

## Clonagem de plantas selecionadas de medronheiro e a sua avaliação de campo

Filomena Gomes<sup>1</sup>, João Gama<sup>2</sup>, Patrícia Figueiredo<sup>3</sup>, Ana Rita Santos<sup>1,3</sup> e Cláudia João<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico de Coimbra / Escola Superior Agrária de Coimbra, CERNAS, Bencanta, Apartado 7036, 3045-601 Coimbra [fgomes@esac.pt](mailto:fgomes@esac.pt)

<sup>2</sup>Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, 6000-150 Castelo Branco,

<sup>3</sup>GREENCLON, LDA, Rua António Jardim N° 24 R/c D<sup>10</sup> Frente, 3000-035 Coimbra

### Resumo

O medronheiro é uma espécie autóctone que aparece em todo o país desde os 20 a 1000 m de altitude. É tolerante à secura, a solos degradados, a diferentes tipos de rocha-mãe, pH do solo e a condições climáticas muito distintas. Aparece desde o xisto e do Barrocal Algarvio, passando pelo calcário da Arrábida ou Sicó até ao granito no Gerês, estabelecendo associações com diferentes espécies vegetais. A espécie apresenta ainda uma resistência ativa aos incêndios florestais, rebentando de toija após a passagem do incêndio. O conjunto destas características confere ao medronheiro uma capacidade enorme de reagir a diferentes condições de stresse ambiental. No entanto, a tradição da exploração do medronho para a produção de aguardente reside no Algarve. Mas, os tempos mudam, sendo várias as razões. Na Região Centro, a continuidade de coberto vegetal de eucalipto ou pinheiro tem custos graves, como a propagação de pragas e doenças, a ocorrência frequente de incêndios florestais, a redução de rendimentos e a desertificação humana por falta de investimentos e trabalho. Por outro lado, a crise económica despertou nos produtores e em particular em jovens agricultores a vontade de investir na agricultura. O medronheiro é uma espécie que vegeta bem na Região Centro, que cria descontinuidades na biomassa florestal, contribuindo para o aumento da biodiversidade, para a redução da propagação de incêndios florestais e também constitui uma fonte de rendimento. O fruto pode ser utilizado além da produção de aguardente, para consumo em fresco (valor nutritivo e teor em anti-oxidantes do fruto) e ainda para outras utilizações (secagem, muesli, doce). Assim, os produtores pretendem a valorização económica das explorações, recorrendo a uma espécie autóctone e existente no estado selvagem como o medronheiro, instalando pomares, com o objetivo de converter a espécie numa fruteira rentável. No entanto, a variabilidade das plantas é enorme, pois nunca a espécie foi sujeita ao melhoramento mais simples, i.e. à seleção das plantas pela sua capacidade de produção e qualidade do fruto e ainda pela sua adaptabilidade a diferentes regiões de proveniência. Assim, surgiu um forte incremento na procura de plantas melhoradas. Para o melhoramento da espécie e com o apoio da DRAPC e proprietários procedemos: 1) à seleção de plantas adultas pela produção e qualidade do fruto; 2) à análise dos frutos na ESAC, para avaliação da sua qualidade; 3) à sua clonagem por micropropagação e 4) à instalação de ensaios utilizando plantas clonais (CLO) e plantas de origem seminal (SE) com diferentes níveis de adubação. Os resultados apresentados referem-se à colheita de fruto ao fim de 5 anos. Num ensaio instalado em solos de xisto (litossolos e litólicos de xisto), verificou-se que a produção das plantas clonais, instaladas a um compasso de 4x4m, produziram 446 Kg/ha, podendo atingir valores de 597 Kg/ha, quando adubadas à plantação, comparativamente com as plantas de semente que nas mesmas condições produziram 65 ou 50 Kg/ha, com ou sem adubação, respetivamente. No entanto, há a alertar que para manter uma boa produção e qualidade do fruto há que estudar, testar e avaliar os níveis adequados de fertilização.

**Palavras-chave:** *Arbutus unedo*; plantas adultas selecionadas; ensaio clonal; produção fruto



No caso do medronheiro, considerando que a maior fonte de rendimento está associada à produção de fruto para a aguardente foram identificadas como características de seleção, a produção e a qualidade do fruto. A seleção fenotípica das árvores foi feita com base no porte da planta e na produção, considerando a homogeneidade de produção (anos de safra) e a distribuição da produção de fruto (ser concentrada numa dada época para facilidade de colheita). A avaliação da qualidade do fruto foi realizada com base em diversos parâmetros (dimensão dos frutos; peso; dureza; relação calibre/peso; pH; grau Brix; acidez total; açúcares redutores). As análises dos frutos foram realizadas nos Laboratórios de Ciências Agrárias e de Química da ESAC.

### **As técnicas de propagação de plantas selecionadas**

A propagação seminal é importante para o cruzamento de plantas selecionadas. No entanto, não permite manter e multiplicar as características genéticas de uma árvore selecionada ou de árvores de elite (plantas selecionadas, multiplicadas e posteriormente já testadas e avaliadas em ensaios de campo). Só a propagação vegetativa garante a propagação do material selecionado. No medronheiro, a propagação vegetativa por estacaria e enxertia têm mostrado limitações na sua aplicação. Na estacaria, estes resultados estão associados a baixas taxas de sucesso devidas à necessidade de material jovem para propagação, ao período curto de execução (primavera e verão) e à dificuldade de enraizamento de material adulto selecionado (Mereti *et al.*, 2002). A perda do material propagado (o garfo, material vegetal selecionado), devido à ocorrência de incêndios florestais, representa, no caso de propagação por enxertia, um risco acrescido. A micropropagação de plantas adultas selecionadas permite antecipar a idade de frutificação (Preece, 2008). Vários autores referem que a micropropagação *in vitro* é uma técnica para propagação de material de seleção massal (Mereti *et al.*, 2002), em particular de árvores adultas selecionadas pela produção de fruto (Preece, 2008).

### **A micropropagação de plantas adultas selecionadas**

Para obtenção de ganhos a curto prazo, definiu-se como estratégia de propagação, a micropropagação de plantas adultas selecionadas, por ser a única forma de assegurar a seleção por um conjunto de características expressas unicamente na fase adulta, como é a produção de fruto. Os explantes mais jovens, provenientes de semente ou de plantas jovens, são em geral mais fáceis de estabelecer e propagar *in vitro*, no entanto os seus fenótipos / valor comercial é imprevisível (Canhoto, 2010).

O protocolo seguido para a propagação das plantas adultas é apresentado na Fig. 2. Resumidamente são colhidos ramos nas árvores selecionadas, mantidos em condições controladas para abrolhamento de rebentos epicórmicos, que posteriormente são utilizados para o estabelecimento das culturas *in vitro* (Gomes e Canhoto, 2009). A utilização destes rebentos epicórmicos tem diversas vantagens: (a) podem ser induzidos durante todo o ano e não ficam restringidos à primavera, como o processo de estacaria; e (b) o processo de desinfeção é menos agressivo quando comparado com material vegetal colhido no campo, permitindo melhores taxas de sobrevivência e uma redução de contaminações ou necroses (Preece, 2008; Canhoto, 2010). Posteriormente na fase de multiplicação foram identificados os meios de cultura, os reguladores de crescimento mais favoráveis à multiplicação do material vegetal (Gomes *et al.*, 2010). Na fase de enraizamento foi identificada a concentração da auxina mais favorável ao enraizamento em simultâneo com a aclimatização (Figueiredo *et al.*, 2013).



Figura 2 – A seleção e posterior micropropagação de plantas adultas. As diferentes fases de estabelecimento *in vitro*, multiplicação e enraizamento e aclimatização em simultâneo (enraizamento *ex vitro*).

Estão ainda em curso ensaios para o estabelecimento de micorrizas. As micorrizas são associações simbióticas estabelecidas entre fungos e as raízes da maior parte das espécies lenhosas (Molina *et al.*, 1997). Os fungos micorrízicos interferem em diferentes processos, tais como: (a) na promoção do crescimento (através do aumento do volume de solo explorado pelo micélio e conseqüentemente pela assimilação de nutrientes e água); (b) no aumento de tolerância a condições de stresse abiótico (stresse hídrico, solos degradados) e biótico (pragas e doenças); (c) no aumento da infiltração de água e redução de erosão (pela promoção da agregação dos solos, através da produção da glomalina); e particularmente (d) na promoção e antecipação da idade de floração e frutificação (Fortin *et al.*, 2008). Na propagação do medronheiro, o estabelecimento de micorrizas desempenha um papel de grande importância. Contribui para aumentar a sobrevivência, o crescimento, a tolerância a condições de stresse (biótico e abiótico) e pode, ainda, constituir outra fonte de rendimento económico, a produção de cogumelos comestíveis (Parladé *et al.*, 2004). Na micorrização foram avaliados métodos de inoculação das plantas em condições *in vitro* (Gomes *et al.*, 2013), em viveiro e foi instalado um ensaio no campo.

Há ainda a referir que no melhoramento, a diversidade genética da espécie é fundamental. A resposta à seleção depende da variabilidade genética disponível. A longo prazo, deve garantir-se a existência de uma larga base genética para futuras gerações do melhoramento florestal da espécie (White *et al.*, 2007). Na análise da diversidade genética do medronheiro foram identificados 4 microsátélites com um valor de informação polimórfico elevado (Gomes *et al.*, 2013).

### Instalação de ensaios clonais no campo para avaliação dos clones selecionados

Após a propagação das plantas selecionadas há que instalar ensaios, preferencialmente em diferentes regiões ecológicas para: (a) testar e avaliar se as características de seleção (produção e qualidade do fruto) estão realmente associadas ao genótipo, i.e. menos dependentes do meio ambiente ou ainda da interação com este; (b) avaliar o comportamento dos clones em diferentes regiões ecológicas; (c) avaliar o comportamento dos clones (CLO) comparativamente com as plantas de origem seminal (SE); e (d) de acordo com a resposta dos clones em diferentes regiões e da avaliação da interação entre o genótipo e o meio ambiente, alocar os clones, i.e. identificar, prever e selecionar os clones para as diferentes condições ecológicas. Têm vindo a ser instalados diversos ensaios clonais (Fig. 3).

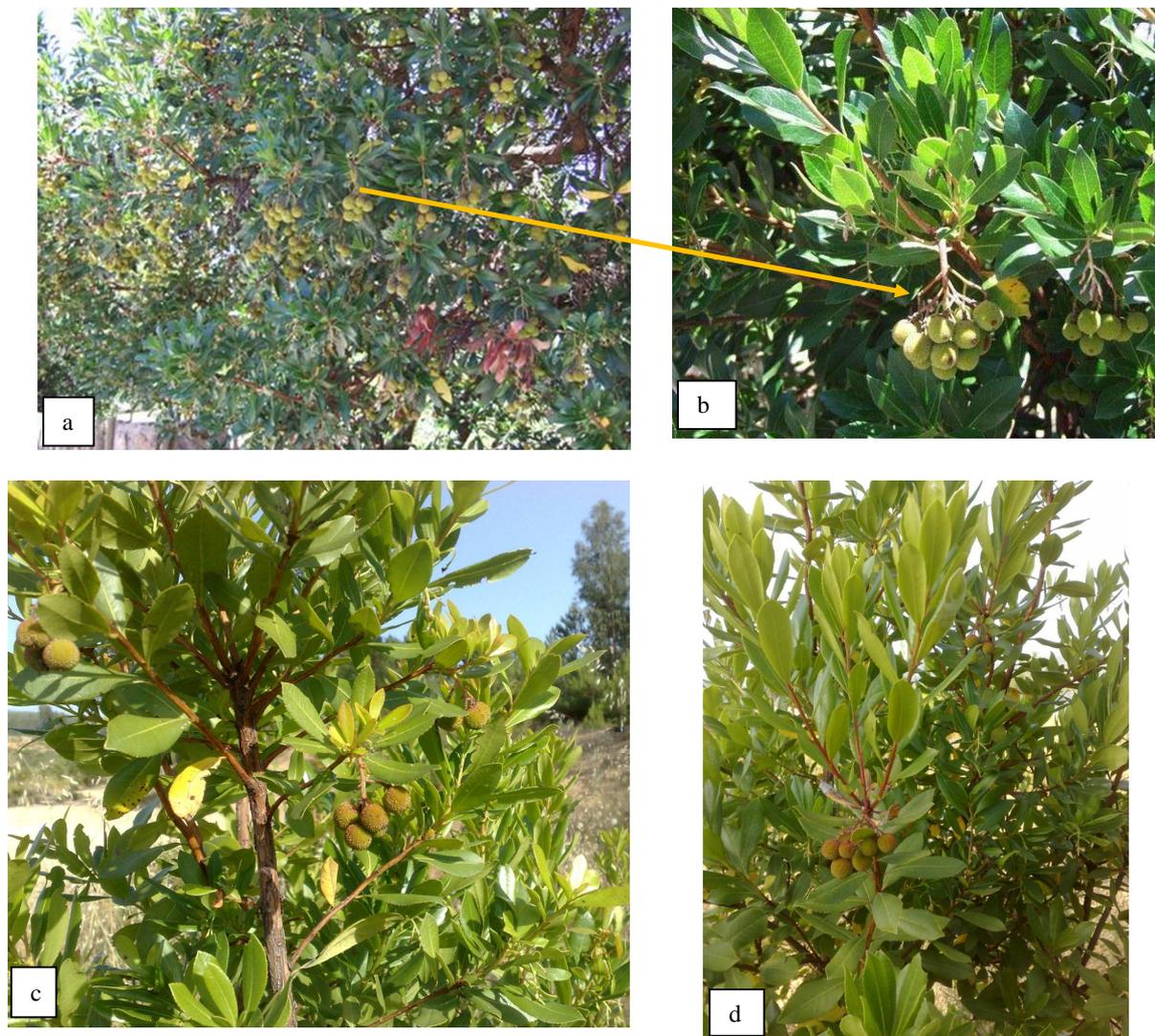


Figura 3 – Planta mãe selecionada clone AL<sub>1</sub> (a e b); planta clonal AL<sub>1</sub> instalada em 2007 num ensaio clonal, Estreito, Oleiros, com 3,6 anos (c e d, fotografias de Américo Lourenço) Junho de 2011.

Os resultados apresentados referem-se a um ensaio clonal instalado na Pampilhosa da Serra no Outono de 2007, em Signo Samo. Neste ensaio foram comparadas plantas de origem clonal (CLO) e plantas de origem seminal / semente (SE). Foram testados diferentes tratamentos de adubação à plantação. O controlo (0) foi comparado com a aplicação de: (1) adubo de libertação lenta, Nutriforest 9:23:14 (+4; +0,1) NPK MgO B - 8 a 9 meses, na proporção de 30g/planta ao fundo da cova (identificado como LL); e (2) adubo granulado 133 (7:21:21; NPK) na proporção de 140g/planta, distribuído por 2 covas a 20 cm da planta (identificado como 133). Foram utilizados 4 blocos completos e casualizados com 5 plantas por tratamento e por bloco. O compasso na plantação foi de cerca de 4 x 4 m (16m<sup>2</sup>/planta), num total de 120 plantas (4 blocos \* 5 plantas/tratamento \* 3 tratamentos de adubação (0; 133; LL) \* 2 material vegetal/plantas (CLO; SE). Teve-se o cuidado de identificar áreas homogéneas por bloco (área / bloco de 480 m<sup>2</sup> e num total de 1920 m<sup>2</sup>). A área em que ficou instalado o bloco nº IV é caracterizada por solos delgados, predominantemente litossolos de xisto.

Ao fim de 5 anos, em 2012 foram realizadas 9 colheitas de fruto, semanalmente, no período de 15/10/12 a 13/12/12. Os dados abaixo indicados referem-se ao valor global do peso do fruto. Os valores reportados a Kg / ha são extrapolados considerando o mesmo compasso existente na plantação (1 planta / 16 m<sup>2</sup>; 625 plantas / ha). Observaram-se diferenças significativas devido ao tipo de material vegetal / planta, ao tratamento de adubação testado, ao número da colheita e respetivas interações (entre cada 2 fatores testados). Os melhores resultados foram obtidos quando foram utilizadas plantas clonais (CLO) e estas foram adubadas (Tab. 1).

Tabela 1 – Produção estimada (Kg/ha) num pomar instalado a um compasso de 4 x 4 m (625 plantas / ha), de acordo com a produção observada ao fim de 5 anos após a instalação, em função do material vegetal testado (clonal; seminal), do tratamento de adubação à plantação e do bloco.

Planta	Frutos (Kg/ha)*	Adubação	Frutos (Kg/ha)*	Bloco	Frutos (Kg/ha)*
<b>CLO</b>	<b>557,5 ± 5,8<sup>a</sup></b>	0	102,7 ± 2,7 <sup>b</sup>	<b>1</b>	<b>316,0 ± 9,9<sup>a</sup></b>
SE	62,6 ± 1,2 <sup>b</sup>	<b>LL</b>	<b>400,7 ± 7,8<sup>a</sup></b>	<b>2</b>	<b>397,7 ± 11,3<sup>a</sup></b>
		<b>133</b>	<b>426,8 ± 8,6<sup>a</sup></b>	<b>3</b>	<b>445,4 ± 10,3<sup>a</sup></b>
				4	81,0 ± 3,6 <sup>b</sup>

Razão CLO / SE = 8,9

Razão Adubação / controlo = 4.03

\*Valores (média ± std); letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas P < 5%. Material vegetal testado (clonal / CLO; seminal / SE); Tratamentos de adubação à plantação (controlo / 0; adubo de libertação lenta / LL e adubo granulado 133; Blocos ou repetições (4).

A tabela nº 1 mostra que as plantas clonais produziram 8,9 vezes mais que a planta seminal. Esta observação confirma que a micropropagação de plantas adultas selecionadas permite antecipar a idade de frutificação (Preece, 2008). Assim, é provável que esta diferença venha a diminuir com o processo de maturação da planta seminal. Por outro lado, a adubação, independentemente do tipo de adubo testado, aumentou a produção em 4 vezes, de uma forma significativa quando comparada com o controlo. Outro fator importante é o Bloco o que evidencia a importância da fertilidade do local. Assim, em condições ecológicas semelhantes ao bloco 4, caracterizadas por litossolos de xisto, com profundidade do solo inferior a 10 cm, é provável que a produção seja significativamente inferior (81,0Kg/ha) quando comparada com a média dos outros 3 blocos (386,4Kg/ha).

A Tabela nº 2 mostra que a adubação é mais eficaz quando se utilizou o adubo 133, para ambos tipos de plantas, mas sem diferenças significativas do adubo de libertação lenta. A adubação estimulou a produção de fruto e de uma forma mais evidente nas plantas clonais.

Tabela 2 – Produção estimada (Kg/ha) num pomar instalado a um compasso de 4 x 4 m (625 plantas / ha), de acordo com a produção observada ao fim de 5 anos após a instalação, em função do material vegetal testado (clonal; seminal), do tratamento de adubação à plantação e do bloco.

Planta * Adubação		Frutos (Kg/ha)*	Bloco * Planta		Frutos (Kg/ha)*
SE	0	26,6 ± 1,8 <sup>b</sup>	4	SE	2,1 ± 0,4 <sup>c</sup>
SE	LL	74,8 ± 4,2 <sup>b</sup>	1	SE	58,7 ± 3,7 <sup>c</sup>
SE	133	86,3 ± 4,2 <sup>b</sup>	2	SE	84,2 ± 5,8 <sup>c</sup>
CLO	0	178,8 ± 6,9 <sup>b</sup>	3	SE	105,4 ± 6,3 <sup>c</sup>
<b>CLO</b>	<b>LL</b>	<b>726,6 ± 17,7<sup>a</sup></b>	4	CLO	160,0 ± 9,3 <sup>c</sup>
<b>CLO</b>	<b>133</b>	<b>767,2 ± 20,0<sup>a</sup></b>	<b>1</b>	<b>CLO</b>	<b>573,3 ± 24,5<sup>b</sup></b>
			<b>2</b>	<b>CLO</b>	<b>711,3 ± 26,9<sup>ab</sup></b>
			<b>3</b>	<b>CLO</b>	<b>785,4 ± 22,1<sup>a</sup></b>

\*Valores (média ± std); letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas  $P < 5\%$ . Material vegetal testado (clonal / CLO; seminal / SE); Tratamentos de adubação à plantação (controlo / 0; adubo de libertação lenta / LL e adubo granulado 133; Blocos ou repetições (4).

A Tabela nº 2 mostra ainda, que neste caso as plantas clonais testadas, mesmo em condições pouco favoráveis (Blocos 4 e 1), obtiveram uma produção superior às plantas de origem seminal. Este facto poderá indicar que o clone testado tem um comportamento estável, i.e. é capaz de responder quer nas melhores condições quer em condições mais desfavoráveis. No entanto, só observações nas futuras campanhas e também em outros locais distintos poderão confirmar esta observação. Franco *et al.* (2013) referem que as plantas clonais apresentaram valores de grau Brix significativamente inferiores ( $21,6 \pm 1,9$ ) comparativamente às plantas de origem seminal ( $25,3 \pm 1,7$ ). Por outro lado, as plantas não adubadas apresentaram valores significativamente inferiores de grau Brix. Assim há a alertar que para manter uma boa produção e qualidade do fruto há que estudar, testar e avaliar os níveis adequados de fertilização (Franco *et al.*, 2013).

Na instalação dos novos pomares terá toda a vantagem: (a) a plantação de plantas selecionadas e testadas para as condições ambientais pretendidas; (b) a utilização de diversos clones; e (c) a utilização de uma percentagem de 5 a 10% de plantas de origem seminal, de forma a garantir uma maior variabilidade genética. Estas condições para garantirem sucesso deverão estar associadas a (a) uma preparação conveniente do terreno, em função das características do perfil do solo e (b) à plantação na época mais favorável, de forma a estimular o desenvolvimento radicular inicial, a instalação da cultura e a capacidade de melhor tolerar, posteriormente, as restrições ambientais mais severas, como a secura do verão ou as geadas do inverno. É ainda relevante que sejam utilizadas as práticas culturais mais favoráveis à espécie em função das condições ecológicas da estação (solo; clima; disponibilidade de água e nutrientes) e numa perspetiva da relação custo/benefício.

## Agradecimentos

Pela orientação e colaboração prestada um agradecimento especial ao Orientador de doutoramento Prof. Doutor Jorge Canhoto da FCTUC.

Pela colaboração e apoio prestados um agradecimento especial a José Maia da ESAC; a Helena Machado e Rita Costa do INIAV; a Margarida Ribeiro da ESACB; a todos os Produtores Florestais que têm contribuído para a seleção de plantas e instalação de ensaios.

Os trabalhos apresentados foram financiados pelos programas I&D: (1) PRODER, medida 4.1 Ref.<sup>a</sup> 43748; (2) FCT: PTDC/AGR-FOR/3746/2012; (3) PROTEC/FCT, Ref.<sup>a</sup> SFRH / BD / 50263 / 2009 e Ref.<sup>a</sup>: SFRH/BD /37170/2007.

## Referências Bibliográficas

- Canhoto, J.M., 2010. Biotecnologia vegetal, da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Figueiredo, P., Gomes, F., Santos, R., Pop, R.L., 2013. Rapid propagation of *Arbutus unedo* L. adult selected plants using *ex vitro* rooting. 8<sup>th</sup> International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. UC & ISHS, Coimbra, p. *Abst* 157.
- Fortin, J.A., Plenchette, C., Piché, Y., 2008. Les mycorrhizes la nouvelle révolution verte. Ed. Multimondes, Ed. Quae, Québec.
- Franco, J., Botelho, G., Gomes, F., Gama, J., 2013. Efeito da seleção de plantas e da adubação na produção e qualidade de medronho. 7º Congresso Florestal Nacional. "Florestas - Conhecimento e Inovação". SPCF, UTAD, IPB/ESAB, Vila Real / Bragança, p. *Abst* 244.
- Gomes, F., Canhoto, J.M., 2009. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 45, 72-82.
- Gomes, F.; Costa, R.; Ribeiro, M.M.; Figueiredo, E.; Canhoto, J.M. 2013. Analysis of genetic relationship between *Arbutus unedo* L. genotypes using RAPD and SSR markers. *Journal of Forestry Research* 24 (2): 227-236.
- Gomes, F.; Machado, H.; San Martin, E.; Portugal, A.; Canhoto, J.M. 2013. Mycorrhizal synthesis between *Pisolithus arhizus* and an adult selected clone of *Arbutus unedo* *in vitro* and in nursery. *Journal of Forestry Research* 24(2): 659-670
- Gomes, F., Simões, M., Lopes, M.L., Canhoto, J.M., 2010. Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). *New Biotechnology* 27, 882-892.
- Mereti, M., Grigoriadou, K., Nanos, G.D., 2002. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Sci. Hort.* 93, 143-148.
- Molina, R., Smith, J.E., McKay, D., Melville, L.H., 1997. Biology of the ectomycorrhizal genus, *Rhizopogon* 3. Influence of co-cultured conifer species on mycorrhizal specificity with the arbutoid hosts *Arctostaphylos uva-ursi* and *Arbutus menziesii*. *New Phytologist* 3, 519-528.
- Parladé, J., Pera, J., Luque, J., 2004. Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 14, 171-176.
- Pedro, J.G., 1994. Portugal Atlas do Ambiente. Notícia Explicativa II.6 Carta da distribuição de figueira e medronheiro. D.G.A., Ministério do Ambiente e Recursos Naturais, Lisboa.
- Preece, J., 2008. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (Eds.), *Plant propagation by tissue culture*, 3<sup>rd</sup> ed. Springer, Dordrecht, pp. 403-422.
- White, T.L., Adams, W.T., Neale, D.B., 2007. *Forest Genetics*. CAB Internacional Oxfordshire.