anteras ou indirectamente, através da formação de um calo onde posteriormente se diferenciam rebentos caulinares ou embriões. Na mesma planta, e inclusivamente na mesma antera, pode-se verificar a ocorrência de ambos os processos (Canhoto, 2010).

Em relação à formação dos embriões, podem considerar-se duas vias principais (Figura 9):

- a) O micrósporo sofre uma divisão simétrica e origina duas células idênticas. Os embriões ou calo derivam da actividade de ambas. Esta via é muito comum.

- b) A divisão inicial do micrósporo é assimétrica levando à formação das células vegetativa e generativa. Os embriões ou calo podem derivar da actividade da célula vegetativa, como é mais comum, da célula generativa ou, mais raramente, de ambas.

De uma forma geral a morfologia dos embriões resultantes é semelhante à dos embriões zigóticos. No entanto, os padrões de divisões iniciais podem ser bastante diferentes (Shivanna, 2003).

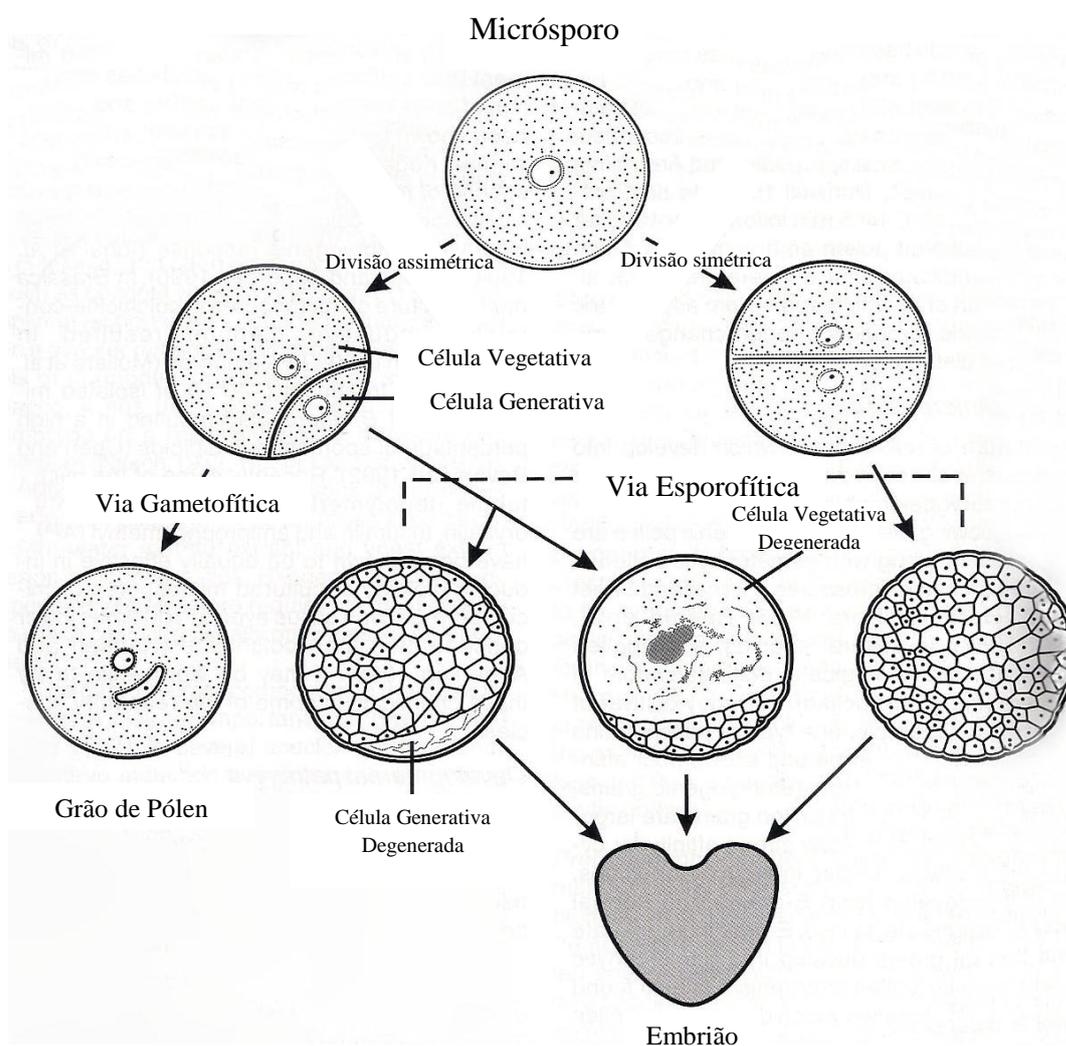


Figura 9: Diagrama representativo das vias gametofítica e esporofítica (embriogénica) do micrósporo (Shivanna, 2003).

São vários os factores que se revelam importantes na androgénese, tais como o genótipo e fisiologia da planta dadora, composição do meio de cultura, estágio de desenvolvimento dos micrósporos em cultura e pré-tratamento das anteras (Shivanna, 2003; Reed, 2005; Canhoto, 2010).

A composição óptima do meio varia dependendo da espécie e, apesar de muitas vezes se usar um meio complexo contendo auxinas e citocininas, a resposta óptima em algumas espécies ocorre em meios relativamente simples e com baixas concentrações de hormonas. Altas concentrações de hormonas presentes no meio podem levar à formação de calo. Em algumas espécies a concentração de carboidratos é fundamental, sendo a sacarose a fonte de açúcar mais usada. Outros factores como pH, agente gelificante, fonte de nitrogénio e utilização de carvão activado, podem ser igualmente importantes (Shivanna, 2003).

O estágio de desenvolvimento dos micrósporos em cultura é crítico na maioria das espécies. Devem preferivelmente ser usados micrósporos (isolados ou não) num estado de desenvolvimento imediatamente anterior à primeira mitose polínica ou, então, grãos de pólen muito jovens (logo após a mitose polínica), por apresentarem melhor capacidade de resposta em relação aos restantes estádios de desenvolvimento.

O pré-tratamento das anteras a baixas temperaturas (3-5°C) ou a altas temperaturas (30-45°C) revela-se também importante na indução da embriogénese polínica em algumas espécies (Shivanna, 2003). As condições de temperatura e luminosidade do material em cultura podem ser também factores importantes (Reed, 2005).

A obtenção de haplóides é muito importante no melhoramento vegetal devido à sua grande utilidade na obtenção de diplóides homocigóticos (Shivanna, 2003; Canhoto, 2010). Estas linhas puras (duplo-haplóides) podem ser obtidas através de embriogénese polínica num curto período de tempo, enquanto através de técnicas convencionais de melhoramento são necessários normalmente 6-8 anos (Canhoto, 2010). Os embriões haplóides podem também ser usados como modelo para estudos de embriogénese (Shivanna, 2003).

A embriogénese polínica apresenta, no entanto, algumas limitações. A ploidia das plantas formadas pode variar, podendo ocorrer mesmo a formação de plantas com altos níveis de ploidia, e é raro obterem-se plantas exclusivamente haplóides (Shivanna, 2003). A baixa percentagem de indução de embriões, juntamente com a proliferação de tecidos somáticos, a ocorrência de albinismo, a variabilidade das plantas regeneradas e as anomalias morfológicas dos embriões, à semelhança do que acontece na embriogénese somática, são outras limitações a assinalar (Canhoto, 2010).

1.4.2. Poliploidização

A maior parte das espécies de plantas selvagens é diplóide. No entanto, beneficiando do facto de o seu genoma ser mais flexível que o dos animais, a poliploidia é um fenómeno comum nas plantas (Gepts, 2003). Na natureza cerca de 70% das Angiospérmicas sofreu poliploidização, resultando por vezes plantas de boa qualidade, com aumento da produção e resistência a condições de stress ambiental e doenças (Tang *et al.*, 2010).

A duplicação de cromossomas tem sido usada na horticultura como ferramenta para a obtenção de novas características ornamentais. A poliploidização origina, entre outras características, folhas mais espessas, cor verde mais intensa, aumento do rácio comprimento:largura da folha, flores de maior tamanho, período de floração mais prolongado, hábito de crescimento mais compacto, maior resistência a doenças, aumento do tamanho do fruto e maior robustez da planta (Väinölä, 2000; Kanchanapoom & Koarapatchaikul, 2012). De uma forma geral, a poliploidização pode ser vantajosa em termos do aumento de produção e adaptação das plantas a uma grande variedade de condições ambientais (Gepts, 2003).

Para além da obtenção de plantas com características vantajosas, a poliploidização pode também servir para recuperar a fertilidade ou prevenir a esterilidade dos híbridos, resultantes de cruzamentos específicos entre plantas com diferentes ploidias (Väinölä, 2000). As plantas tetraplóides obtidas podem também ser usadas para produzir triplóides estéreis, através do cruzamento com diplóides (Väinölä, 2000; Kanchanapoom & Koarapatchaikul, 2012).

A produção de poliplóides pode ocorrer espontaneamente ou por indução artificial. Esta última desempenha um papel importante, tendo sido desenvolvidos já vários trabalhos, em diversas espécies, com vários agentes c-mitóticos, como a colquicina e a orizalina (Väinölä, 2000; Tang *et al.*, 2010; Kanchanapoom & Koarapatchaikul, 2012). Tratamentos com colquicina e orizalina podem também ser eficazes na diploidização de plantas haplóides (Shivanna, 2003).

A indução artificial de poliplóides pode ser realizada *in vivo* e *in vitro*. No caso da indução *in vitro*, o material a induzir pode ser calo, ápices ou rebentos caulinares (Tang *et al.*, 2010).

1.5. OBJECTIVOS

O medronheiro, tradicionalmente uma espécie NUC (www.underutilized-species.org), tem vindo cada vez mais a ser aposta de vários agricultores, devido ao seu grande potencial (Gomes & Canhoto, 2009). Apesar do intenso trabalho que tem vindo a ser realizado ao longo dos últimos anos, a investigação nesta espécie continua a ser muito limitada. O presente trabalho insere-se num projecto mais alargado de melhoramento do medronheiro que tem sido desenvolvido pelo Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, em colaboração com a Escola Superior Agrária de Coimbra, e pretende ser mais uma contribuição para um melhor conhecimento dos processos de propagação desta espécie.

Assim, o trabalho realizado teve como objectivo principal a análise detalhada e a aplicação de diversas técnicas de propagação, bem como de melhoramento do medronheiro. Para atingir esse objectivo, e uma vez que se verifica alguma dificuldade na germinação das sementes desta espécie, pretendeu desenvolver-se um protocolo eficiente e simples de aplicar, que permita a obtenção de elevadas taxas de germinação. No que diz respeito à embriogénese somática, procurou avaliar-se o efeito do genótipo nas taxas de indução, a morfologia dos embriões formados e o potencial de indução de embriogénese somática em embriões zigóticos maduros. Outro dos objectivos deste trabalho foi a avaliação da organogénese e multiplicação de rebentos em meio líquido como potenciais métodos de propagação em medronheiro. Como complemento às técnicas de propagação, pretendeu avaliar-se a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal, nas plantas propagadas.

Relativamente aos procedimentos de melhoramento do medronheiro, pretendeu dar-se continuidade a trabalhos realizados anteriormente, designadamente através de ensaios de poliploidização com recurso a agentes c-mitóticos como a colquicina e a orizalina. Para além disso, foram aplicadas técnicas, como a embriogénese polínica e a polinização artificial, cuja aplicação ao medronheiro é aqui referida pela primeira vez. No caso da embriogénese polínica, para além da indução de embriogénese, procurou estabelecer-se uma relação entre a morfologia da flor e o estado de desenvolvimento dos micrósporos. Em relação à polinização artificial, o objectivo foi a avaliação da germinação do pólen no estigma e da possibilidade de cruzamento entre diferentes genótipos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE MEDRONHEIRO

Material vegetal

Neste trabalho, foram utilizadas plantas de medronheiro de vários clones previamente estabelecidos *in vitro*: AL 1, AL 7, C 1, C 2, ESAC 2, ESAC 5, HP, P e SB (Tabela 1). Utilizou-se também material colhido no campo. Frutos colhidos em Chaves (41°42'39.64"N 7°26'21.54"W) e flores colhidas em Coimbra, em três locais distintos: Chão do Bispo (40°12'17.50"N 8°23'41.43"W), Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (JBUC) e Romeiras (40°11'33.71"N 8°23'36.88"W) (Tabela1).

Tabela 1. Proveniência do material usado nos diferentes procedimentos.

Procedimento	Material	Proveniência
2.1.1. Germinação de sementes	Sementes	Chaves
2.1.2. Indução de embriogénese somática	Clones AL 1, AL 7, C 1, ESAC 5, P e SB	<i>In vitro</i>
2.1.3. Organogénese	Clones C 1, ESAC 2 e SB	<i>In vitro</i>
2.1.4. Crescimento em meio líquido	Clones AL 1, ESAC 5 e HP	<i>In vitro</i>
2.1.5. RAPDs	Clones C 2, HP e SB	<i>In vitro</i>
2.2.1. Polinização artificial	Flores	Chão do Bispo, JBUC, Romeiras
2.2.2. Ensaio de embriogénese polínica	Anteras	Romeiras
2.2.3. Ensaio de poliploidização	Clones C 1, P e SB	<i>In vitro</i>
2.4.1. Acetólise dos grãos de pólen	Pólen	JBUC
2.4.2. Técnica histológica	Anteras	Chão do Bispo

2.1.1. Germinação de sementes

Nos ensaios de germinação de sementes foram usados frutos maduros colhidos no início de Janeiro de 2012, numa árvore a crescer em habitat natural, na zona de Chaves. Os frutos foram lavados várias vezes em água tépida, de forma a remover os resíduos superficiais, e foram depois mantidos em água durante cerca de 24 h, para amolecer os tecidos. Em seguida foram esmagados e as sementes separadas à mão. Depois de bem lavadas em água, as sementes que flutuavam foram rejeitadas e as restantes foram colocadas em agitação, durante alguns minutos, em água destilada contendo 2-3 gotas de Tween 20. Seguiu-se uma lavagem rápida de 30 s em etanol 70%, uma lavagem de 10 min numa solução de hipoclorito de cálcio 5% w/v (Merck) e três lavagens em água destilada esterilizada, numa câmara de fluxo laminar. As sementes foram depois colocadas em caixas de Petri esterilizadas (10 cm de diâmetro), com o fundo revestido com um disco de papel de filtro e algodão, previamente humedecidos com água destilada esterilizada. Em cada caixa de Petri foram colocadas 20 sementes e cada tratamento consistiu de 5 réplicas num total de 100 sementes). As caixas do grupo controlo foram imediatamente colocadas numa estufa a 26°C, na obscuridade, enquanto as restantes foram mantidas a 4°C durante 3, 7, 14, 21 e 28 dias, dependendo do tratamento, e só depois transferidas para a estufa a 26°C (Figura 10).

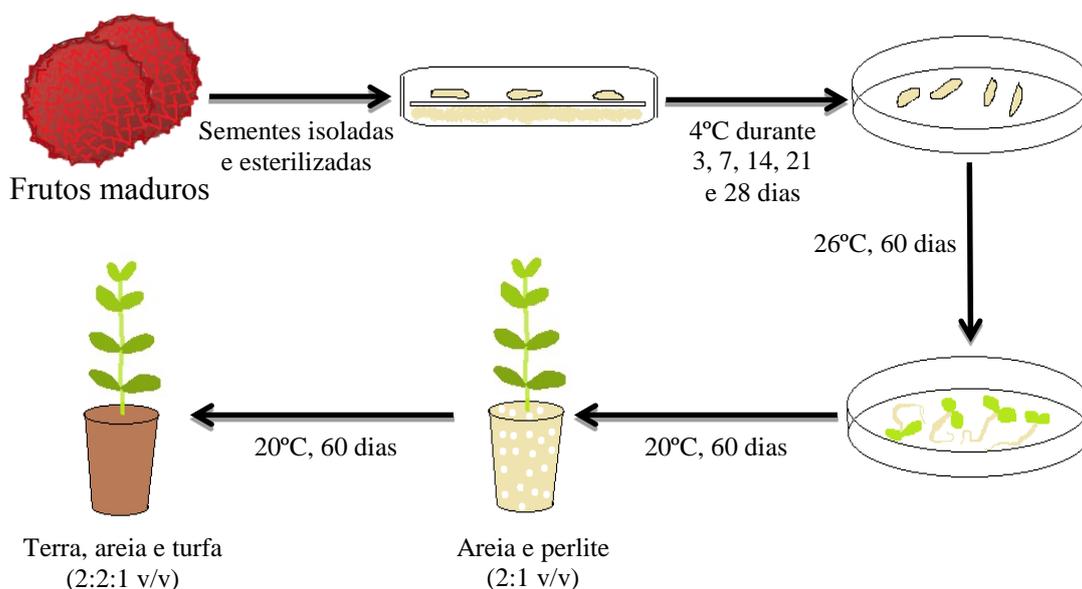


Figura 30. Esquema do procedimento realizado nos ensaios de germinação de sementes.

A formação de plântulas foi registada ao longo de 60 dias e a percentagem degerminação foi calculada, tendo-se depois procedido à análise estatística dos resultados (ver secção 2.3.). Após 60 dias na estufa, foram seleccionadas 100 plântulas que foram transferidas para recipientes com um substrato esterilizado composto por areia e perlite (2:1 v/v). Os recipientes, cobertos com um plástico durante as primeiras 2-3 semanas, foram colocados numa câmara de cultura (Fitoclima 1000 EHHF) durante 60 dias, a 20°C, 70% humidade e fotoperíodo de 12 horas. No final deste período, a taxa de sobrevivência foi registada e as plantas foram transferidas para recipientes individuais contendo um substrato composto por terra, areia e turfa (2:2:1 v/v) e mantidas na câmara de cultura por mais 2 meses (Figura 10).

2.1.2. Indução de embriogénese somática

Nos ensaios de indução de embriogénese somática foram utilizados explantes de seis clones previamente estabelecidos *in vitro*: AL 1, AL 7, C 1, ESAC 5, P e SB (Tabela 1). O meio de cultura utilizado era constituído pelos macronutrientes de Anderson (1984), vitaminas de Fossard (De Fossard *et al.*, 1974) e micronutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), tendo sido ainda suplementado com uma fonte de ferro (Fe.EDTA), sacarose 0,087 M e os reguladores de crescimento (PGR) BAP (8,8 µM) e NAA (26,8 µM). Para a preparação do meio de cultura, as quantidades de cada componente foram pipetadas a partir de soluções stock e, após a dissolução da sacarose com o auxílio de um agitador magnético, foi adicionada água destilada até perfazer o volume total da solução. O pH do meio foi ajustado a 5,7 recorrendo a soluções stock de HCl e NaOH (ambas de 0,01 - 1,0 M), tendo depois sido adicionado o agente gelificante ágar-ágar (6 g/L) (Cultimed). Por fim, a solução foi aquecida, de forma a dissolver o ágar, e foi distribuída por tubos de ensaio (cerca de 10 ml cada) que foram autoclavados a 120°C durante 20 min.

Os explantes consistiram de 30 folhas de cada clone, repartidos por 3 réplicas. As folhas foram retiradas da zona apical das plantas e, após lhes ter sido retirado o ápice e o pecíolo, foram realizadas pequenas incisões na página abaxial, com um bisturi. O material foi depois mantido durante três meses, numa estufa a 26°C, na obscuridade (Figura 11). No final deste período, o número total de embriões foi contabilizado e a percentagem de indução foi determinada. Os resultados foram depois tratados estatisticamente (ver secção 2.3.)

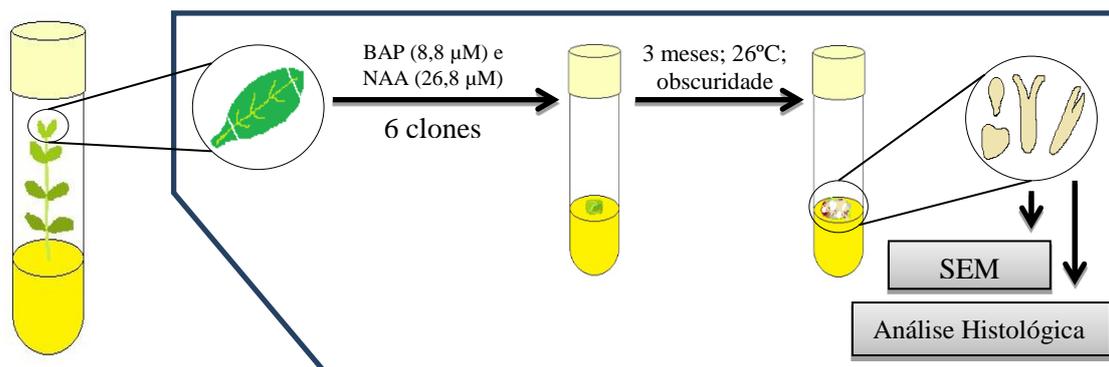


Figura 11. Esquema geral do procedimento realizado na indução de embriogênese somática, usando folhas como explantes.

Ensaio de indução de embriogênese somática foram também realizados utilizando embriões zigóticos maduros como explantes. Nestes ensaios, os embriões foram isolados à lupa, em condições assépticas, a partir de sementes isoladas e esterilizadas conforme descrito em 2.1.1. Foram isolados 30 embriões procedendo-se à sua cultura num meio com a mesma composição do meio referido anteriormente, mas suplementado com três concentrações de 2,4-D (4,52 μM , 9,05 μM e 18,10 μM). Após dois meses, transferiram-se 10 calos para meio fresco com a mesma composição, 10 calos para um meio com 2,4-D (9,05 μM) e os restantes 10 calos para um meio com BAP (8,8 μM) e NAA (26,8 μM). Dois meses depois, os calos foram transferidos para um novo meio de cultura, desta vez constituído pelos macronutrientes, micronutrientes e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), FeEDTA e 2,4-D (9,05 μM). Ao fim de um mês, os calos foram novamente transferidos para um meio de cultura semelhante ao anterior, mas com a cinetina (0,46 μM) como o único PGR. Num outro ensaio, 30 embriões zigóticos foram inoculados em meio MS com 2,4-D (9,05 μM) e cinetina (2,32 μM).

2.1.3. Organogénese

Para a proliferação de rebentos foram utilizadas plantas de três clones previamente estabelecidos *in vitro*: C 1, ESAC 2 e SB (Tabela 1). O meio de cultura era constituído pelos macronutrientes e vitaminas de Fossard (De Fossard *et al.*, 1974) e pelos micronutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), tendo sido ainda adicionada

uma fonte de ferro (Fe.EDTA), sacarose (0,087 M) e a citocinina BAP (8,8 μ M). A preparação do meio de cultura foi como descrito em 2.1.2.

Foram utilizados 45 explantes de cada clone, repartidos por 3 réplicas. O material vegetal foi posto a crescer em frascos Magenta® (66x59) e foi mantido numa câmara climatizada com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas, durante 60 dias. No final do período de crescimento, o número de plantas com mais de 1 cm de comprimento foi contabilizado e realizou-se a análise estatística dos dados obtidos (ver secção 2.3.).

Nos ensaios de organogénese utilizaram-se também massas com capacidade organogénica, formadas de forma espontânea em vários clones a crescer *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi o referido anteriormente e as condições e tempo de cultura foram também as mesmas. Ao longo deste período de tempo, a capacidade de formação de plantas a partir das massas em cultura foi avaliada. Posteriormente procedeu-se ao enraizamento das plantas formadas (cerca de 3 cm), o que envolveu uma fase de indução e uma fase de alongamento de raízes (Figura 12). Na indução, as plantas foram mantidas 10 dias numa estufa a 26°C, na obscuridade, num meio constituído pelos macronutrientes de Knop (Gautheret, 1959), as vitaminas de Fossard, com excepção da rivo flavina, os micronutrientes de MS, com excepção do iodeto de potássio, a sacarose (0,044 M) e a auxina IBA (24,7 μ M). Para o alongamento das raízes, o material foi transferido para o mesmo meio, mas sem IBA e com maior concentração de sacarose (0,087 M) e com carvão (1,5% p/v). Durante este período (3 semanas), os 30 explantes das 3 réplicas foram cultivados em recipientes de cultura Magenta® (77x77x97 mm) numa câmara climatizada com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 h (Figura 12).

No final do período de alongamento das raízes determinou-se a % de enraizamento, o número de raízes formadas e o comprimento das plantas. As plantas foram depois colocadas em substrato (Figura 12), tal como descrito em 2.1.1.

2.1.4. Multiplicação em meio líquido

Para avaliar o potencial de crescimento e de multiplicação das plantas em meio líquido usaram-se três clones estabelecidos *in vitro*: AL 1, ESAC 5 e HP (Tabela 1). A composição do meio de cultura foi a indicada em 2.1.3., com excepção do agente. Trinta plantas de cada clone, desprovidas das folhas, foram colocadas em 18 Erlenmeyers (100

ml de capacidade) contendo 30 ml do meio de cultura. O material foi mantido numa incubadora, a 25°C e 80 rpm, durante um mês (Figura 12). As condições de luminosidade não foram controladas. No final deste período, o procedimento foi repetido, e ao fim de mais um mês de cultura o número de plantas com mais de 1 cm foi contabilizado.

Para o enraizamento das plantas seguiu-se o procedimento descrito em 2.1.3. Foram usadas 30 plantas de cada clone (4-5 cm), distribuídas por três réplicas. Os dados obtidos foram depois sujeitos a um tratamento estatístico (ver secção 2.3.).

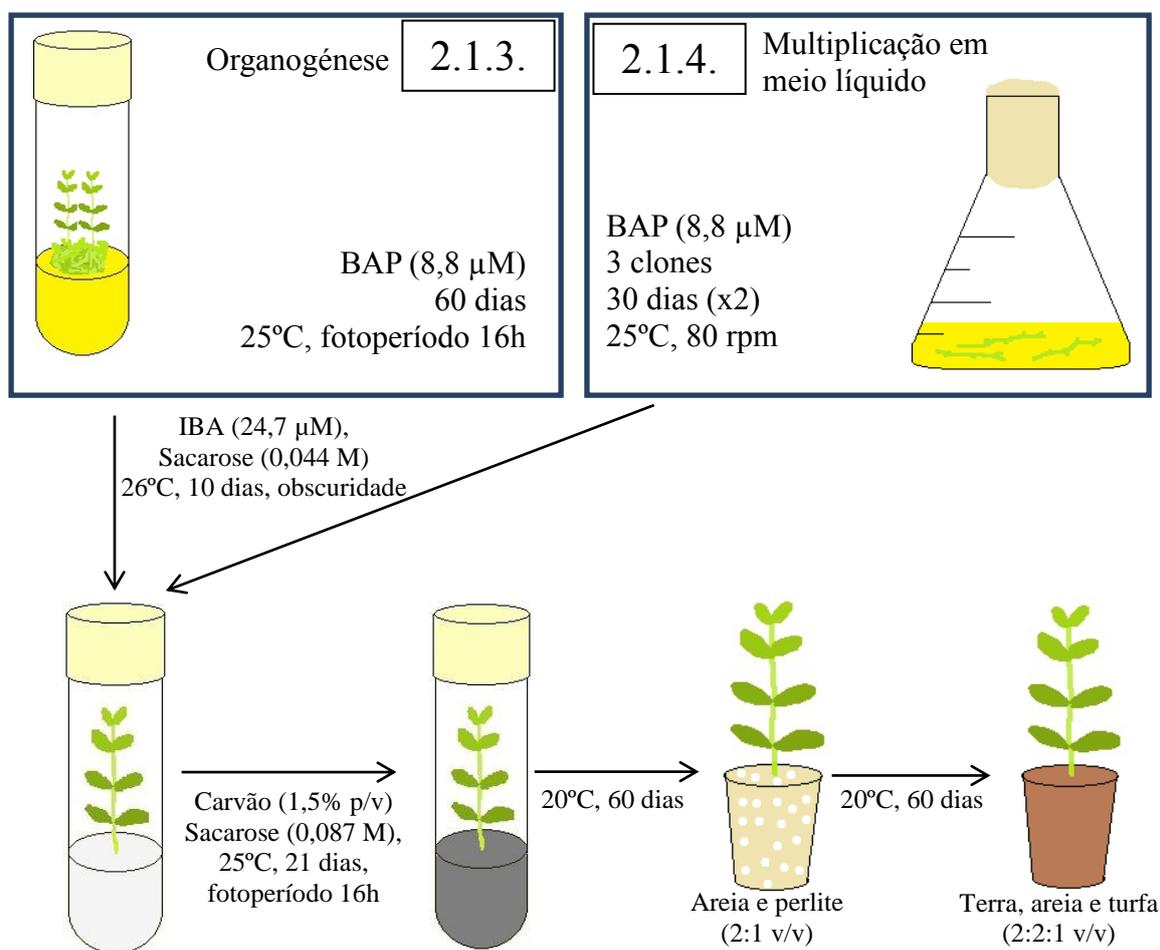


Figura 12. Representação esquemática do procedimento realizado para o enraizamento das plantas resultantes do processo de organogênese e da multiplicação em meio líquido.

2.1.5. Avaliação da variação somaclonal, através de marcadores moleculares (RAPDs), nas plantas propagadas

O DNA genómico foi isolado dos clones C 2, HP e SB (Tabela 1) e das folhas jovens das plantas-mãe previamente congeladas em azoto líquido e mantidas a -80°C.

As folhas jovens das plantas-mãe e de quatro plantas completas de cada clone das culturas *in vitro* (50 a 100 mg por amostra) foram reduzidas a um fino pó em azoto líquido, com o auxílio de um almofariz. O DNA genómico foi extraído recorrendo ao DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) e a sua concentração determinada por espectrofotometria (ND-1000, NanoDrop Technologies).

Foram usados dois primers decâmeros, OPC-10 (5'-TGTCTGGGTG-3') e OPC-11 (5'-AAAGCTGCGG-3') (Operon Technologies Kit C), escolhidos com base nos resultados obtidos por Gomes (2011), que verificou existir um maior número de bandas polimórficas utilizando estes dois primers, numa análise com RAPDs. De forma a minimizar os erros, as reacções de PCR foram preparadas como mixes para cada primer. O PCR foi feito com volumes de 20 µl contendo 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de primer, 0,5 U de Taq DNA polimerase em tampão de reacção 1 X e 40 ng de DNA genómico. A amplificação de DNA foi realizada num Termo Ciclador (BioRad), com uma desnaturação inicial de 5 min, a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 35°C (*annealing*) e 90 s a 72°C (extensão). Um passo final a 72°C durante 10 min foi também realizado. Foram realizadas três réplicas e todas elas foram praticamente reprodutíveis. Os produtos da reacção de PCR foram separados por electroforese num gel de agarose 1,5% (Bioron) e contrastados com GelRed (5µl/100 ml; Biotium). A imagem foi captada no aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BioRad), com o software Image Lab™. Foi feita uma comparação das bandas com um marcador de referência (HyperLadder II - Bionline) e seguidamente procedeu-se a uma análise com vista à detecção de possíveis bandas polimórficas.

2.2. ENSAIOS DE MELHORAMENTO DE MEDRONHEIRO

2.2.1. Polinização artificial

Previamente à realização dos ensaios de polinização, foi avaliada a viabilidade do pólen. Para tal, colheram-se flores de várias árvores na zona das Romeiras (Tabela 1), das quais se isolaram as anteras. As anteras foram deixadas durante cerca de 24 h à temperatura ambiente, em caixas de Petri forradas com papel de alumínio, para deiscerem e libertarem o pólen, o qual foi depois colocado a germinar. Utilizou-se um meio de germinação base constituído por H_3BO_3 (5mg/L), $CaClNO_3$ (15mg/L) e KNO_3 (10mg/L) (Jahier *et al.*, 1992), suplementado com sacarose. O pH foi ajustado a 5,8 como já descrito anteriormente e adicionou-se ágar (0,8%). Foram preparados 7 meios distintos, um dos meios apenas com água e os restantes com o meio base acrescentado de 6 concentrações diferentes de sacarose (0, 3, 6, 9, 12 e 18%). Depois de autoclavados, os meios foram distribuídos por caixas de Petri esterilizadas, numa câmara de fluxo laminar.

O pólen foi distribuído por 21 caixas de Petri, correspondentes aos 7 meios x 3 períodos de tempo, e após as 6, 12 e 24 h, foram retiradas aleatoriamente de cada caixa de Petri cinco amostras de material de dimensões semelhantes ($0,25\text{ cm}^2$). As amostras seleccionadas foram colocadas em lâminas de microscópio, coradas com carmim acético e aquecidas ligeiramente de modo a liquefazer o ágar.

A percentagem de germinação foi determinada e os resultados analisados estatisticamente (ver secção 2.3.). As tétradas polínicas foram consideradas germinadas quando pelo menos um dos grãos de pólen da tétrada desenvolveu um tubo polínico com um comprimento superior ao diâmetro do grão.

Procedeu-se a ensaios de polinização *in vitro* e *in vivo* para o que foram utilizadas flores colhidas numa árvore do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra e em 7 árvores a crescer em habitat natural na zona das Romeiras (Tabela 1).

Depois de desprovidas das pétalas e estames as flores foram colocadas em caixas de Petri (10 cm) com um meio constituído por água e ágar. De seguida, polinizaram-se com pólen da mesma flor, de flores da mesma árvore e de outras árvores, tendo o pólen sido previamente recolhido como descrito atrás. Depois de polinizadas, as flores foram mantidas numa estufa a 24°C, na obscuridade, durante períodos de tempo variáveis de 1

a 48 h. Após estes períodos de tempo, os pistilos foram fixados em FAA (formaldeído:ácido acético glacial:etanol 70%, 5:5:90 v/v/v) durante 24 h, lavados em água destilada, amolecidos durante 4 – 6 h com NaOH 8N e novamente lavados em água tépida. De seguida, colocaram-se os estiletos em lâminas de vidro sobre uma gota de azul de anilina 0,1% (Chroma) em K_3PO_4 0,1 N. Depois de colocar a lamela e efectuar uma leve pressão de forma a esmagar ligeiramente o tecido, as preparações foram observadas num microscópio Nikon equipado com um sistema de epifluorescência, com filtro de excitação ultravioleta (transmissões de 330 – 380 nm) e um filtro de barreira de 420 nm. Adaptação da técnica utilizada por Martin (1958) em *Lycopersicon chilense*.

As imagens foram captadas com uma máquina fotográfica Nikon Digital Sight DS-U1 e o software Act-2U.

Nos ensaios *in vivo*, polinizaram-se algumas flores de várias árvores na zona de Chão do Bispo (Tabela 1). As flores, desprovidas das pétalas e estames, foram polinizadas com o pólen usado nos ensaios *in vitro* e cobertas com sacos de plásticos nos quais foram feitos pequenos orifícios com uma agulha. 24 h após a polinização, recolheram-se alguns pistilos, que foram sujeitos ao procedimento descrito atrás. No final de um mês os sacos foram retirados.

2.2.2. Ensaio de embriogénese polínica

Durante o mês de Novembro e início de Dezembro, foram colhidas flores de um exemplar existente no Jardim Botânico e de outros existentes nas Romeiras (Tabela 1).

As flores (8 mm - 1 cm) foram colocadas em agitação, durante alguns minutos, em água destilada contendo 2-3 gotas de Tween 20. Após uma lavagem rápida de 30 s em etanol 70%, de 10 min numa solução de hipoclorito de sódio 5% (Merck) e três lavagens em água destilada esterilizada, realizadas na câmara de fluxo laminar, foram isoladas 2800 anteras.

Algumas destas anteras foram imediatamente colocadas em cultura, em caixas de Petri (5 cm de diâmetro), a 26°C na obscuridade. Outras anteras foram sujeitas a um pré-tratamento pelo frio (4°C) durante 5-9 dias, sendo depois mantidas nas mesmas condições das anteriores. Utilizaram-se 10 meios de cultura distintos, que consistiam do meio base MS descrito em 2.1.2. e composição hormonal variável (Tabela 2).

Após dois meses em cultura, a percentagem de indução foi determinada e os calos formados foram transferidos para meio de MS com cinetina (0,46 μ M) e mantidos nas condições referidas no parágrafo anterior. O restante material foi mantido em cultura por mais dois meses, nas mesmas condições.

Tabela 2. Composição hormonal dos meios de cultura usados na indução de embriogénese polínica

Meio	Hormonas (μ M)
EP 1	NAA (0,07) + 2,4-D (0,09) + Kin (4,65) + BAP (2,22) + Zt (2,28) + ácido ascórbico (2839)
EP 2	NAA (0,07) + 2,4-D (0,09) + Kin (4,65) + BAP (2,22) + Zt (2,28)
EP 3	2,4-D (4,52) + Kin (2,32) + ácido ascórbico (2839)
EP 4	2,4-D (4,52) + Kin (2,32)
EP 5	2,4-D (0,23) + Kin (4,65) + ácido ascórbico (2839)
EP 6	2,4-D (0,23) + Kin (4,65)
EP 7	GA ₃ (14,44) + 2,4-D (0,45) + Kin (2,32) + ácido ascórbico (2839)
EP 8	GA ₃ (14,44) + 2,4-D (0,45) + Kin (2,32)
EP 9	2,4-D (0,45) + Kin (2,32) + ácido ascórbico (2839)
EP 10	2,4-D (0,45) + Kin (2,32)

2.2.3. Ensaio de poliploidização

Nos ensaios de indução de poliplóides, 270 plantas das linhas P e SB (cerca de 120 de cada) (Tabela 1) foram sujeitas aos tratamentos indicados na tabela 3 (15 plantas por tratamento). Foram ainda realizados dois grupos controlo, em meio sólido e líquido. A composição do meio de cultura foi a descrita em 2.1.3. Utilizaram-se dois agentes c-mitóticos – colquicina (Sigma) e orizalina (Supelco) – preparados como solução stock e dissolvidos em etanol 70% (v/v), DMSO 1% (v/v) (Panreac) e água destilada. Devido ao facto de as quantidades de etanol e DMSO usadas terem sido muito reduzidas, optou-se por não testar grupos controlos para avaliar o efeito destes agentes. No caso dos tratamentos em meio sólido, as plantas foram colocadas em frascos de cultura Magenta® (66x59), com cerca de 20 ml de meio e mantidas numa câmara climatizada, a 25 °C e fotoperíodo de 16 horas. No final do período de incubação, o material foi colocado nas mesmas condições mas em meio desprovido do agente c-mitótico. Em

relação aos tratamentos em meio líquido, as plantas foram colocadas em Erlenmeyers de 50 ml com cerca de 15 ml de meio e mantidas numa incubadora, a 24°C e 80 rpm. Terminado o período de incubação, o material foi lavado com meio de cultura líquido, sem sacarose, e transferido para meio de cultura sólido. Depois de um mês de cultura, a taxa de sobrevivência foi registrada e as plantas foram transferidas para um meio fresco. Após mais um mês, as plantas foram de novo transferidas para meio de cultura fresco e as plantas resultantes do desenvolvimento dos meristemas axilares foram separadas do explante original. Depois de um mês em cultura, 36 plantas foram enraizadas e aclimatizadas conforme já descrito em 2.3.1.

Tabela 3. Tratamentos usados na indução de tetraplóides.

Clone	Meio de Cultura	Colquicina		Orizalina	
		Concentração (µM)	Tempo de incubação (dias)	Concentração (µM)	Tempo de incubação (dias)
P e SB	Sólido	125	7	75	7
			10		10
		250	7	125	7
			10		10
		500	7	175	7
			10		10
	Líquido	425	7	25	7
			10		10
		850	7	50	7
			10		10
		1275	7	75	7
			10		10
C 1	Sólido	250	3	50	3
			5		5
		500	3	100	3
			5		5
		1000	3	150	3
			5		5
	Líquido	212,5	3	5	3
			5		5
		425	3	15	3
			5		5
		850	3	25	3
			5		5

Num segundo ensaio com o clone C 1 (Tabela 1), foram seguidos os mesmos procedimentos, mas com algumas alterações nas concentrações do agente c-mitótico e no tempo de incubação (Tabela 3). No caso dos meios líquidos foi efectuada uma alteração adicional: depois do período de incubação, as plantas foram mantidas em meio líquido durante um mês antes de serem transferidas para meio sólido.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de todos os resultados obtidos foi realizada através de uma ANOVA (Statistica 8.0) e as diferenças significativas entre os valores avaliados por um Teste de Tukey ($p > 0,05$). No caso dos resultados em percentagem, estes foram primeiramente transformados pelo arcoseno.

2.4. ESTUDOS MORFOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS

2.4.1. Acetólise dos grãos de pólen

A análise polínica foi realizada utilizando flores colhidas de uma árvore do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (Tabela 1). As anteras foram isoladas e o pólen foi crivado através de uma rede de malha fina com o auxílio de jactos de água destilada. O material polínico, depois de decantado e transferido para um tubo *eppendorf*, foi centrifugado a 2000 rpm e novamente decantado. Após se ter adicionado ácido acético glacial, o material foi agitado e novamente centrifugado e decantado. O tubo *eppendorf* foi em seguida preenchido até cerca de 2/3 com a mistura de acetólise clássica 9:1 (27 gotas de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico; Erdtman, 1960). O tubo foi depois colocado na estufa, aberto, a uma temperatura de 120°C, durante cerca de 20 min. Após nova centrifugação e decantação, o material foi lavado em acetona e novamente centrifugado e decantado, tendo estes últimos passos sido realizados duas vezes. O material foi depois separado para observações no Microscópio óptico e Microscópio Electrónico de Varrimento (SEM).

Microscopia Óptica

Aos grãos de pólen acetolizados adicionou-se glicerol a 50% e a mistura foi centrifugada e decantada. Após terem sido adicionadas 3 a 5 gotas de gelatina-glicerinada, previamente derretida por aquecimento moderado, retiraram-se algumas gotas desta mistura com o material polínico em suspensão, que foram colocadas em 3 lâminas de vidro e depois cobertas por uma lamela. As preparações foram observadas num microscópio óptico Nikon Eclipse E400, e as imagens captadas com uma máquina fotográfica Nikon Digital Sight DS-U1 e o software Act-2U. Mediu-se o diâmetro da tétrada (D) e o eixo polar do grão de pólen (P), e a razão D/P foi determinada. Foram medidas 10 tétradas de cada uma das 3 preparações.

Microscopia Electrónica de Varrimento

O pólen acetolizado foi depositado directamente sobre o porta-amostras, e deixado a secar à temperatura ambiente. Posteriormente, foi metalizado com ouro paládio numa unidade de metalização JEOL JFC-1100 (1,2 Kv, 10 mA, 11 min). As observações realizaram-se num microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM 5400 (15Kv), tendo sido captadas as imagens com interesse.

2.4.2. Técnica histológica

Para a análise histológica de embriões somáticos, utilizou-se material obtido no processo descrito em 2.1.1, e para a análise histológica das anteras foram utilizadas flores colhidas na zona de Chão do Bispo (Tabela 1).

Os embriões somáticos e as anteras foram fixados, durante 2 a 4 horas, à temperatura ambiente, numa solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,8, ao qual foi adicionado cloreto de cálcio 0,01 M. O material foi depois submetido a três lavagens de 15 min cada, no mesmo tampão, seguindo-se uma pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio, durante cerca de 2 h. Após 3 lavagens de 15 min em água destilada, o material foi desidratado numa série ascendente de etanol (70, 80, 90, 95 e 100%). O material foi em seguida impregnado com três soluções sucessivas de etanol 100% e resina (Spurr, 1969) nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2, durante 2 horas cada. Uma vez que nas primeiras amostras se verificou alguma dificuldade de penetração da resina nos tecidos, as amostras seguintes foram

submetidas a cinco soluções pré-impregnantes em vez de três. O material foi finalmente mantido em resina pura por uma noite e depois colocado em moldes de borracha com a resina, tendo permanecido numa estufa a 60°C, durante 24 horas, de forma a polimerizar a resina e formarem-se blocos de material. Destes blocos foram obtidos cortes semi-finos (1 µm de espessura), utilizando um ultramicrotomo LKB Ultratome III equipado com facas de vidro. Os cortes foram transferidos para uma gota de água destilada sobre uma lâmina de vidro e deixados a secar durante ca.de 24 horas a 60 °C.

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

Dos embriões somáticos desidratados e mantidos em etanol a 100%, alguns foram também processados para SEM. Para tal, foram secos pelo método do ponto crítico num aparelho CPD 020 (Balzers), no qual o etanol é gradualmente substituído por CO₂. Posteriormente, foram depositadas em porta-amostras, metalizados e observados ao microscópio, como descrito em 2.4.1.

3. RESULTADOS



3. RESULTADOS

3.1. PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DO MEDRONHEIRO

3.1.1. Germinação de sementes

Neste ensaio pretendeu-se avaliar o efeito de um pré-tratamento pelo frio na capacidade de germinação das sementes. As sementes foram sujeitas a 4°C durante vários períodos de tempo, tendo-se verificado diferenças significativas entre os diversos tratamentos. De uma forma geral, a percentagem de germinação aumentou com o aumento do período de exposição ao frio, à excepção do tratamento de 28 dias, em que se verificou uma ligeira diminuição (Figura 13). As maiores percentagens de germinação foram obtidas com os tratamentos mais prolongados de 14, 21 e 28 dias, não se tendo verificado diferenças estatísticas significativas entre estes três tratamentos. No caso dos dois tratamentos mais prolongados a percentagem de germinação foi muito próxima de 100% (Figura 13).

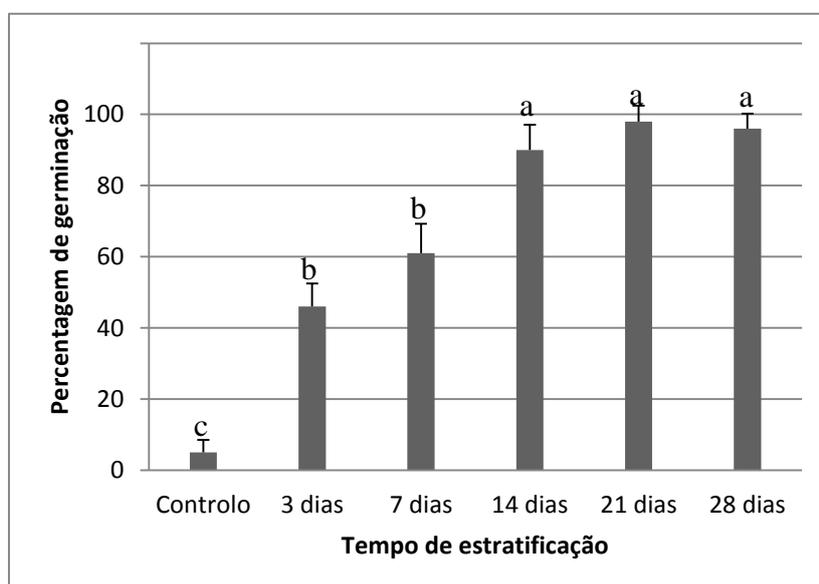


Figura 13. Percentagem de germinação das sementes de medronheiro após exposição a 4°C durante diferentes períodos de tempo. Cada valor é a média em percentagem, e o respectivo desvio padrão, de cinco réplicas. Os valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A maioria das plântulas obtidas apresentava um sistema radicular ainda pouco desenvolvido, sem raízes secundárias, e uma ligeira despigmentação (Figura 14 A). Em alguns casos foi também verificada uma torção do caule. Apesar da aparente fragilidade das plântulas, registou-se uma taxa de sobrevivência de 83% no final dos dois primeiros meses em substrato (Figura 14 B). Nesta fase de crescimento, as plantas apresentavam um sistema radicular bem desenvolvido (Figura 14 C). Embora não tenham sido recolhidos dados quantitativos no que respeita ao crescimento das plantas, todas elas se desenvolveram de forma considerável durante o período de aclimatização (Figura 14 D). Verificou-se, no entanto, alguma discrepância no crescimento, bem como uma variabilidade fenotípica, observável sobretudo ao nível da folha (Figura 14 D e E).

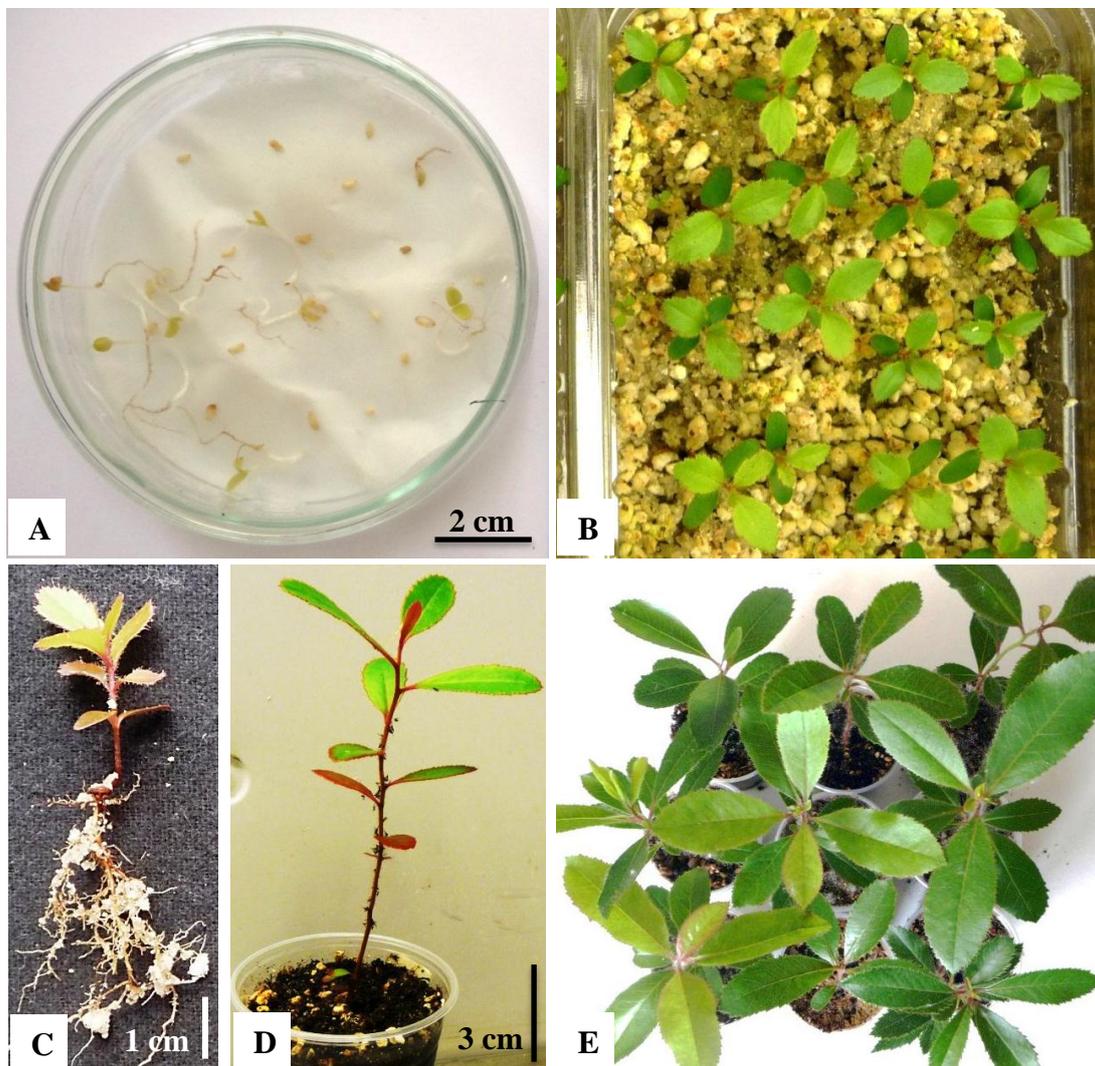


Figura 14. Diferentes aspectos do crescimento das plantas de medronheiro resultantes da germinação de sementes. (A) Plântulas com um mês de crescimento. (B) Plantas após um mês em substrato. (C) Planta com três meses. (D) Planta com seis meses. (E) Variabilidade fenotípica das plantas após 6 meses de crescimento.

3.1.2. Embriogénese somática

A resposta por parte dos explantes foliares em cultura no meio de indução de embriogénese não foi homogénea. Alguns explantes (ca. de 24%) sofreram uma oxidação acentuada e, em alguns casos, verificou-se a formação de raízes adventícias (ca. de 29%), geralmente formadas a partir da nervura central da folha ou em locais onde foram realizados pequenos ferimentos (Figura 15 A). Apesar disso, na maioria dos casos ocorreu a formação de uma massa calosa (ca. de 62%), durante o primeiro mês em cultura (Figura 15 B). Em alguns explantes, apesar da formação de raízes adventícias, desenvolveu-se também calo. No final do segundo mês em cultura e durante o terceiro e último mês formaram-se embriões na superfície de alguns calos (Figura 15 B).

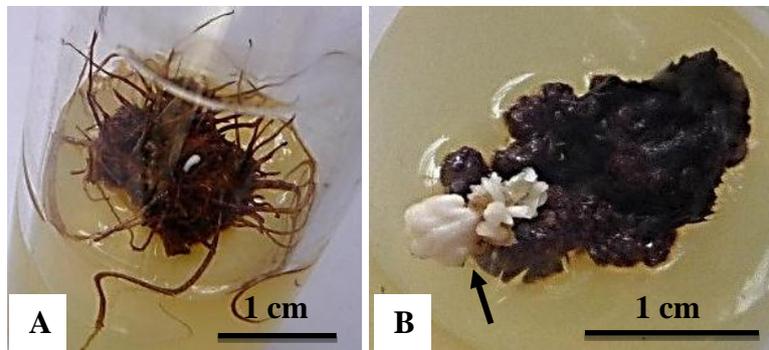


Figura 15. Aspectos da indução de embriogénese somática em medronheiro a partir de folhas de medronheiro. (A) Formação de raízes adventícias. (B) Embriões formados à superfície do calo (seta).

Neste ensaio, avaliou-se a resposta embriogénica de distintos genótipos. O clone Al 7 foi o que mostrou uma percentagem de indução maior, ultrapassando os 60% (Tabela 4). A percentagem de indução dos restantes clones foi bastante mais baixa, rondando os 20%, com o clone P a apresentar uma percentagem de indução intermédia, próxima dos 40%. Apesar da aparente diferença entre os vários clones utilizados neste ensaio, não se verificaram diferenças estatísticas significativas entre as percentagens de indução. No que diz respeito ao número de embriões somáticos formados por explante, verificou-se no clone AL 7 um valor médio mais elevado em relação aos restantes clones (3,78). Nos outros clones formaram-se, em média, 0,94 a 1,66 embriões por cada explante (Tabela 4).

RESULTADOS

Tabela 4. Percentagem de indução de embriogénese somática e número médio de embriões formados por explante, em seis clones distintos de medronheiro. Cada valor é a média em percentagem, e o respectivo desvio padrão, das três réplicas.

Genótipo	AL 1	AL 7	C 1	ESAC 5	P	SB
% Indução	24,07 ± 25,05	62,22 ± 3,85	24,67 ± 11,80	22,02 ± 8,44	39,05 ± 33,85	19,05 ± 32,99
Nº Médio de Embriões por Explante	0,94 ± 1,23	3,78 ± 4,85	1,66 ± 0,68	1,60 ± 1,27	1,24 ± 1,57	1,05 ± 1,81

Relativamente aos estádios de desenvolvimento dos embriões, não se verificou sincronismo, pelo que foi possível encontrar num mesmo explante embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. Os embriões somáticos formados passavam pelos estádios de desenvolvimento característicos: globular, cordiforme, torpeda e cotiledonar (Figura 16).

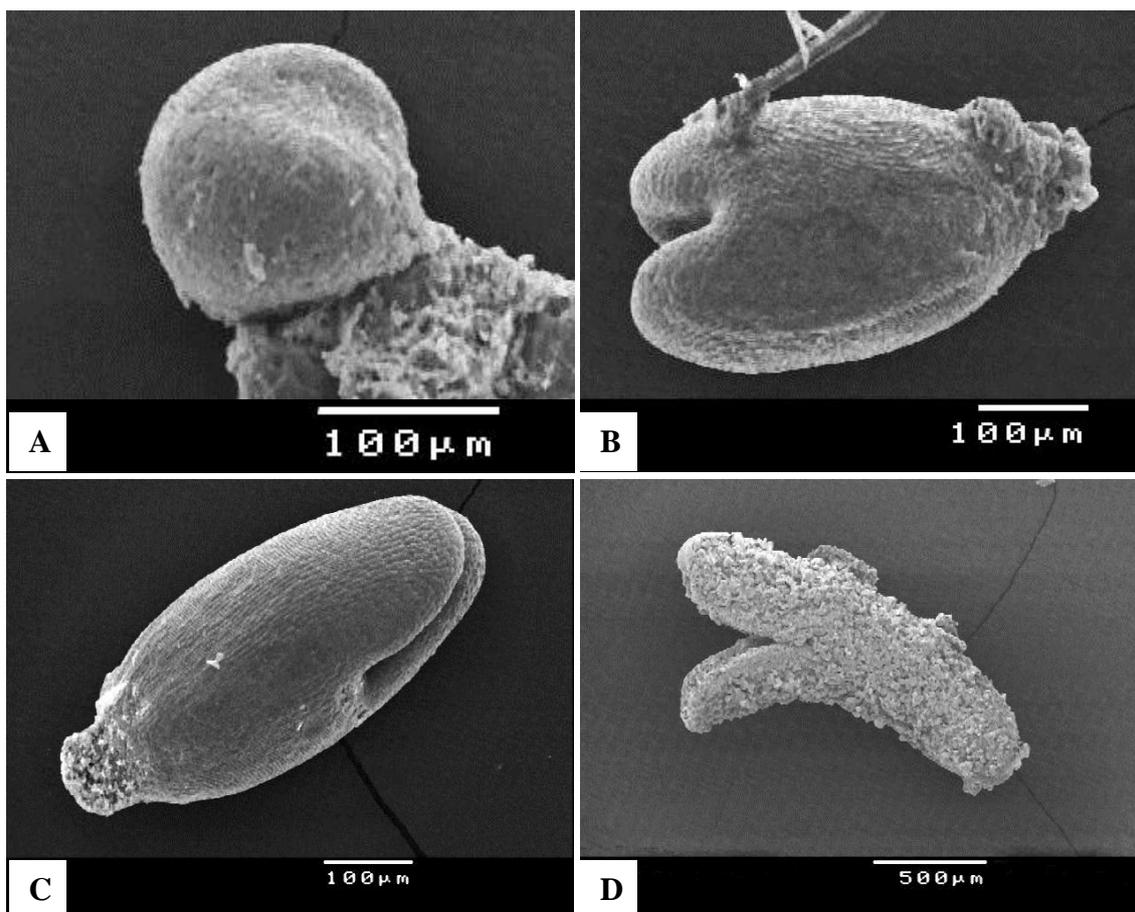


Figura 16. Embriões somáticos de medronheiro em diferentes estádios de desenvolvimento observados no microscópio electrónico de varrimento. (A) Estado globular. (B) Estado cordiforme. (C) Estado torpeda. (D) Estado cotiledonar.

No final dos três meses em cultura, o estágio globular era predominante (Figura 17). Apesar de a maioria dos embriões apresentarem morfologia normal, em 28,89% dos embriões formados foi observado algum tipo de anomalia (Figura 17). Assim, observaram-se embriões fundidos ou com um número anormal de cotilédones (Figura 18), bem como embriões precocemente germinados.

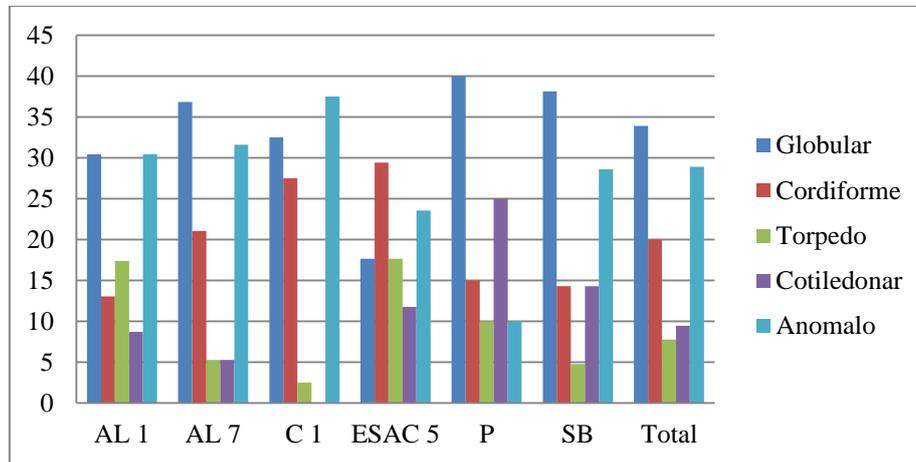


Figura 17. Percentagens dos diversos estados de desenvolvimento de embriões somáticos, formados em diferentes genótipos.

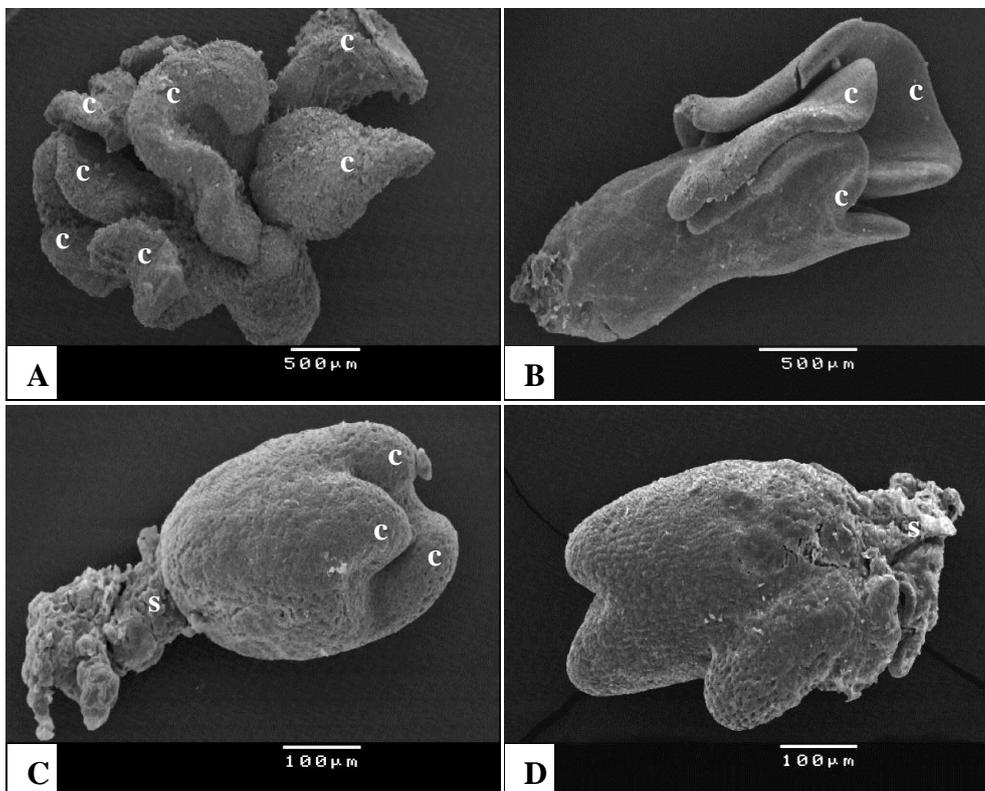


Figura 18. Embriões somáticos anómalos observados no microscópio electrónico de varrimento. (A) Embrião com sete cotilédones. (B) Embrião com três cotilédones. (C) Embrião com três cotilédones. (D) Fusão de dois embriões. (c: cotilédone; s: suspensor)

A análise microscópica de secções dos embriões mostrou que, no estado globular, os embriões são mais ou menos esféricos, especialmente os menos desenvolvidos. Embriões mais desenvolvidos tendem a tornar-se mais alongados, apresentando uma região periférica mais ou menos extensa onde as células se apresentam preenchidas com um material muito corável pelo azul de toluidina e se dispõem de um modo frouxo e desordenado (Figura 19 A e B). Na região periférica oposta, as células, com um ou mais vacúolos contendo um material de aspecto semelhante, surgem mais justapostas e alongadas tangencialmente, constituindo camadas celulares mais definidas (Figura 19 C). Na região mais interior do embrião, as células apresentam uma constituição semelhante, mas são maiores e mais circulares e possuem maiores espaços entre elas (Figura 19 D).

No estado cordiforme (Figura 19 E), foi possível observar a zona dos tecidos condutores e células mais periféricas de contorno arredondado, preenchidas com um material semelhante ao do estágio anterior. A zona de ligação do embrião ao explante, localizada no extremo oposto ao dos cotilédones, é identificada por um conjunto de células mais desorganizadas e menos bem preservadas (Figura 19 G). Na região mais interna, as células são mais tabulares e justapostas e orientam-se radialmente (Figura 19 F).

No estado torpedo os embriões surgem mais alongados (Figura 20 A) com os cotilédones já mais desenvolvidos e evidentes (Figura 20 C). Comparativamente ao estado anterior, a acumulação de reservas nas suas células parece acentuar-se, com o aparecimento de um número variável daquilo que parecem ser vacúolos proteicos (Figura 20 B). Em secção transversal, o hipocótilo mostra um conjunto de células relativamente homogêneas (Figura 20 D), apresentando uma protoderme bem definida à periferia (Figura 20 E) e a presença de tecidos condutores na zona central (Figura 20 F).

No estado cotiledonar verificou-se dimorfismo em termos do desenvolvimento dos cotilédones (Figura 21 A). Enquanto a zona de transição hipocótilo-cotilédones tem um formato ovalado (Figura 21 B) a zona do hipocótilo apresenta uma forma circular (Figura 21 D). No estado cotiledonar, é evidente a grande quantidade de substâncias de reserva acumuladas, bem como a presença de uma epiderme bem definida (Figura 21 E). Verificou-se também a presença de tecidos condutores, quer ao nível do hipocótilo quer ao nível dos cotilédones (Figura 21 A e E).

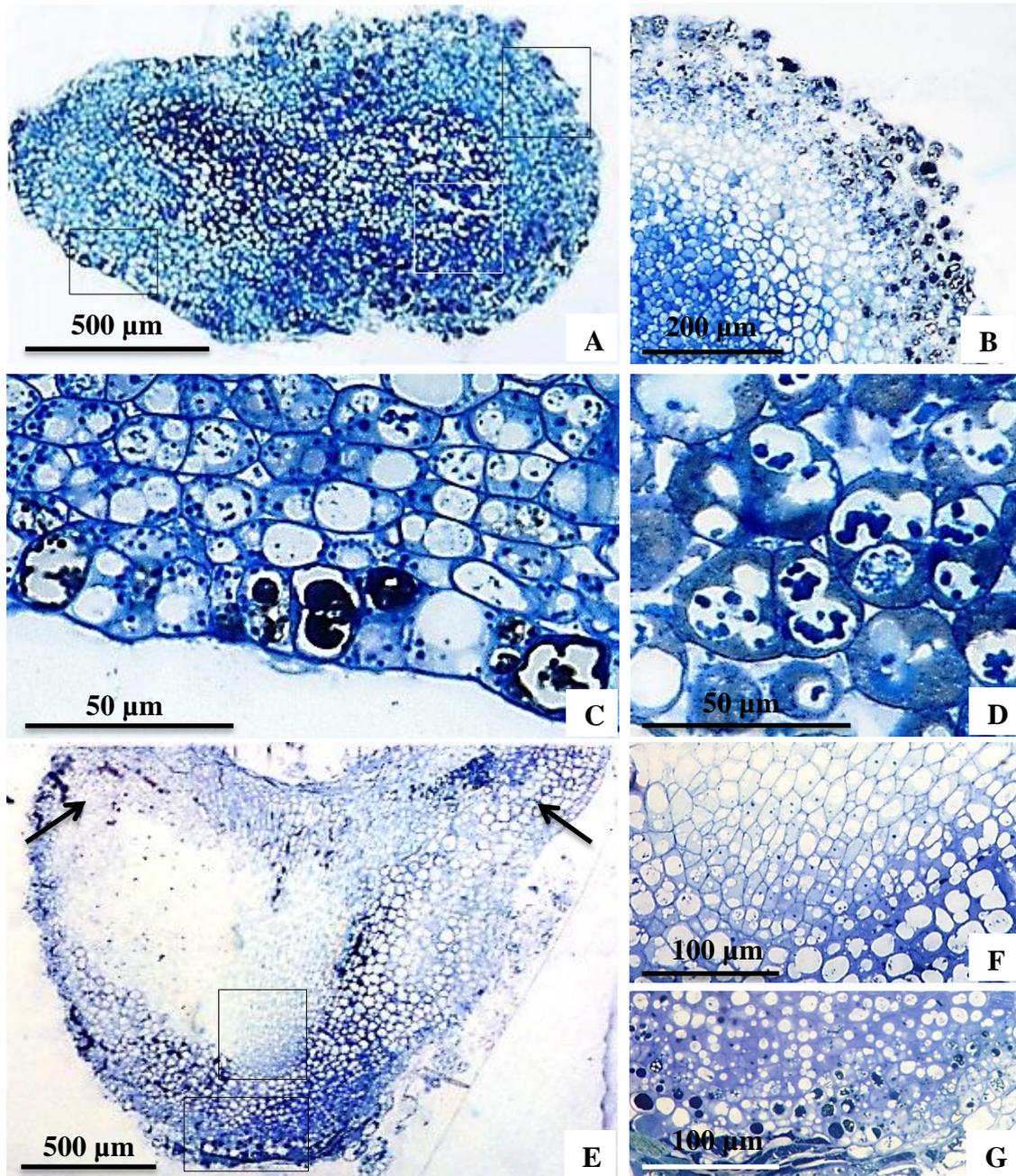


Figura 19. Microfotografias ópticas de seções de embriões somáticos de medronheiro coradas com azul de toluidina. (A) Secção longitudinal de um embrião no estado globular. (B) Pormenor da região periférica delimitada em A onde é visível um conjunto de células desordenadas, preenchidas com material intensamente corado. (C) Pormenor da região delimitada em A mostrando uma protoderme bem definida e as camadas celulares subjacentes bem organizadas (D) Pormenor da região delimitada em A mostrando células vacuolizadas, mais ou menos circulares, com espaços relativamente grandes entre elas. (E) Secção longitudinal de um embrião no estado cordiforme, mostrando a emergência dos cotilédones (setas). (F) Pormenor da região delimitada em E, mostrando os tecidos condutores em corte longitudinal. (G) Pomenor da região delimitada em E, mostrando a zona periférica do embrião com substâncias de reserva acumuladas.

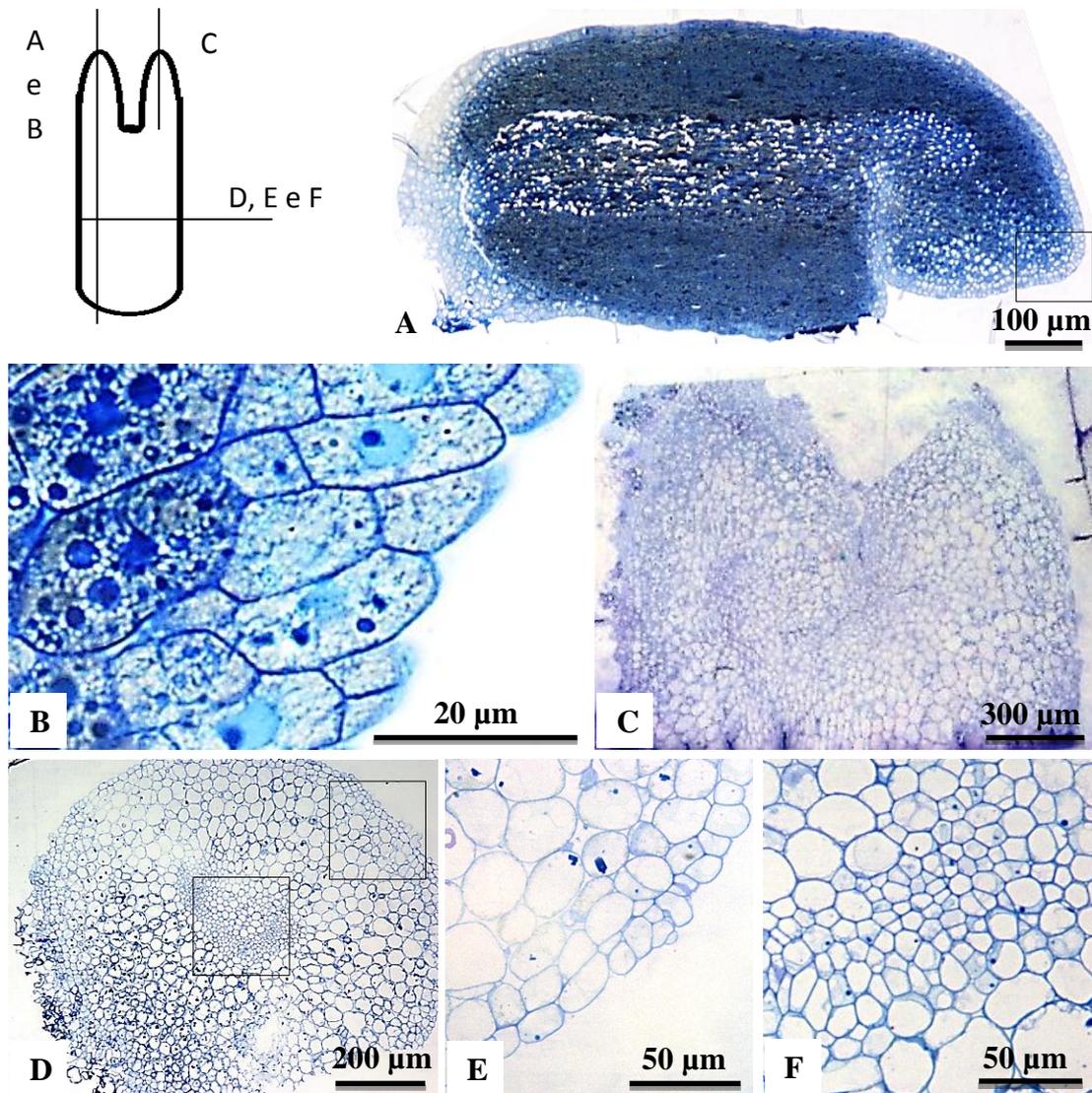


Figura 20. Microfotografias ópticas de secções de embriões somáticos de medronheiro coradas com azul de toluidina. (A) Secção longitudinal de um embrião no estado torpedo, com forma alongada. (B) Pormenor da zona delimitada em A onde é visível a diferenciação da protoderme e acumulação de substâncias de reserva na zona mais interna. (C) Secção longitudinal da zona dos cotilédones. (D) Secção transversal do hipocótilo, com forma circular. (E) Pormenor da região delimitada em D mostrando a protoderme bem definida. (F) Pormenor da zona delimitada em D onde é possível observar os tecidos condutores na zona central do hipocótilo.

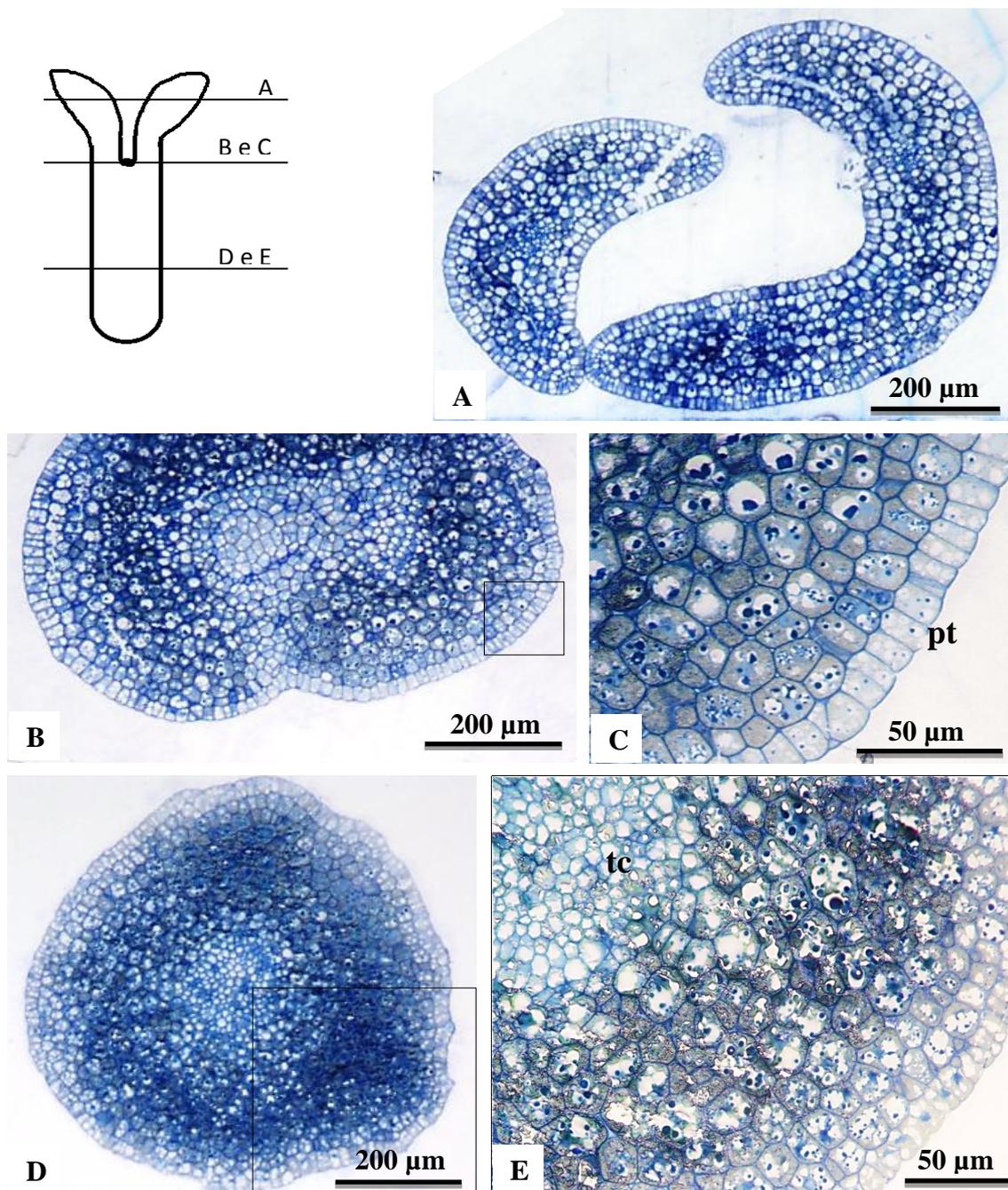


Figura 21. Microfotografias ópticas de secções de embriões somáticos de medronheiro coradas com azul de toluidina. (A) Secção transversal de um embrião no estado cotiledonar, na zona dos cotilédones. (B) Secção transversal da zona de transição hipocótilo-cotilédones, com um formato ovalado. (C) Pormenor da zona delimitada em B onde é visível a acumulação de substâncias de reserva e uma protoderme bem definida. (D) Secção transversal da zona do hipocótilo, com forma circular. (E) Pormenor da região delimitada em E mostrando os tecidos condutores e a acumulação de substâncias de reserva na zona do hipocótilo. (pt: protoderme; tc: tecidos condutores).

Nos ensaios de indução de embriogênese somática em que foram utilizados embriões zigóticos como explantes, todos os embriões inoculados em meio de cultura exibiram algum tipo de resposta (formação de calos), mas não se verificou a formação de embriões. No primeiro ensaio realizado, os embriões zigóticos originaram calos, de aspecto homogêneo e cor acinzentada. Este aspecto dos calos manteve-se ao longo de toda a cultura, mesmo após as várias alterações provocadas no meio de cultura. No entanto, quando os calos foram colocados em cultura num meio com cinetina, verificaram-se algumas modificações. Em alguns calos, formaram-se estruturas globosas na superfície, bem como estruturas alongadas semelhantes a raízes (Figura 22 A). Noutros casos, o calo adquiriu um aspecto friável e a cor alterou-se em algumas zonas, passando a amarelo vivo (Figura 22 B). Em todos os calos formados, o crescimento ocorreu de forma lenta. O esmagamento em carmim acético de uma porção de calo mostrou que, apesar de algumas das células constituintes apresentarem um contorno arredondado, a maioria delas era bastante alongada (Figura 22 C). Num segundo ensaio realizado, os embriões responderam de forma semelhante, sem que tivesse ocorrido a diferenciação de qualquer estrutura com capacidade embriogénica. No entanto, o calo formado apresentava uma tonalidade esbranquiçada (Figura 22 D), tendo o seu crescimento ocorrido de forma igualmente lenta.

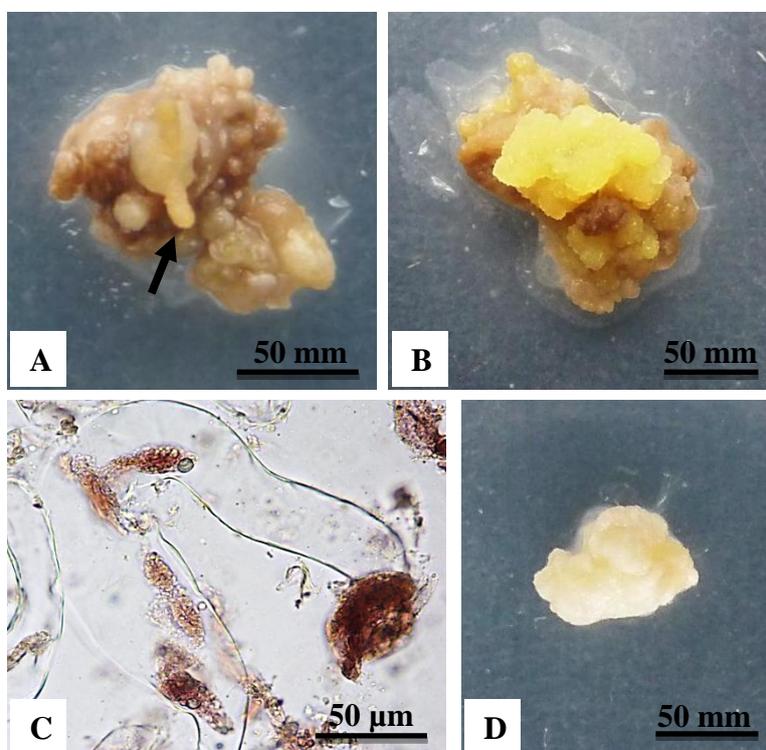


Figura 22. Calos resultantes da cultura de embriões zigóticos maduros de medronheiro. (A) Calo, mostrando estruturas globosas e alongadas (seta). (B) Calo com aspecto friável. (C) Célula com aspecto alongado proveniente do calo mostrado em A. (D) Calo de aspecto esbranquiçado homogêneo.

3.1.3. Organogénesse

Algumas plantas de medronheiro a crescer *in vitro* revelaram dois tipos de organogénesse: formação de rebentos a partir do caule e formação de rebentos a partir de um calo previamente formado, onde se diferenciaram pequenas gemas. Em ambos os casos, o processo ocorreu de forma espontânea, quando as plantas se encontravam no meio de cultura usado para a sua multiplicação.

No primeiro caso verificou-se uma proliferação de rebentos, em número variável, geralmente na zona do explante que se encontrava em contacto directo com o meio de cultura (Figura 23 A). Os rebentos cresciam de forma rápida, formando por vezes um aglomerado em volta da planta que os originou. Alguns dos rebentos formados, por estarem confinados a um espaço restrito, acabavam mesmo por crescer completamente dentro do próprio meio de cultura. No entanto, apesar da formação destes aglomerados, o explante original era quase sempre distinguível, por apresentar um comprimento maior (Figura 23 B e C).

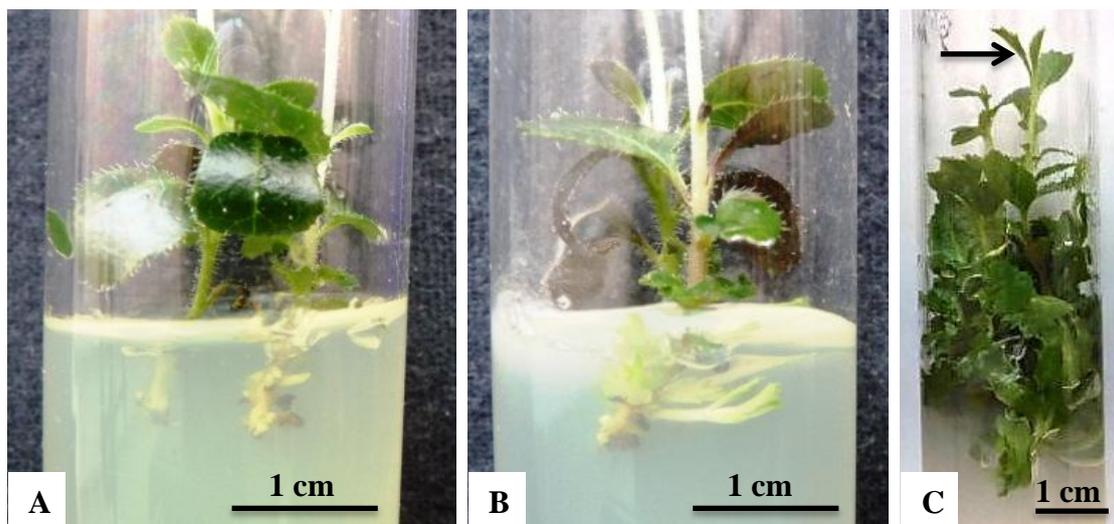


Figura 23. Formação de rebentos em plantas de medronheiro, por um processo de organogénesse. (A) Formação dos rebentos a partir do caule. (B) Alongamento dos rebentos. (C) Formação de um aglomerado de plantas onde é visível a planta-mãe (seta).

Neste primeiro tipo de organogénesse, procurou avaliar-se possíveis diferenças entre genótipos no que respeita ao número de plantas formado. Nos três genótipos testados, o número de plantas formado por explante variou entre uma e três plantas. O clone SB foi o que apresentou, em média, maior número de plantas por explante, muito embora a análise estatística não tenha revelado diferenças significativas entre os três

genótipos testados (Tabela 5). Além disso, verificou-se a formação de 15 novos rebentos em alguns dos explantes deste clone.

Tabela 5. Número de plantas formadas por explante em três genótipos distintos. Cada valor é a média, e o respectivo desvio padrão, das três réplicas.

Genótipo	C 1	ESAC 2	SB
Nº Plantas Formadas por Explante	1,89 ± 1,15	1,18 ± 1,23	2,96 ± 3,07

No segundo tipo de organogênese referido, procurou avaliar-se a capacidade de formação de rebentos por parte dos aglomerados de tecidos, em especial as gemas, originados em algumas plantas em cultura. Verificou-se que algumas destas gemas se desenvolvem formando rebentos (Figura 24 A) e que, em alguns casos, se podem formar várias plantas (10-20), tal como acontece com os rebentos descritos atrás. No entanto, não foi possível a multiplicação do calo, já que quando foram seccionados e colocadas em cultura não se desenvolveram, acabando por morrer ao fim de algum tempo. A capacidade de enraizamento das plantas formadas foi testada, tendo-se obtido uma taxa de enraizamento próxima de 100%. As plantas enraizadas apresentavam em média duas raízes e cresceram geralmente um pouco mais de dois cm durante o processo de enraizamento (Figura 25 B; Tabela 6). Após dois meses em substrato, registou-se uma taxa de sobrevivência de 100%.

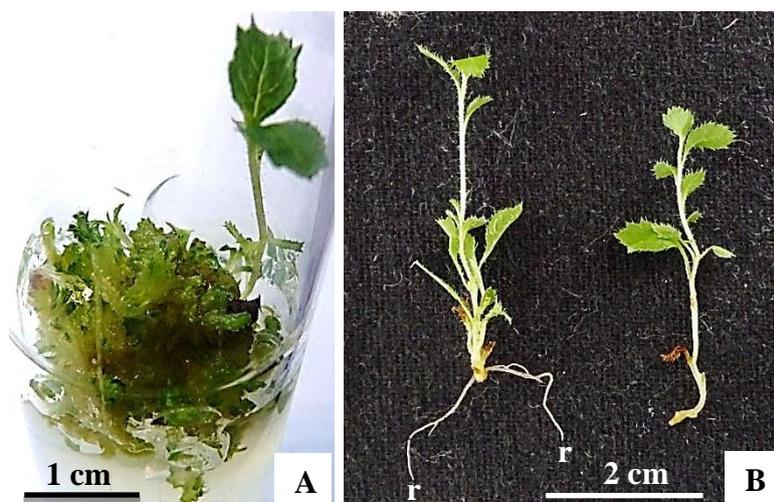


Figura 24. Organogênese em medronheiro. (A) Desenvolvimento de gemas e formação de rebentos. (B) Enraizamento de plantas formadas por organogênese (r: raiz).

Tabela 6. Dados relativos ao enraizamento de plantas de medronheiro obtidas por organogênese. Cada valor é a média, e o respectivo desvio padrão das três réplicas.

Genótipo	Enraizamento (%)	Nº de Raízes	Comprimento da Planta (mm)
HP	96,67 ± 5,77	1,90 ± 0,26	53,40 ± 3,91

3.1.4. Crescimento em meio líquido

Para avaliar o potencial de crescimento de plantas de medronheiro em meio líquido, realizou-se um ensaio com plantas de três genótipos distintos. No final do primeiro mês em cultura verificou-se uma taxa de crescimento e multiplicação muito reduzida. No entanto, quando se repetiu a cultura com estas mesmas plantas verificou-se a formação de uma média de seis plantas por cada explante, no clone HP, não existindo, porém, diferenças estatísticas significativas com o clone ESAC 5, no qual se formaram cerca de quatro plantas (Tabela 7). Apesar da evidente rapidez no crescimento das plantas, verificou-se alguma vitrificação, bem como estiolação dos rebentos. Além disso, o meio é muito rapidamente consumido pelo material em cultura.

Tabela 7. Número de plantas formadas por explante em três clones testados. Cada valor é a média, e o respectivo desvio padrão, das cinco réplicas. Os valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Genótipo	AL 1	ESAC 5	HP
Nº Plantas Formadas por Explante	3,04 ± 0,59 b	4,16 ± 1,88 a, b	6,04 ± 1,24 a

As plantas obtidas por este método foram induzidas a enraizar, mas a percentagem de enraizamento revelou-se muito baixo, e até nula em dois dos clones testados. De todas as plantas testadas, apenas algumas do clone HP foram enraizadas com sucesso. Nos clones AL 1 e ESAC 5 verificou-se um crescimento acentuado das plantas (Tabela 8). Após dois meses em substrato, a taxa de sobrevivência no caso do clone AL 1 foi de 68,8%, no clone HP de 46,2% e no clone ESAC 5 apenas 18,5%. Em algumas plantas sem raiz que foram colocadas em substrato, verificou-se, ao fim de dois meses, a formação de raízes.

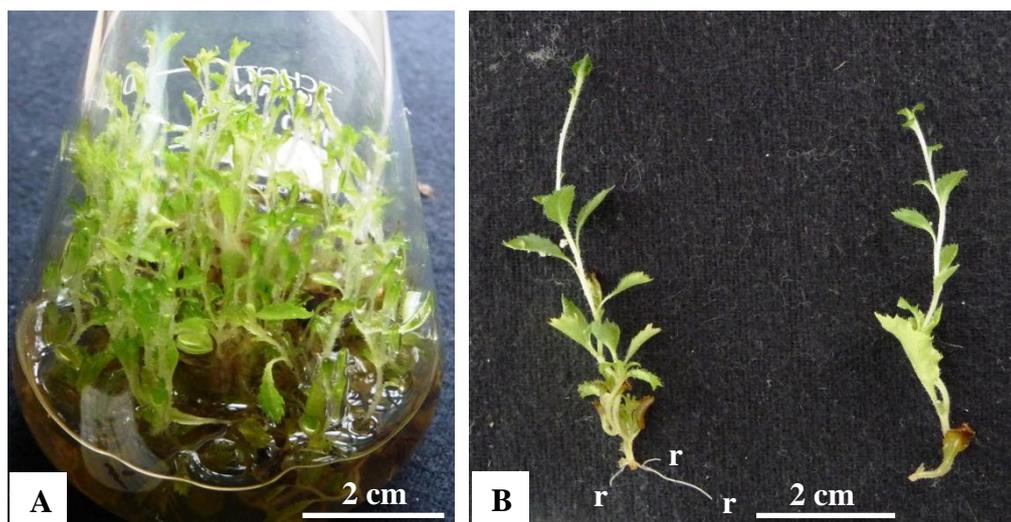


Figura 26. Multiplicação em meio líquido e enraizamento de plantas de medronheiro. (A) Crescimento de plantas em meio líquido. (B) Enraizamento de plantas resultantes do crescimento em meio líquido (r: raiz).

Tabela 8. Dados do enraizamento de plantas de medronheiro obtidas na multiplicação em meio líquido. Cada valor é a média, e o respectivo desvio padrão, das três réplicas. Os valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Genótipo	Enraizamento (%)	Nº Raízes	Comprimento da Planta (mm)
AL 1	0 ± 0 b	0 ± 0 a	$80,96 \pm 3,74$ a
ESAC 5	0 ± 0 b	0 ± 0 a	$86,85 \pm 3,34$ a
HP	$8,44 \pm 5,31$ a	$0,17 \pm 0,46$ a	$65,17 \pm 3,30$ b

3.1.5. Avaliação da variação somaclonal, através de marcadores moleculares (RAPDs), nas plantas propagadas

Na análise realizada, não foram encontradas diferenças entre perfis, o que revela que provavelmente não há diferenças entre a planta-mãe e as plantas clonadas *in vitro* nos três genótipos testados (Figura 27).

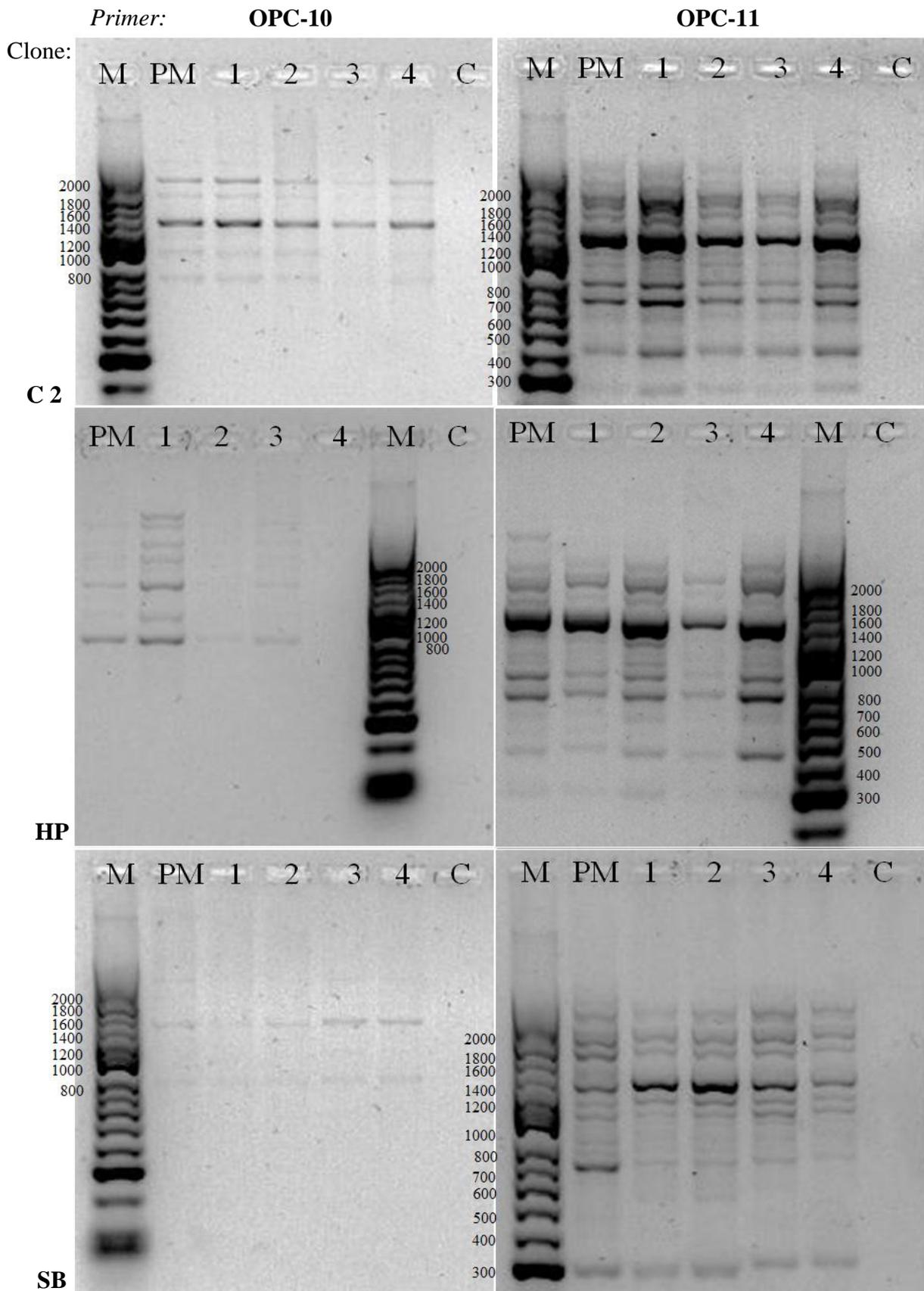


Figura 26. Análise de RAPDs de três clones (C 2, HP e SB), usando dois primers (OPC-10 e OPC-11) (imagem invertida).

3.2. ENSAIOS DE MELHORAMENTO DE MEDRONHEIRO

3.2.1. Polinização artificial

O pólen de *Arbutus unedo* é dispersado na forma de tétradas tetraédricas, de tamanho grande ($D = 42 - 67 (53,8 \pm 3,6) \mu\text{m}$); é um pólen 3-zonocolporado, contorno exterior circular a elíptico em c.o.; as ectoaberturas são colpos longos e estreitos, afectando grãos contíguos, com membrana granulada; as endoaberturas são poros \pm circulares, de contorno regular; a exina é ca $1,5 \mu\text{m}$ espessa, tectada e ligeiramente columelada, com a nexina mais espessa que a sexina; a superfície da exina é psilada (Figura 27).

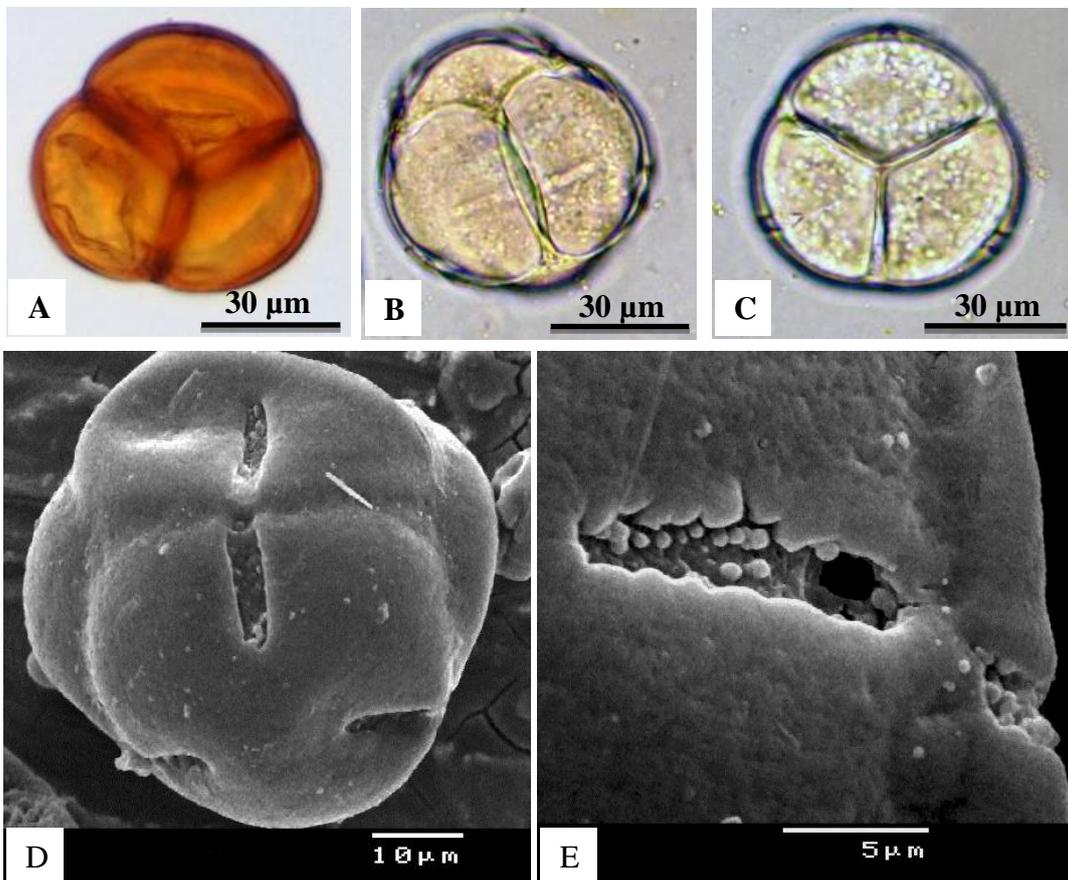


Figura 27. Morfologia do pólen. (A) Tétrada polínica acetolisada. (B) Vista superficial de uma tétrada não acetolisada. (C) Tétrada não acetolisada em c.o. (D) Aspecto geral da tétrada em SEM. (E) Pormenor da abertura.

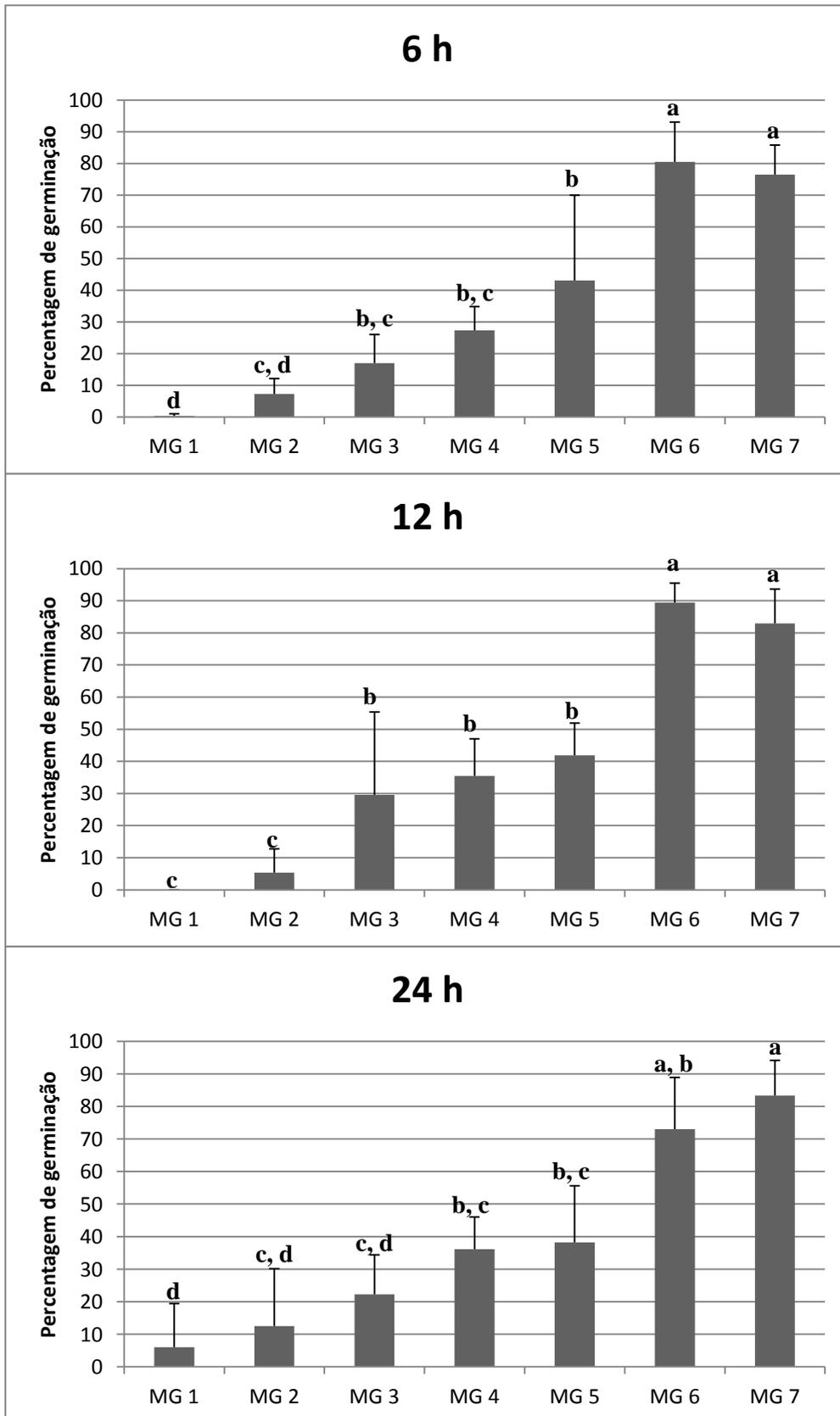


Figura 28. Percentagem de germinação das tétradas polínicas, no final de três períodos de tempo (6, 12 e 24 h), nos diferentes meios de cultura testados. Cada valor é a média em percentagem e o respectivo desvio padrão das cinco réplicas. Os valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Nos ensaios de germinação dos grãos de pólen, para os três períodos de tempo testados verificou-se um aumento da percentagem de germinação directamente proporcional ao aumento da concentração de sacarose no meio de cultura. As maiores percentagens de germinação ocorreram nos dois meios com maior concentração de sacarose, sem que se tenham verificado diferenças estatísticas significativas entre eles. No entanto, nos ensaios de 6 e 12 h houve uma pequena diminuição da percentagem de germinação nos meios com a maior concentração de sacarose. Na maioria das tétradas polínicas apenas um dos grãos de pólen germinou, enquanto num número restrito de tétradas foi possível observar os quatro grãos de pólen germinados (Figura 28).

Na polinização artificial, o objectivo foi a avaliação da germinação *in vitro* e *in vivo* do pólen no estigma (Figura 29 A). Na maioria dos cruzamentos realizados, verificou-se germinação do pólen (Figura 29 B), e o tubo polínico percorria geralmente todo o comprimento do estilete (≈ 5 mm) em cerca de 20-24 h (Figura 29 C). Tal como foi verificado no teste de viabilidade polínica, na maioria das tétradas apenas um dos grãos de pólen germina. No ensaio realizado *in vivo* obteve-se um resultado semelhante, levando à formação de frutos. No ensaio realizado no campo, algumas das flores polinizadas sofreram contaminações fúngicas.

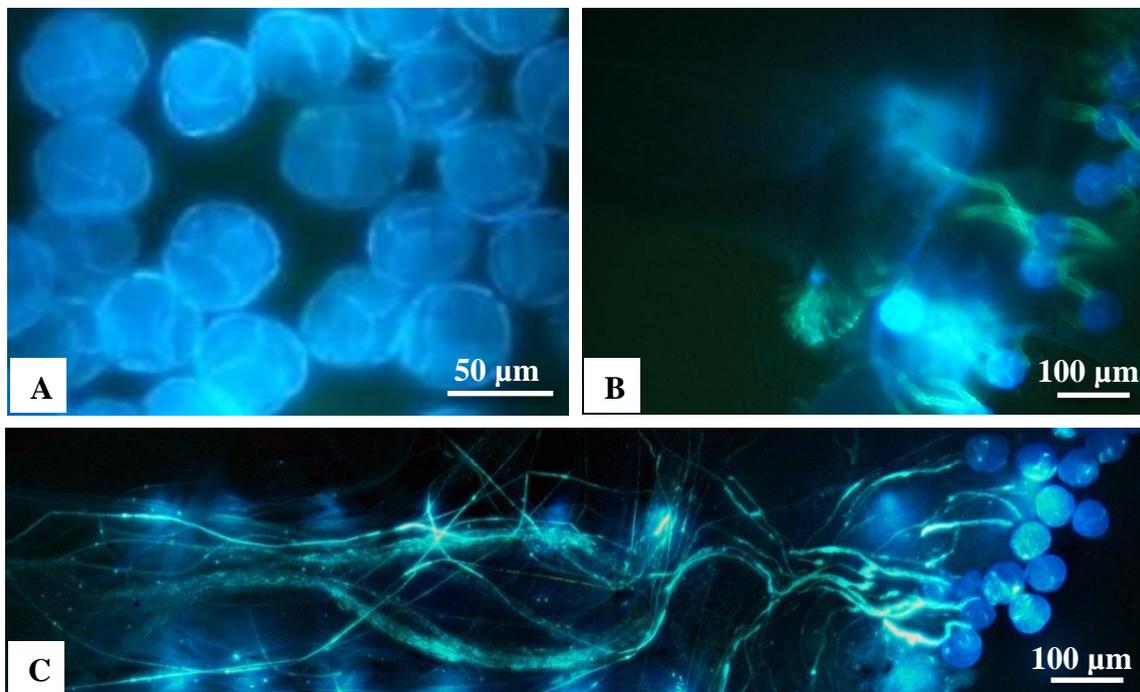


Figura 29. (A) Tétradas polínicas observadas em MEF. (B) Germinação do pólen no estigma. (C) Crescimento do tubo polínico ao longo do estilete.

3.2.2. Ensaios de embriogênese polínica

De forma a identificar o estado de desenvolvimento dos micrósporos mais apropriado para a indução da embriogênese polínica, teve interesse estabelecer uma correlação entre a morfologia da flor e o estado de desenvolvimento dos micrósporos. Para isso, definiram-se cinco estádios de desenvolvimento caracterizados essencialmente pelo tamanho dos botões florais (Figura 30). No estágio de desenvolvimento 1 (ED1) os botões florais possuem ca. 5 mm de comprimento, Figura 30 A), e as anteras apresentam-se alaranjadas, com algumas zonas translúcidas e os filetes ainda muito pouco desenvolvidos, assim como o estilete (Figura 30 B). No estado de desenvolvimento 2 (ED2), a morfologia é semelhante. No entanto, tanto o estilete como os filetes apresentam-se mais desenvolvidos. Verificou-se igualmente que nesta fase o processo de inversão das anteras já se iniciou (Figura 30 C). No estado de desenvolvimento 3, os filetes apresentam um comprimento próximo do seu máximo. As anteras, agora com uma tonalidade mais intensa, completaram já o processo de inversão e desenvolveram pequenos apêndices (Figura 30 D). Nos estados de desenvolvimento 4 e 5, a cor das anteras torna-se mais escura e o comprimento do estilete aumenta ligeiramente (Figura 30 E e F).



Figura 30. (A) botões florais de medronheiro em diferentes estados de desenvolvimento. (B-F) Botões florais desprovidos de pétalas. (B) Botão floral no estado de desenvolvimento 1 (ED 1) mostrando as anteras alaranjadas, e estilete e filetes curtos. (C) Início do processo de inversão das anteras e desenvolvimento do estilete e filetes. (D) ED 3: anteras com uma tonalidade mais intensa. Processo de inversão completo. (E e F) Cor das anteras mais escura e aumento do comprimento do estilete.

A análise microscópica de secções das anteras permitiu verificar que no estado de desenvolvimento 1 (ED1), a primeira mitose polínica já ocorreu, levando à formação de grãos de pólen constituídos por duas células, a célula vegetativa, de maiores dimensões, e a célula generativa, com forma lenticular e posição parietal, na maioria dos casos no centro da tétrada. Nesta fase, as células do tapete mostram já sinais de degenerescência (Figura 31 A e B), acabando por já não serem evidentes no estágio de desenvolvimento 3 (Figura 31 C e D). Na última fase de desenvolvimento (ED5), foi observado um número considerável de tétradas com um ou mais grãos de pólen abortados (Figura 31 E e F).

Nos ensaios de indução de embriogénese polínica não se verificou a formação de embriões em nenhuma das condições testadas. No entanto, em algumas anteras inoculadas no meio EP 1 e EP 2, ocorreu a formação de calo. Das 2800 anteras usadas neste ensaio, apenas em 18 se formou calo (7 no meio EP 1 e 11 no meio EP 2), o que representa uma percentagem de indução muito reduzida (0,6%). O calo formado apresentava um aspecto homogéneo e cor amarela viva (Figura 32 A). E as suas células apresentavam-se, na sua maioria, arredondadas (Figura 32 B).

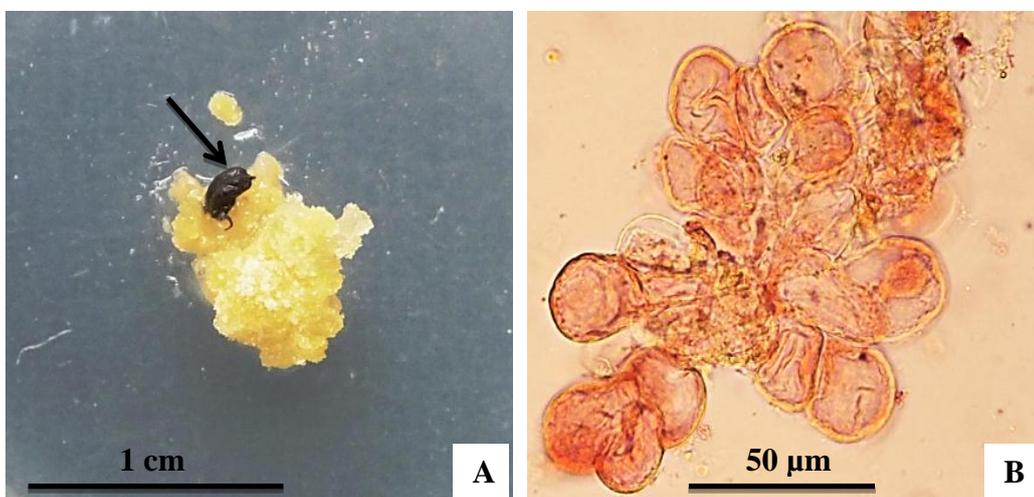


Figura 32. Indução de embriogénese polínica em medronheiro (A) Calo de aspecto homogéneo e cor amarela viva, formado a partir de uma antera que se manteve aparentemente intacta (seta). (B) Esmagamento de uma porção do calo, corado com carmim acético, mostrando a forma arredondada das células.

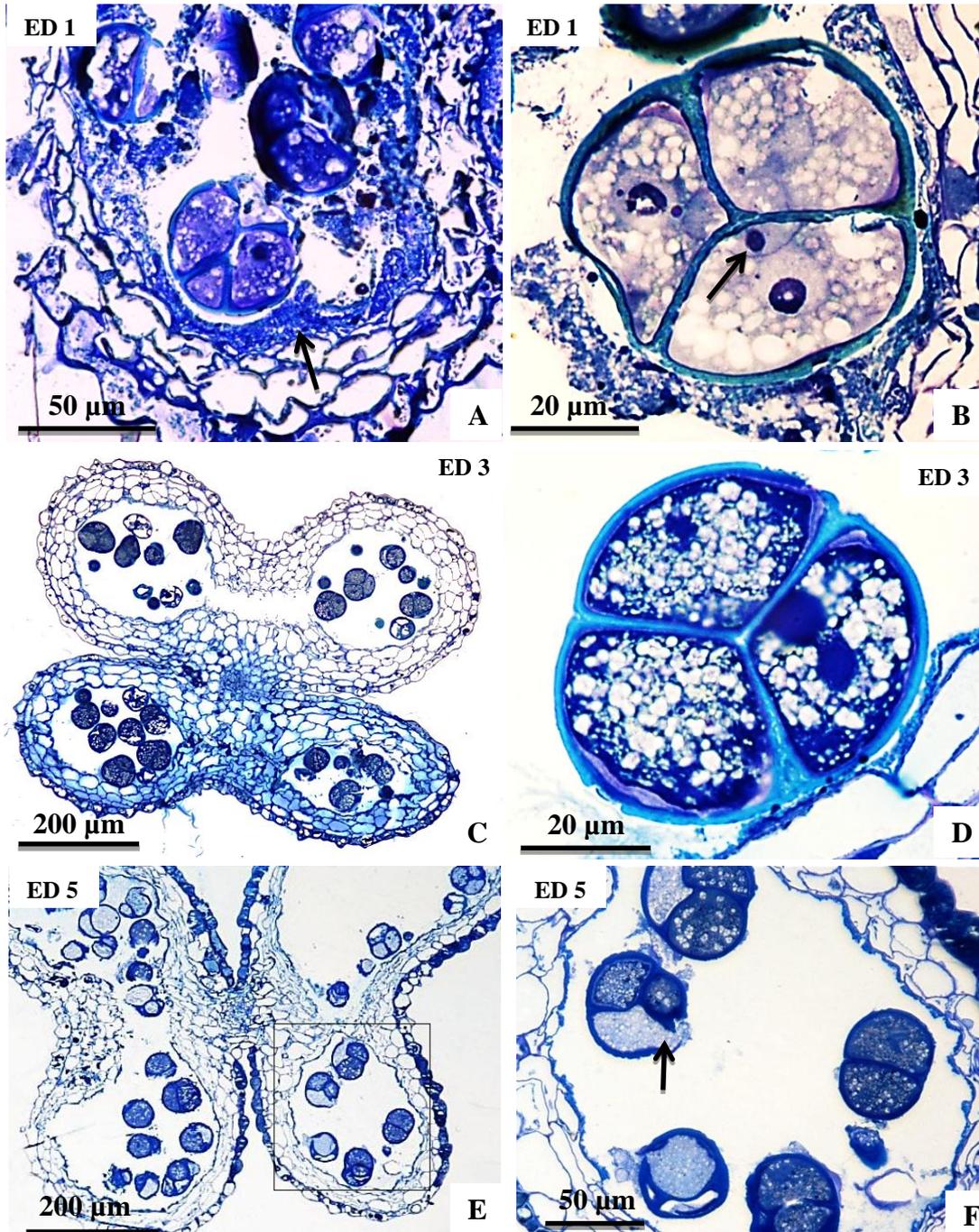


Figura 31. Secções transversais de anteras de medronheiro em três estados de desenvolvimento diferentes. (A) Lóculo da antera com células do tapete degenerescentes (seta). (B) Tétrada polínica com os grãos de pólen constituídos pela célula vegetativa e célula generativa (seta). (C) Aspecto geral da antera no estágio de desenvolvimento 3. (D) Tétrada polínica com os grãos de pólen. (E) Aspecto geral da antera, próxima da deiscência. (F) Pormenor da zona delimitada em E mostrando Tétradas polínicas com grãos de pólen abortados (seta).

3.2.3. Ensaio de poliploidização

No primeiro ensaio de indução de poliplóides, em que foram usadas plantas dos clones P e SB, obteve-se uma taxa de sobrevivência superior no meio sólido, comparativamente ao meio líquido, para ambos os agentes c-mitóticos testados. De uma forma geral, a mortalidade das plantas sujeitas a tratamentos com orizalina foi superior, quando comparada com a mortalidade das plantas em tratamentos com colquicina (Figura 33). Independentemente do tratamento a que foram sujeitas, a maioria das plantas sobreviventes revelou um crescimento mais lento que o normal. Apesar de os ápices das plantas poderem apresentar potencialmente uma ploidia diferente, foram apenas sujeitos a enraizamento os novos rebentos formados, resultantes dos meristemas axilares. Apesar de não terem sido recolhidos dados quantitativos, o desenvolvimento de novos rebentos foi mais acentuado em plantas sujeitas a tratamentos com concentrações mais reduzidas de agente c-mitótico. Em alguns casos, verificou-se a ocorrência de organogénese, tal como descrito na secção 2.1.3.

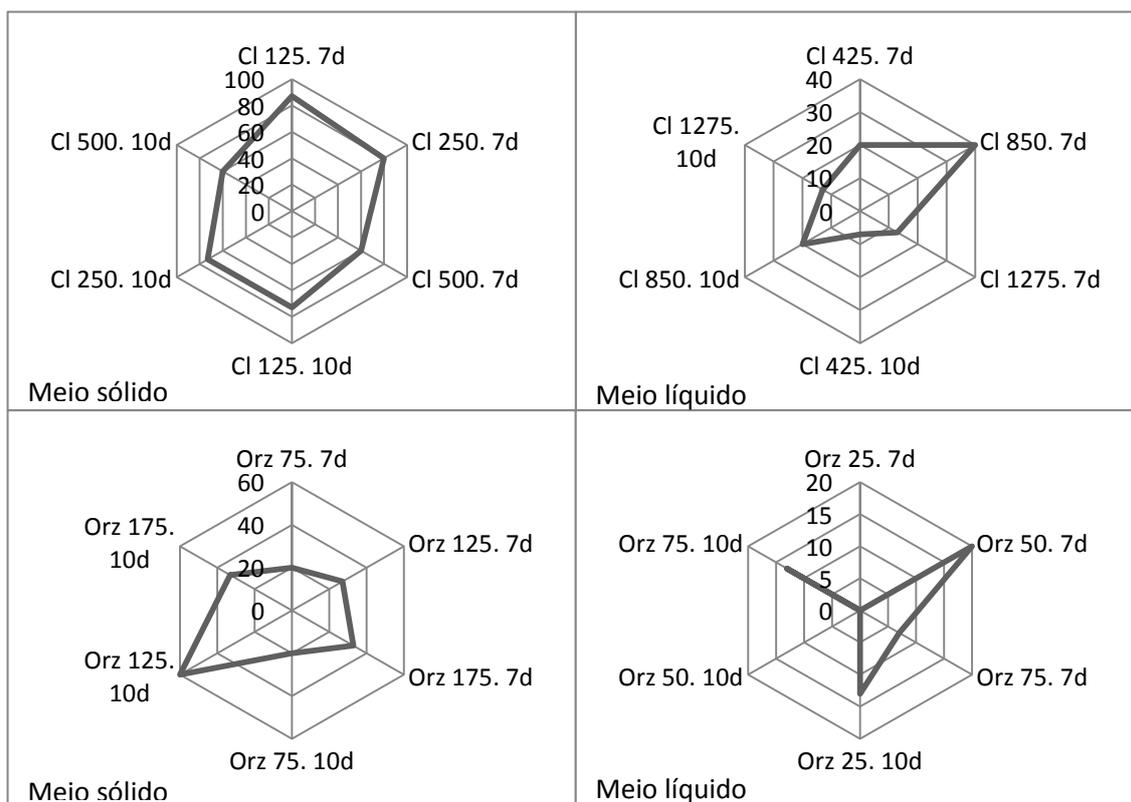


Figura 33. Percentagem de sobrevivência das plantas de medronheiro dos clones P e SB, após tratamentos com colquicina e orizalina. (CI: colquicina; Orz: orizalina; concentrações em μM).

Para enraizamento, usou-se um total de 36 rebentos, 11 dos quais provenientes de plantas sujeitas a tratamentos com orizalina. A percentagem de enraizamento foi de 100%, com um número médio de raízes formadas por explante de 5,6.

No ensaio realizado com o clone C 1, as concentrações dos agentes c-mitóticos foi reduzida, o que fez com que a percentagem de sobrevivência das plantas aumentasse relativamente ao primeiro ensaio realizado, especialmente em meio líquido, onde o tempo de incubação também foi reduzido. No caso dos tratamentos com colquicina em meio sólido, uma vez que se verificou uma percentagem de sobrevivência bastante elevada no primeiro ensaio, usou-se um tratamento com concentração de colquicina maior (1000 μM), que se revelou bastante agressivo para as plantas (Figura 34).

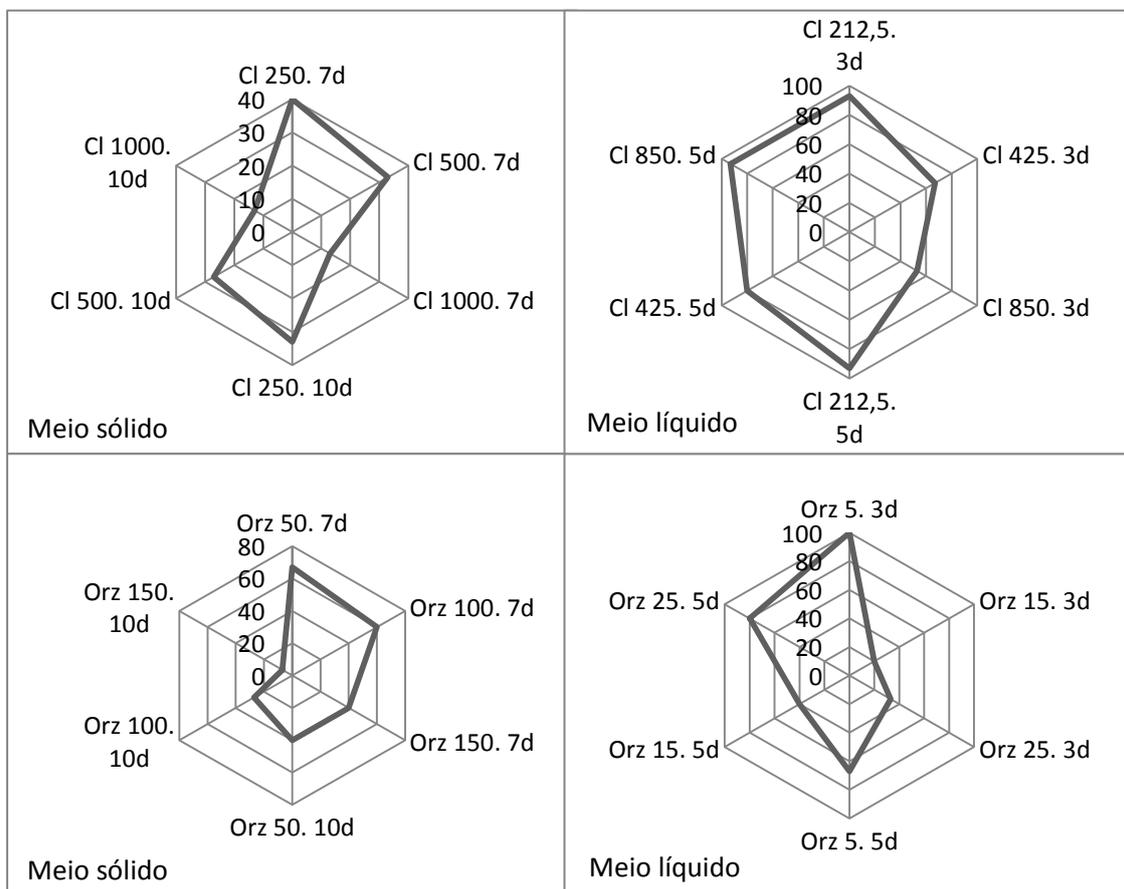


Figura 34. Percentagem de sobrevivência das plantas dos clones P e SB, sujeitas a tratamentos com colquicina e orizalina. (Cl: colquicina; Orz: orizalina; concentrações em μM).

4. DISCUSSÃO



4. DISCUSSÃO

4.1. PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DO MEDRONHEIRO

4.1.1. Germinação de sementes

A propagação de plantas por semente é geralmente um método simples. No entanto, em algumas espécies este é um método pouco viável, devido à inibição da germinação causada pela impermeabilidade da testa, dormência do embrião, ou ambas (Smiris *et al.*, 2006). As espécies de *Arbutus* apresentam dormência da semente (Tilki, 2004; Demirsoy *et al.*, 2010), o que torna este método pouco adequado para a propagação do medronheiro (Ertekin & Kirdar, 2010). Contudo, existem alguns procedimentos para contornar esta dificuldade, como sejam a estratificação, escarificação e aplicação de giberelinas (Tilki, 2004; Demirsoy *et al.*, 2010; Ertekin & Kirdar, 2010). A estratificação usando temperaturas adequadas é um dos procedimentos mais importantes de quebrar este tipo de dormência, resultando em taxas de germinação mais elevadas (Ceccherini *et al.*, 1998; Smiris *et al.*, 2006; Ertekin & Kirdar, 2010).

Em medronheiro foram já levados a cabo diversos estudos, no sentido de aumentar as taxas de germinação das sementes. Smiris *et al.* (2006) conseguiram uma percentagem de germinação próxima de 86% com um tratamento combinado de 24 h em GA₃ (500 ppm) seguido de 3 meses de estratificação a 2-4°C. Num estudo realizado por Tilki (2004), a percentagem de germinação máxima foi de 89% em sementes tratadas com GA₃ (600 mg/L). Neste mesmo estudo, sementes sujeitas a 9 semanas de estratificação, a 4°C, mostraram uma percentagem de germinação de 86%. Ertekin & Kirdar (2010), por sua vez, obtiveram percentagens de germinação de 85% para tratamentos em que foi aplicada estratificação, durante 90 dias a 4°C ou durante 60 dias a 9°C. Demirsoy *et al.* (2010) testaram cinco genótipos diferentes e obtiveram uma percentagem de germinação máxima de ca. de 43%, quando as sementes foram sujeitas a estratificação durante 15 semanas, a 4°C, sem que se tenham verificado diferenças significativas entre os genótipos. No estudo agora realizado, as sementes foram sujeitas a estratificação (4°C) durante períodos variáveis tendo-se obtido percentagens de germinação bastante superiores às obtidas por Demirsoy *et al.* (2010). Nas sementes estratificadas durante 14 dias obteve-se uma percentagem de germinação de 90%

($\pm 7,07$), enquanto naquelas em que o período de estratificação foi superior (21 e 28 dias), a percentagem de germinação foi próxima de 100%. Embora estas percentagens de germinação sejam próximas das obtidas por outros autores (Tilki, 2004; Smiris *et al.*, 2006; Ertekin & Kirdar, 2010), neste caso não se usou qualquer PGR e os períodos de estratificação foram consideravelmente mais curtos. Apesar da fragilidade das plântulas e de, por vezes, se ter verificado um enrolamento do caule e, a aclimatização e crescimento das plântulas não se revelou um problema. A despigmentação observada deveu-se certamente ao facto de as plântulas terem sido mantidas na obscuridade durante um período de tempo prolongado, para recolha de dados.

Apesar de esta técnica não assegurar a manutenção do genótipo nas plantas obtidas, tem grande interesse prático e comercial, por ser relativamente rápida e de fácil execução. No entanto, são necessários estudos mais detalhados, para clarificar a importância e influência do genótipo na germinação das sementes.

4.1.2. Embriogénese somática

A embriogénese somática pode ocorrer de forma directa, verificando-se a formação de embriões directamente do explante, ou de forma indirecta, com a formação prévia de um calo, onde se formam os embriões (Chawla, 2010). No medronheiro, Gomes *et al.* (2009) estabeleceram já um protocolo de indução de embriogénese somática, bem como de conversão de embriões e aclimatização de plantas. No presente trabalho foi aplicado este protocolo tendo-se verificado a ocorrência de embriogénese indirecta, uma vez que ocorre a formação de calo, onde posteriormente se formam os embriões.

Regra geral, os embriões somáticos são semelhantes aos embriões zigóticos e equivalentes em termos funcionais. Após as primeiras divisões, os embriões somáticos passam pelos mesmos estados de desenvolvimento dos embriões zigóticos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, embora muitas vezes com variações relativamente a este padrão geral. No entanto, uma vez que os embriões somáticos não se encontram confinados a um espaço limitado, tendem a apresentar dimensões variadas (Gray, 2005; Canhoto, 2010) ao contrário do que acontece com os embriões zigóticos. A análise morfológica e histológica realizada neste trabalho mostrou que os embriões somáticos de medronheiro passam pelos estados de desenvolvimento típicos descritos para os

embriões zigóticos, muito embora num mesmo explante se possam encontrar embriões em diferentes estados de desenvolvimento e com tamanhos variados. A organização dos embriões somáticos é idêntica à dos embriões zigóticos e, tal como acontece nestes (Canhoto, 2010), a acumulação de reservas parece também neste caso acentuar-se nos embriões no estado torpedo e cotiledonar.

A embriogénese somática é normalmente afectada por diversas variáveis, tais como o genótipo e o estado fisiológico da planta dadora, a composição do meio e as condições de cultura, e o tipo de explante (Gray, 2005; Canhoto, 2010; Chawla, 2010). No presente trabalho testou-se o efeito do genótipo e, apesar da maior capacidade de resposta a estímulos embriogénicos por parte de alguns clones testados, não se verificou qualquer diferença estatisticamente significativa. Este resultado pode dever-se à pouca homogeneidade de resposta por parte dos explantes, causando um desvio padrão bastante elevado. Num estudo futuro deverá utilizar-se um maior número de réplicas.

Em alguns explantes ocorreu a formação de raízes adventícias provavelmente devido à exposição à auxina NAA do meio de cultura. Ainda assim, nalguns destes explantes verificou-se a formação de embriões, o que indica que a formação de raízes adventícias não impede a embriogénese, muito embora possa conduzir à formação de um menor número de embriões. Por outro lado, a grande quantidade de embriões anómalos formados pode estar também relacionada com a composição do meio de cultura. Em estudos futuros, a manipulação do meio de cultura deve ser considerada, de forma a evitar a formação de raízes adventícias e de um número tão elevado de embriões anómalos, bem como a perda da capacidade embriogénica dos calos que, nesta espécie e com o protocolo utilizado, se verifica.

4.1.3. Organogénese

Na cultura *in vitro*, a designação organogénese refere-se à formação de rebentos a partir de meristemas caulinares induzidos de novo (adventícios). Existem dois métodos de organogénese: directa e indirecta. Na organogénese directa formam-se meristemas adventícios directamente a partir do explante e estes, depois de desenvolvidos, originam rebentos caulinares. Na organogénese indirecta, que é mais comum, ocorre a formação de gemas a partir de um calo previamente formado (Schwarz *et al.*, 2005; Chawla, 2010).

No estudo agora realizado verificou-se que algumas plantas de medronheiro a crescer *in vitro*, apresentavam dois tipos de organogênese: formação de rebentos a partir do caule e formação de rebentos a partir de um calo previamente formado, onde se diferenciavam pequenas gemas. Em ambos os casos, o processo ocorreu de forma espontânea após as plantas se encontrarem no meio de cultura usado na sua multiplicação.

No caso da proliferação de rebentos a partir do caule não se verificaram diferenças significativas entre os genótipos testados, muito embora o clone SB, estabelecido a partir de semente, fosse aquele em que este fenómeno se mostrou mais frequente. O facto de não se terem verificado diferenças entre genótipos, tem a ver certamente com o grande desvio padrão obtido, já que apenas algumas plantas mostraram este tipo de resposta. No entanto, Em algumas destas plantas formaram-se 15 novos rebentos, o que mostra o potencial desta técnica como método de propagação.

No medronheiro foi também já observada a capacidade de formação de calo, sem no entanto se ter verificado, nas condições de cultura testadas, a formação de rebentos, mas apenas de folhas morfológicamente anómalas (Gomes *et al.*, 2010). No presente trabalho, observou-se a formação de rebentos a partir do calo formado. A taxa de enraizamento destes rebentos e a percentagem de sobrevivência das plantas originadas a partir deles foram de 100%, pelo que as fases de enraizamento e aclimatização não parecem constituir neste caso factores limitantes à propagação das plantas. No entanto, o facto de o calo se formar de forma espontânea e esporadicamente e de não se ter verificado possível a sua multiplicação, pode limitar o uso desta técnica na propagação desta espécie. Apesar disso, algumas das plantas formadas a partir do calo mantêm a capacidade de elas próprias formarem calo quando colocadas em cultura.

Devido ao seu grande potencial para a propagação em massa, este processo organogénico deve ser alvo de estudos mais detalhados, especialmente no que diz respeito às causas da sua ocorrência, uma vez que se trata de um processo mais frequente em determinados clones, especialmente aqueles provenientes de semente. Assim, as plantas em que ocorre organogênese com maior frequência devem ser seleccionadas, e a indução de novos rebentos deve ser controlada, de forma a ser possível propagar o medronheiro através desta técnica.

Para além disso, uma vez que na organogénese, especialmente na indirecta, existe uma grande possibilidade de ocorrência de variação na constituição cromossómica, a homogeneidade das plantas formadas deve ser testada.

4.1.4. Crescimento de plantas em meio líquido

No ensaio de propagação de plantas de medronheiro em meio líquido, as taxas de multiplicação e sobrevivência obtidas foram bastante reduzidas após o primeiro mês em cultura. No entanto, quando depois deste período de tempo se colocaram novamente estas plantas no mesmo meio de cultura, as taxas de multiplicação e sobrevivência obtidas foram claramente maiores, o que parece indicar que as plantas necessitam de um período prévio de adaptação às novas condições. Apesar de com esta técnica se verificar um crescimento rápido das plantas, ela apresenta algumas limitações que podem comprometer a sua utilização como método de propagação. A vitrificação das plantas é algo indesejável, sendo aparentemente inevitável com esta técnica, tal como o rápido esgotamento do meio de cultura. Para além disso, a taxa de enraizamento obtida revelou-se muito baixa. É possível que um período de cultura em meio sólido, previamente ao processo de enraizamento, seja benéfico e aumente o enraizamento das plantas. No entanto, verificou-se que algumas plantas sem raiz, colocadas em substrato, sobrevivem e acabam por desenvolver um sistema radicular. Assim, e de forma a aproveitar por completo este método de propagação, esta capacidade dessas plantas deve ser explorada. A capacidade de crescimento em meio líquido e o posterior enraizamento de plantas de outros clones não utilizados neste trabalho, são factores que devem ser também avaliados futuramente.

4.1.5. Avaliação da variação somaclonal, através de marcadores moleculares (RAPDs), nas plantas propagadas

Um dos grandes problemas das culturas *in vitro* é a ocorrência de variação genética nas plantas propagadas (Yuan *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Rathore *et al.*, 2011; Leva & Petruccelli, 2012). A variação somaclonal manifesta-se sob a forma de metilações do DNA, rearranjos nos cromossomas e mutações pontuais, ocorrendo sobretudo em resposta ao stress imposto na planta pelas condições *in vitro* (Kumar *et al.*, 2010). Apesar de a variação somaclonal representar uma fonte de variabilidade que

pode ser vantajosa, de uma forma geral é um acontecimento indesejado, especialmente na micropropagação em larga escala, onde a estabilidade genética deve ser garantida. Por esta razão, é importante testar a homogeneidade genética das plantas regeneradas e identificar as plantas que mantêm estabilidade genética em relação à planta mãe (Heinze & Schmidt, 1995; Jayanthi & Mandal, 2001; Miñano *et al.*, 2009;; Rathore *et al.*, 2011).

Na análise realizada, não se encontraram diferenças entre perfis, o que aponta para a não existência de diferenças entre a planta-mãe e as plantas clonadas *in vitro* nos três clones testados, incluindo o clone HP, onde a ocorrência de organogênese espontânea é mais frequente. No entanto, uma vez que foram testados apenas dois *primers* os resultados, são ainda inconclusivos. De forma a tornar a análise mais completa e conclusiva, deverão ser testados mais *primers* e, se necessário, complementar a análise com resultados obtidos através de, por exemplo, ISSR (Kumar *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Leva & Petruccelli, 2012). Para além disso, será igualmente importante testar a estabilidade genética das plantas obtidas por outras técnicas de propagação, nomeadamente a embriogênese somática e a organogênese.

4.2. ENSAIOS DE MELHORAMENTO EM MEDRONHEIRO

4.2.1. Polinização artificial

A germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico são pré-requisitos para o processo de fertilização e a consequente formação das sementes. Neste sentido, para determinar a viabilidade do pólen e, por conseguinte, a capacidade do pólen realizar a fertilização, é comum recorrer-se a um teste de germinação *in vitro*. A principal limitação deste teste é conseguir-se uma germinação satisfatória. Na maioria das espécies, a germinação *in vitro* do pólen depende da composição do meio de cultura, especialmente a sacarose (Shivanna, 2003). No ensaio realizado, a germinação *in vitro* do pólen revelou-se também dependente da concentração de sacarose, sendo a percentagem de germinação máxima (ca. 90%) obtida com uma concentração de sacarose de 12%. Numa concentração superior, verificou-se um ligeiro decréscimo na germinação. Na maioria das tétradas polínicas apenas um dos grãos de pólen germinou. Este resultado já era esperado, uma vez que na análise histológica das anteras foi observado um grande número de grãos de pólen abortados.

Nos ensaios de polinização verificou-se a germinação do pólen na maioria dos ensaios realizados, independentemente de as flores terem sido polinizadas com pólen da mesma flor, de uma outra flor da mesma árvore ou de uma flor de outra árvore. Este resultado era esperado, uma vez que a polinização do medronheiro (na natureza) ocorre por autogamia, anemogamia e entomogamia (Takrouni & Boussaid, 2010). O crescimento dos tubos polínicos ao longo de todo o comprimento do estilete demorou 20-24 h. Nos ensaios realizados no campo, em alguns dos estiletos polinizados verificou-se a formação de frutos, o que abre boas perspectivas para futuros trabalhos de cruzamento entre genótipos.

4.2.2. Embriogénese polínica

A embriogénese polínica, ou androgénese, é uma técnica que permite a obtenção de haplóides através da cultura de anteras e micrósporos (Shivanna, 2003). Os haplóides são de grande interesse e utilidade para o melhoramento vegetal, tendo já sido reportada a sua ocorrência natural em várias espécies, ainda que em frequências demasiado baixas para que sejam utilizados em programas de melhoramento. Nesta técnica existem Vários factores importantes, tais como o genótipo da planta dadora, a composição do meio de cultura, estágio de desenvolvimento dos micrósporos em cultura e o pré-tratamento das anteras (Shivanna, 2003; Reed, 2005; Canhoto, 2010).

Nos ensaios de embriogénese polínica realizados neste trabalho, não se verificou a formação de embriões em nenhuma das condições testadas. No entanto, observou-se a formação de calo em 18 anteras, o que representa uma percentagem de indução de apenas 0,6%. Para além de a capacidade embriogénica ou organogénica do calo formado não estar assegurada, a sua proveniência não foi determinada.

O facto de a formação de calo ter sido o único tipo de resposta observado, pode estar relacionado com a composição do meio de cultura utilizado, nomeadamente em termos de concentração de auxinas.

Tal como sucede com outras espécies (Shivanna, 2003), foi possível estabelecer uma relação entre a morfologia da flor e o estado de desenvolvimento dos micrósporos. Assim, verificou-se que devem ser usadas anteras provenientes de flores com comprimento de ca. de 5 mm ou ligeiramente inferior, pois neste estado de desenvolvimento a primeira mitose polínica acabou de ocorrer. Este facto pode ajudar a

explicar a reduzida taxa de indução obtida, uma vez que é sabido que em muitas espécies o estado de desenvolvimento mais apropriado para a indução da embriogénese polínica é o estado de micrósporo adulto, i.e., pré-mitótico (Shivanna, 2003). Outra explicação para este facto, tem a ver com a eventual libertação de substâncias inibitórias por parte dos tecidos da antera (Shivanna, 2003).

De forma a obter resultados mais conclusivos, a cultura de anteras, ou preferencialmente, de micrósporos, provenientes de flores com o tamanho indicado anteriormente deve ser uma prioridade. No entanto, tal como descrito por vários autores, outras variáveis como a fonte de carbono, o agente gelificante (Shivanna, 2003) e os efeitos do carvão activado (Thomas, 2008) e do genótipo (Zagorska, 1998) podem desempenhar um papel importante e devem por isso ser testadas.

4.2.3. Poliploidização

Embora a maior parte das espécies de plantas seja diplóide, a poliploidia é um fenómeno relativamente comum em plantas. Os poliplóides podem ocorrer espontaneamente na natureza ou serem induzidos artificialmente, utilizando agentes c-mitóticos como a colquicina e a orizalina. A poliploidização é geralmente vantajosa em termos de produção e adaptação das plantas a uma maior variedade de condições (Gepts, 2003). Para além disso, a poliploidização é um método que permite recuperar a fertilidade ou prevenir a esterilidade dos híbridos e ainda produzir triplóides estéreis (Väinölä, 2000; Kanchanapoom & Koarapatchaikul, 2012).

No trabalho realizado, não se avaliou a ploidia das plantas sujeitas a tratamentos com agentes c-mitóticos. Por esta razão, é difícil avaliar o sucesso deste ensaio. No entanto, verificou-se um crescimento mais lento das plantas, o que pode indicar diferenças na sua ploidia (Väinölä, 2000). Ainda assim verificou-se, devido às baixas taxas de sobrevivência obtidas, que os tratamentos com orizalina se revelaram mais agressivos para as plantas, assim como os tratamentos realizados em meio líquido. No entanto, uma vez que o propósito deste tipo de ensaios é exclusivamente a obtenção de plantas com diferente ploidia, a taxa de sobrevivência não é relevante. O enraizamento das plantas obtidas não se revelou um problema, pelo que é essencial agora confirmar a ploidia das plantas. A plóidia dos ápices provenientes dos rebentos sujeitos aos tratamentos pode igualmente ser testada, bem como a dos novos rebentos formados que

ainda não se apresentavam suficientemente desenvolvidos no momento do enraizamento.

Em ensaios futuros, é aconselhável o uso de distintos genótipos, de concentrações intermédias dos agentes c-mitóticos, e de um grande número de plantas.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS



5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em programas de melhoramento, a existência de métodos de propagação eficazes é particularmente importante. Este trabalho ampliou o conhecimento dos métodos de propagação do medronheiro. Estabeleceu-se um protocolo de germinação de sementes eficaz e fácil de aplicar, que pode ser especialmente importante na germinação de sementes híbridas resultantes de cruzamentos específicos. Os resultados dos restantes métodos de propagação estudados, abrem boas perspectivas para a sua aplicação na propagação em massa do medronheiro, apesar das diversas limitações verificadas. A formação de uma grande quantidade de embriões anómalos nos protocolos de embriogénese somática, é ainda um entrave à aplicação desta técnica como um método eficaz de micropropagação do medronheiro. Relativamente à organogénese, trata-se de um processo ainda não completamente manipulável em medronheiro. A dificuldade de enraizamento dos rebentos formados em meio líquido, pode também comprometer o uso desta técnica. Pelas razões referidas, é importante a realização de mais estudos para contornar estas limitações.

Relativamente aos procedimentos de melhoramento, e à embriogénese polínica em concreto, apesar de não se ter observado a formação de embriões, foi estabelecida uma correlação entre a morfologia da flor e o estado de desenvolvimento dos micrósporos, o que no futuro, poderá facilitar as abordagens metodológicas para a realização de trabalhos semelhantes. Apesar de nos ensaios de poliploidização não se ter realizado a avaliação da ploidia das plantas, os resultados obtidos poderão revelar-se úteis em trabalhos futuros, uma vez que foram aplicados vários tratamentos e a taxa de sobrevivência das plantas foi avaliada. Além disso, no caso de algumas plantas apresentarem o nível de ploidia desejado, um estudo de caracterização fenotípica poderá ser realizado. No entanto, os resultados dos ensaios de polinização artificial, são provavelmente os que se revelaram mais interessantes, uma vez que a polinização artificial foi conseguida com sucesso, o que permitirá a realização, num futuro próximo, de um trabalho mais pormenorizado de cruzamento entre genótipos específicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson WC (1984) A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109:343-347
- Barros L, Carvalho AM, Morais J & Ferreira I (2010) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry* 120, 247-254.
- Caligari PDS & Forster BP (2001) *Plant Breeding and Crop Improvement*. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.
- Canhoto JM (2010) *Biotechnology vegetal, da clonagem de plantas à transformação genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Castaldi S, Carfora A, Fiorentino A, Natale A, Messere A, Miglietta M & Cotrufo F (2009) Inhibition of net nitrification activity in a Mediterranean woodland: possible role of chemicals produced by *Arbutus unedo*. *Plant Soil* 315, 273-283.
- Ceccherini L, Raddi S & Andreoli C (1998) The effect of seed stratification on germination of 14 *Cupressus* species. *Seed Science Technology* 26, 159-168.
- Chawla HS (2010) *Introduction to plant biotechnology*. Enfield: Science Publishers.
- Cherchi A, Porcu M, Spanedda L *et al.* (1995) Individuação di parametri utili per la caratterizzazione e la valorizzazione di mieli tipici della Sardegna : asfodelo, cardo e corbezzolo. *La Rivista di scienza dell'alimentazione* 24, 523-534.
- De Fossard RA, Nitsch C, Cresswell RJ, Lee HCM (1974) Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. *New Zealand Journal For Science* 4:267-278
- Demirsoy L, Demirsoy H, Celikel G, Macit I & Ersoy B (2010) Seed treatment with GA₃ or stratification enhances emergence of some strawberry tree genotypes – Short communication. *Horticultural Science*. 37, 34-37.
- Erdtman G (1960) The acetolysis method - a revised description. *Svensk. Bot. Tidskr*, 54, 541-50.

Ertekin M & Kirdar E (2010) Breaking seed dormancy of the strawberry tree (*Arbutus unedo*). International Journal of Agriculture & Biology 12, 57-60.

Gautheret RJ (1959) La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations. Masson, Paris.

Gepts P (2003) Ten Thousand Years of Crop Evolution. In: MJ Chrispeels & DE Sadava (Eds) Plants, Genes and Crop Biotechnology. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers.

Godinho B, Abreu MM & Magalhães MC (2010) Avaliação biogeoquímica dos solos e do medronheiro na área mineira da Panasqueira. Revista de Ciências Agrárias 33, 226-235.

Gomes F & Canhoto JM (2009) Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. In Vitro Cellular & Development Biology Plant 45, 72-82.

Gomes F (2011) Strategies for the improvement of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree): in vitro propagation, mycorrhization and diversity analysis . Dissertação, Universidade de Coimbra.

Gomes F, Lopes ML, Santos T & Canhoto JM (2009) Micropropagation of selected trees of *Arbutus unedo* L. through axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. Acta Horticulturae (ISHS) 839:111-116.

Gomes F, Simões M, Lopes ML & Canhoto JM (2010) Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). New Biotechnology 27, 882-892.

Gratani L & Ghia E (2002) Adaptative strategy at the leaf level of *Arbutus unedo* L. to cope with Mediterranean climate. Flora 197, 275-284.

Gray DJ (2005) Propagation from nonmeristematic tissues: nonzygotic embryogenesis. In: RN Trigiano & DJ Gray (Eds) Plant Development and Biotechnology. Boca Raton: CRC Press

Hall JL (1978) Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells. Elsevier. New York.

.

- Hammami I, Jellali M, Ksontini M & Rejeb MN (2005) Propagation of the strawberry tree through seed (*Arbutus unedo*). International Journal of Agriculture & Biology 7, 457-459
- Heinze B & Schmidt J (1995) Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. Euphytica 85, 341-345.
- Heywood VH (1993) Flowering plants of the world. Oxford University Press.
- Huxley A, Griffiths M & Levy M (1992) The New Royal Horticultural Society Dictionary Gardening. The MacMillam Press Limited, London.
- Jahier J, Chevre AM, Delourme R, Eber F & Tanguy AM (1992) Techniques de cytogénétique végétale. Paris: INRA.
- Jayanthi M & Mandal PK (2001) Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plants in *Tylophora indica* (Burm. F. Merrill.). In Vitro Cellular Development Biology 37, 576-580.
- Kanchanapoom K & Koarapatchaikul K (2012) In vitro induction of tetraploid plants from callus cultures of diploid bananas (*Musa acuminata*, AA group) ‘Kluai Leb Mu Nang’ and ‘Kluai Sa’. Euphytica 183, 111–117.
- Kumar N, Modi AR, Singh AS, Gajera BB, Patel AR, Patel MP & Subhash N (2010) Assessment of genetic fidelity of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by RAPD and ISSR markers assay. Physiology & Molecular Bioogy of Plants 16, 207-213.
- Leva AR & Petruccelli R (2012) Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. Biologia Plantarum 56, 373-376.
- Liu F, Huang L, Li Y, Reinhoud P, Jongsma MA & Wang C (2011) Shoot organogenesis in leaf explants of *Hydrangea macrophylla* ‘Hyd1’ and assessing genetic stability of regenerants using ISSR markers. Plant Cell Tissue and Organ Culture 104, 111-117.

Martin FW (1958) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 33, 125-128.

Mendes L, 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, 2285-2291.

Mereti M, Grigoriadou K & Nanos G (2002) Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Scientia Horticulturae* 93, 143-148.

Metaxas DJ, Syros TD, Yupsanis T, Economou AE (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: 257-266

Miñano HS, González-Benito ME & Martín C (2009) Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in chrysanthemum cultivars using RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 122, 238-243.

Moreno-Jiménez E, Peñalosa JM, Carpena-Ruiz RO & Elvira E (2008) Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere* 71, 466-473.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15:473-497

Piotto B, Bartolini G, Bussotti F, *et al* (2001) Schede informative sulla propagaione per seme degli alberi e degli arbusti più diffusi della flora mediterranea. *In*: Piotto B, Noi A (eds) Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea, Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali, Manuale ANPA (Agenz. Naz. per la Protezione dell'Ambiente), 32-38. ISBN 88-448-0271-6

Prada MA, Arizpe D (2008) Riparian tree and shrub propagation handbook. Valencia pp. 27-29 ISBN 978-84-482-4965-6

Rathore MS, Chikara J, Mastan SG, Rahman H, Anand KGV & Shekhawat NS (2011) Assessment of genetic stability and instability of tissue culture-propagated plantlets of *Aloe vera* L. by RAPD and ISSR markers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165, 1356-1365.

- Reed SM (2005) Haploid Cultures. In: RN Trigiano & DJ Gray (Eds) Plant Development and Biotechnology. Boca Raton: CRC Press.
- Rosalba V (1982) Ricerche sulla biologia di *Arbutus unedo* L. (Ericaceae): ciclo di sviluppo. Bollettino della Società sarda di scienze naturali 21, 309-317.
- Schwarz OJ, Sharma AR & Beaty RM (2005) Propagation from Nonmeristematic Tissues: Organogenesis. In: RN Trigiano & DJ Gray (Eds) Plant Development and Biotechnology. Boca Raton: CRC Press.
- Shivanna KR (2003) Pollen Biology and Biotechnology. Enfield: Science Publishers, Inc.
- Silva J (2007) Árvores e Florestas de Portugal Vol. V, Floresta e Sociedade. Público pp 143-145 ISBN 978-989-619-102-3
- Slater A, Scott N & Fowler M (2008) Plant biotechnology – the genetic manipulation of plants. Oxford: Oxford University Press.
- Smiris P, Pipinis E, Aslanidou M, Mavrokordopoulou O, Milios E & Kouridakis A (2006) Germination study on *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) and *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. (Fabaceae). Journal of Biological Research 5, 85-91.
- Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research 26, 31-43.
- Stevens PF (2001) Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008 <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acedido em: 22-04-2012.
- Taji A, Kumar P & Lakshmanan (2002) In vitro plant breeding. Binghamton, NY: The Haworth Press, Inc.
- Takrouni MM & Boussaid M (2010) Genetic diversity and population's structure in Tunisian strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). Scientia Horticulturae 126, 330-337.
- Tang Z, Chen D, Song Z, He Y & Cai D (2010) In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 102, 213–220.

Tenhunen JD, Lange OL & Jahner D (1982) The control by atmospheric factors and water stress of midday stomatal closure in *Arbutus unedo* growing in a natural macchia. *Oecologia* 55, 165-169.

Thomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26, 618-631.

Tilki F (2004) Improvement in seed germination of *Arbutus unedo* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7, 1640-1642.

Torres JA, Valle F, Pinto C, García-Fuentes A, Salazar C & Cano E (2002) *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology* 160, 207-223.

Tuberoso C, Bifulco E, Caboni P, Cottiglia F, Cabras P & Floris I (2010) Floral markers of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 384-389.

Underutilized-species, O., 2008. Global Facilitation Unit for Underutilized Species, www.underutilized-species.org/ Jun./2011

Väinölä A (2000) Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica* 112, 239-244.

Webster J & Mota M (2008) Pine wilt disease: global issues, trade and economic impact. In: MM Mota & P Vieira (Eds) *Pine wilt disease: a worldwide threat to forest ecosystems*. Springer.

Yuan XF, Dai ZH, Wang XD & Zhao B (2009) Assessment of genetic stability in tissue-cultured products and seedlings of *Saussurea involucre* by RAPD and ISSR markers. *Biotechnology Letters* 31, 1279-1287.

Zagorska NA, Shtereva A, Dimitrov BD & Kruleva (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) I. Influence of genotype on androgenic ability. *Plant Cell Reports* 17, 968-973.

Ziyyat A & Boussairi E (1998) Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy Research* 12, 110-113

Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M & Benjelloun W (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology* 58, 45–54.

Ziyyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Tahri A, Legssyer A, Hoerter J & Fischmeister R (2002) *Arbutus unedo* induces endothelium-dependent relaxation of the isolated rat aorta. *Phytotherapy Research* 16, 572–575.

