

Propagação de plantas selecionadas de medronheiro

Filomena Gomes¹, Patrícia Figueiredo¹, Ana Rita Santos¹ e Jorge Canhoto²

¹Cernas, Escola Superior Agrária de Coimbra, Bencanta, 3040-316 Coimbra, fgomes@esac.pt

²Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Apartado 3046, 3001-401 Coimbra

Resumo

O medronheiro é uma espécie de origem Mediterrânica. Aparece em todo o país desde os 20 a 1000 m de altitude. É tolerante à secura, solos degradados e apresenta uma resistência ativa a incêndios florestais. O consumo de pequenos frutos vermelhos, como o medronho, tem vindo a aumentar devido ao seu valor nutritivo e teor em anti-oxidantes. No entanto, a produção de aguardente é ainda a principal fonte de rendimento. Verifica-se no mercado um forte incremento na procura de plantas melhoradas. Os proprietários pretendem a valorização económica das explorações, recorrendo a uma espécie autóctone como o medronheiro. Para o melhoramento da espécie, procedemos: (a) à seleção massal de árvores superiores, à sua propagação vegetativa, seguida pelo estabelecimento de ensaios clonais; (b) ao estabelecimento de micorrizas para aumentar a resistência da planta e criar outra fonte de rendimento, como a produção de cogumelos comestíveis e (c) à avaliação da diversidade genética para definição de estratégias de conservação e de cruzamento.

A seleção fenotípica das árvores *plus* foi realizada com base no porte da planta, na produção e qualidade do fruto. Foi estabelecido um protocolo eficiente para a propagação de plantas adultas. Procedeu-se à instalação de ensaios clonais. Na micorrização foi demonstrada a compatibilidade entre *Arbutus unedo*, *Pisolithus tinctorius* e *Lactarius deliciosus*, bem como foram testados e avaliados diferentes métodos de inoculação *in vitro* e em viveiro. Foi observada uma elevada diversidade genética, indicador do interesse do estabelecimento de cruzamentos entre as melhores árvores, a próxima etapa. O melhoramento é um processo contínuo e dinâmico, que pressupõe em cada ciclo de melhoramento: (a) a seleção; (b) o estabelecimento de cruzamentos; (c) a instalação de ensaios de descendência (para avaliação dos genótipos); (d) o estudo da interação entre os genótipos e o meio ambiente; e (e) a eleição de árvores de elite alocadas às diferentes condições ecológicas. O cruzamento entre árvores da população de melhoramento, a instalação de ensaios e a avaliação e seleção de progénies e a existência de protocolos de propagação eficazes permitirá a médio a longo prazo o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e melhor alocadas às diferentes condições edafo-climáticas.

Palavras-chave: *Arbutus unedo*; árvores superiores; micorrizas; micropropagação.

Abstract

The strawberry tree is a Mediterranean species growing from 20 to 1000 m altitude. *A. unedo* can thrive in drought and degraded soils and has an active resistance to wildfires. In recent years the consumption of small red fruits, such as those of *A. unedo*, has increased due to its nutritional value and anti-oxidant properties. Nevertheless, the production of a spirit still remains the main source of income for farmers. The demand for improved

selected trees has increased since propagation usually occurs from spontaneous growing plants of unknown genotype. The owners intend to increase the land economic value, using a native species such as strawberry tree. For tree improvement the following steps were taken: (a) mass selection of *plus* trees, their propagation, and clonal trials establishment; (b) mycorrhizae establishment to improve plant fitness and to profit from another income source (c) assessment of the genetic diversity for conservation and breeding purposes.

Selection of *plus* trees was based on the plant habit and fruit production and quality. An efficient protocol for adult plant propagation was established and clonal trials carried out. The compatibility between *Arbutus unedo*, *Pisolithus tinctorius* and *Lactarius deliciosus* was analysed as well as the effect of different methods of inoculation *in vitro* and in nurseries. A high genetic diversity of the analysed plants was found, a parameter of great interest on breeding programs. Tree breeding is a continuous and dynamic process, which requires in each cycle: (a) selection; (b) matings; (c) progeny trials establishment (for genotype evaluation); (d) interaction between genotype and environment studies, and (e) tree elite selection and further allocation to different environmental conditions. Matings between trees of a breeding population, progeny trials establishment and further evaluation and selection with effective propagation protocols will allow, on middle to long term, the development of new cultivars more productive and better allocated to different environmental conditions.

Keywords: *Arbutus unedo*; micropropagation; mycorrhizae; *plus* trees.

Introdução

O medronheiro é uma espécie nativa de Portugal onde ocupa cerca de 15.500 ha (Pedro, 1994). É uma planta lenhosa (arbusto ou árvore até 12 m), tolerante à secura e com forte capacidade regenerativa após a ocorrência de incêndios florestais, o que a torna interessante para programas de florestação. Os frutos, normalmente colhidos em plantas espontâneas, são usados na produção de aguardente, que corresponde à principal fonte de rendimento. Assim, é relevante o desenvolvimento de protocolos de propagação de árvores adultas seleccionadas pela produção e qualidade de fruto.

A variação fenotípica entre as árvores de uma população natural é devida a fatores ambientais e genéticos (Fig. 1). A variabilidade em populações naturais, devido à proveniência, está diretamente relacionada com as características de adaptabilidade da espécie a condições de tolerância a stresses abióticos (clima e solos; geada; seca) e bióticos (White *et al.*, 2007). Assim, na primeira etapa de melhoramento é recomendada a seleção de árvores superiores/fenótipos em diferentes povoamentos e regiões de proveniência (Fig. 1), seguida pela aplicação de protocolos de propagação, o estabelecimento de cruzamentos, a instalação de ensaios para avaliação dos genótipos e a definição de estratégias de cruzamento (White *et al.*, 2007). Os ensaios clonais instalados em diferentes condições permitem a avaliação dos genótipos dos progenitores e a sua posterior alocação às diferentes estações ecológicas.

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 (i.e. anos de safra) e a distribuição da produção de fruto (i.e. o ser concentrada numa dada época para

facilidade de colheita). A avaliação da qualidade do fruto foi feita com base em diversos parâmetros (dimensão dos frutos; peso; dureza; relação calibre/peso; pH; grau Brix; acidez total; açúcares redutores).

As técnicas de propagação de plantas selecionadas

Os métodos de propagação vegetativa são úteis quando se pretende manter e multiplicar as características genéticas de um dado genótipo ou de árvores de elite. 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 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; Gomes e Canhoto, 2009).

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 pela produção e qualidade de fruto. Neste caso houve que identificar: (a) o método de multiplicação *in vitro*; (b) o tipo e dimensão do explante para estabelecimento das culturas; (c) os meios de cultura, os reguladores de crescimento (PGR); (d) as condições a serem adotadas nas diferentes fases de multiplicação; e (e) o efeito do genótipo, do tipo e concentração de reguladores de crescimento na micropropagação.

O estabelecimento *in vitro* de explantes provenientes de espécies lenhosas adultas tem mostrado ser uma etapa difícil. No entanto, a propagação de árvores adultas é a única forma de assegurar a seleção por um conjunto de características expressas na fase adulta. Embora os explantes mais jovens, provenientes de semente ou de plantas jovens, sejam mais fáceis de estabelecer e propagar *in vitro*, os seus fenótipos são imprevisíveis (Canhoto, 2010).

A escolha do explante é um fator que pode afetar o sucesso da micropropagação. Os nossos ensaios mostraram que a utilização de rebentos epicórmicos (Fig. 2), induzidos em ramos colhidos nas árvores selecionadas e mantidos em condições controladas, constituem uma boa fonte de explantes primários favoráveis ao estabelecimento das culturas (Gomes e Canhoto, 2009). A utilização de rebentos epicórmicos tem diversas vantagens: (a) podem ser induzidos durante todo o ano e não ficarem restringidos à primavera; (b) podem ser mantidos em condições controladas; e (c) o processo de desinfecção é em geral também 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).

Na fase de multiplicação foram identificados os meios de cultura, os PGR mais favoráveis à multiplicação do material vegetal (Gomes *et al.*, 2010), de forma a estimular o alongamento dos rebentos ou a formação de tufo que podem ser divididos e portanto multiplicados (Fig. 3). Na fase de enraizamento foi identificada a concentração da auxina

mais favorável ao enraizamento e à formação de novas raízes, i.e. raízes adventícias (Gomes *et al.*, 2009). Verificou-se que a origem das raízes adventícias no rebento é profunda e está associada à zona do sistema vascular. Assim, a origem das raízes, o estabelecimento de uma boa conexão entre o sistema vascular, a não formação de *callus* na base do rebento permitiram taxas elevadas de sobrevivência na aclimatização após 4 meses (84 a 98%) e após 1 ano (97%) no ensaio clonal (Fig. 4).

A micorrização de plantas selecionadas

As micorrizas são associações simbióticas estabelecidas entre fungos e as raízes da maior parte das espécies lenhosas. Estima-se que em condições naturais, mais de 85% das plantas apresentam este tipo de simbiose. Os fungos micorrízicos constituem uma componente relevante nos sistemas agrícolas e florestais porque interferem em diferentes processos, tais como: (a) na promoção do crescimento (através do aumento do volume de solo explorado pelo micélio e consequentemente pela assimilação de nutrientes e água); (b) no aumento de tolerância a condições de stresse abiótico (stresse hídrico, solos degradados, metais pesados); (c) no aumento de tolerância a condições de stresse biótico, através do efeito antagonista e competitivo com agentes patogénicos (pragas e doenças); (d) no acréscimo de azoto disponível para as plantas, através da assimilação de azoto na forma orgânica (caso dos fungos ectomicorrízicos); (e) na promoção da agregação dos solos, através da produção da glomalina, contribuindo para a estabilidade dos agregados argilo-húmicos e consequentemente para a recuperação de solos degradados; (f) na indução e formação de raízes ramificadas, através da libertação de auxinas ou outros reguladores de crescimento, contribuindo para o aumento do grau de colonização; e (g) 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). Acresce o impacto positivo que a micorrização de plântulas *in vitro* representa para o sucesso da aclimatização de plantas micropropagadas.

Trabalhos prévios mostraram que fungos envolvidos na formação de micorrizas arbutoides, isto é, o tipo de micorrizas estabelecidas com espécies de três géneros da família Ericaceae, entre os quais o medronheiro, são fungos capazes de estabelecer ectomicorrizas com outras plantas hospedeiras (Molina *et al.*, 1997). Na micorrização de clones selecionados de medronheiro foram testados fungos que estabelecem ectomicorrizas com outras espécies lenhosas, como é o caso de *P. tinctorius* e *L. deliciosus*. Ambos os fungos são basidiomicetas, estabelecem ectomicorrizas e são utilizados na inoculação de plantas na região mediterrânica. O primeiro é caracterizado por estar associado a uma ampla gama de hospedeiros e o segundo pelo seu valor económico. Foram observadas micorrizas arbutoides com o *P. tinctorius*, um mês após a transferência dos rebentos em condições *in vitro* (Fig. 5). Na micorrização de plantas aclimatizadas em viveiro (Fig. 5) de clones adultos de medronheiro foi avaliado o efeito de diferentes métodos de inoculação no comportamento das plantas em comparação com plantas controlo, não inoculadas em viveiro e posteriormente no campo (Gomes *et al.*, 2008).

Para assegurar a persistência da estirpe inoculada em condições de campo, é relevante: (a) a seleção de estirpes competitivas e bem adaptadas ao ambiente (planta, solo, humidade,

microrganismos e outras condições de stresse biótico e abiótico); (b) a redução ou eliminação de trabalhos de mobilização do solo após a instalação das plantas micorizadas; (c) o controlo da fertilização (em dose reduzida), em especial o fósforo; e (d) a exclusão de rotações com plantas não micotróficas (Parladé *et al.*, 2004; Fortin *et al.*, 2008). Vários autores consideram que mais importante que a espécie de fungo testada é a seleção de estirpes bem adaptadas à planta, ao ambiente e capazes de competir com os outros microrganismos do solo (Fortin *et al.*, 2008). Assim, avaliar as estirpes de fungos pela sua eficácia será o nosso próximo desafio. Para monitorizar o estabelecimento de micorrizas em condições de campo é necessário realizar observações morfológicas e histológicas das raízes, a par de estudos moleculares para confirmação do estabelecimento de micorrizas com a espécie de fungo previamente inoculado.

Estudo da diversidade genética

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).

Para o medronheiro, espécie autóctone e sujeita a reduzidas a moderadas condições de stresse ambiental ou antropogénico (Pedro, 1994), é de prever a existência de uma maior diversidade genética comparativamente a espécies exóticas (White *et al.*, 2007). A informação da diversidade genética é crucial para o planeamento estratégico do melhoramento, apoiando a seleção de genótipos mais distantes em termos genéticos para os programas de cruzamento e de conservação. É relevante, a avaliação da diversidade genética, com recurso a marcadores moleculares, entre plantas selecionadas e plantas espontâneas de diferentes proveniências. É relevante identificar marcadores com elevado grau de polimorfismo com o objetivo de avaliar a estabilidade genética do material propagado, estabelecer o *fingerprinting* das variedades melhoradas, avaliar a estrutura genética da espécie e definir estratégias de cruzamento e conservação (White *et al.*, 2007).

Na análise da diversidade genética do medronheiro foram identificados 4 microsátélites (SSRs) com um valor de informação polimórfico elevado (Gomes *et al.*, 2012).

Perspetivas futuras para o melhoramento do medronheiro

Como linhas futuras de investigação nestas áreas são de salientar: (a) na micropropagação, a necessidade de otimizar os métodos de enraizamento e propagação, tendo como objetivo a redução de custos; (b) na micorrização, a necessidade de otimizar os métodos de inoculação com *L. deliciosus* e selecionar estirpes bem adaptadas à planta e capazes de competir com os outros microrganismos do solo; e (c) na análise da diversidade genética, a utilização de SSRs no estudo da estrutura genética da espécie, na caracterização de árvores de elite, na avaliação do sistema de cruzamento da espécie, na avaliação da estabilidade genética do material propagado e na seleção de genótipos para o estabelecimento de cruzamentos e bancos de germoplasma. Considerando, ainda, que foram instalados ensaios clonais em diferentes estações ecológicas, há que avaliar os genótipos, o grau de heritabilidade das características de seleção, o ganho genético obtido e, ainda, estudar o efeito da interação entre o genótipo e o meio ambiente.

Há a salientar que o melhoramento vegetal é um processo contínuo e dinâmico, que pressupõe em cada ciclo de melhoramento: (a) a seleção; (b) o estabelecimento de cruzamentos; (c) a instalação de ensaios de descendência (para avaliação e seleção de genótipos); (d) o estudo da interação entre os genótipos e o meio ambiente; e (e) a eleição de árvores de elite alocadas às diferentes condições ecológicas. O cruzamento entre árvores da população de melhoramento, a seleção de progénies e a existência de protocolos de propagação permitirá a médio a longo prazo o estabelecimento de novas cultivares.

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. Para que haja sucesso será ainda necessário que (a) na transformação sejam seguidas “boas práticas” que permitam obter um produto de qualidade e por último (b) que se estabeleça uma Organização dos Produtores para a partilha de informação, para a divulgação e *marketing* dos produtos, bem como, para a organização dos circuitos de comercialização.

Agradecimentos

Pela colaboração prestada um agradecimento especial a Helena Machado e Rita Costa do INIAV; a Margarida Ribeiro da ESACB; a José Maia, Mafalda Simões, Esteban San Martin, Ana Ponce Diaz, Vera Santos, Gema Requena, Iker Sorzabalbere e Jorge Agrela da ESAC e a Ludovina Lopes, António Portugal e Elisa Figueiredo da FCTUC.

Referências

- Canhoto, J.M., 2010. Biotecnologia vegetal, da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Fortin, J.A., Plenchette, C., Piché, Y., 2008. Les mycorhizes la nouvelle révolution verte. Ed. Multimondes, Ed. Quae, Québec.
- 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., 2012. Analysis of genetic relationship among *Arbutus unedo* L. genotypes using RAPD and SSR markers. Journal of Forestry Research.
- Gomes, F., Lopes, M.L., Santos, T., Canhoto, J.M., 2009. Micropropagation of selected trees of *Arbutus unedo* L. through axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. Acta Hort. 839, 111-116.
- Gomes, F., Santos, V., Sorzabalbere, I., Ponce Diaz, A., San Martin, E.P., Canhoto, J.M., 2008. Efeito da inoculação com *Pisolithus tinctorius* na sobrevivência de plântulas micropropagadas de *Arbutus unedo* L., I Congresso Luso-Espanhol de Fixação de Azoto, Fundamentos e Aplicações agrónomicas e ambientais da fixação de azoto e microrganismos benéficos para as plantas. INRB, I.P. & SEFIN, Estoril, p. Abst 20.

- 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*, 3rd ed. Springer, Dordrecht, pp. 403-422.
- White, T.L., Adams, W.T., Neale, D.B., 2007. *Forest Genetics*. CAB Internacional Oxfordshire.

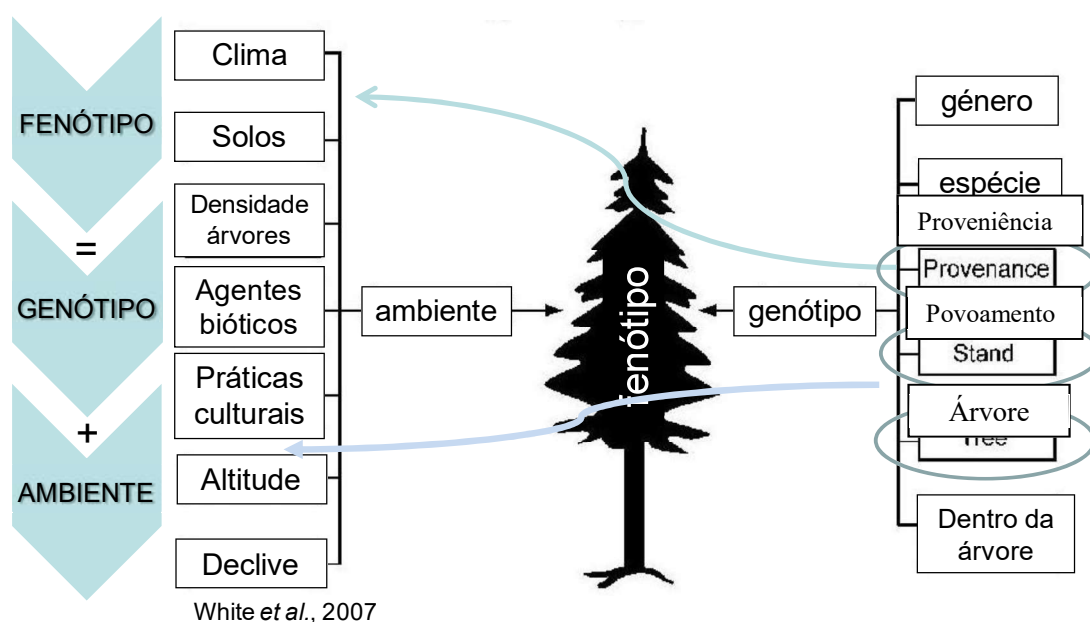


Figura 1 – A variação fenotípica entre as árvores de uma população natural é devida a fatores ambientais e genéticos (Adaptado de White et al., 2007).

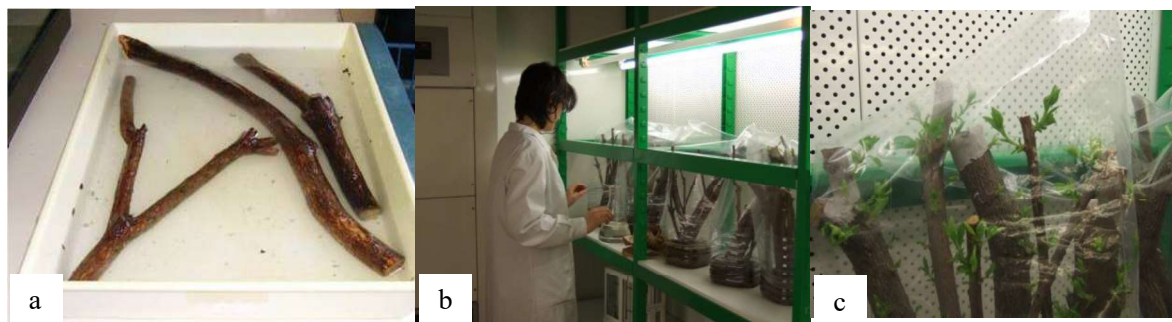


Fig. 2 – Os ramos colhidos em árvores selecionadas (a) e mantidos em condições controladas (b) permitiram o desenvolvimento de rebentos epicórmicos (c) utilizados no estabelecimento de culturas *in vitro*.

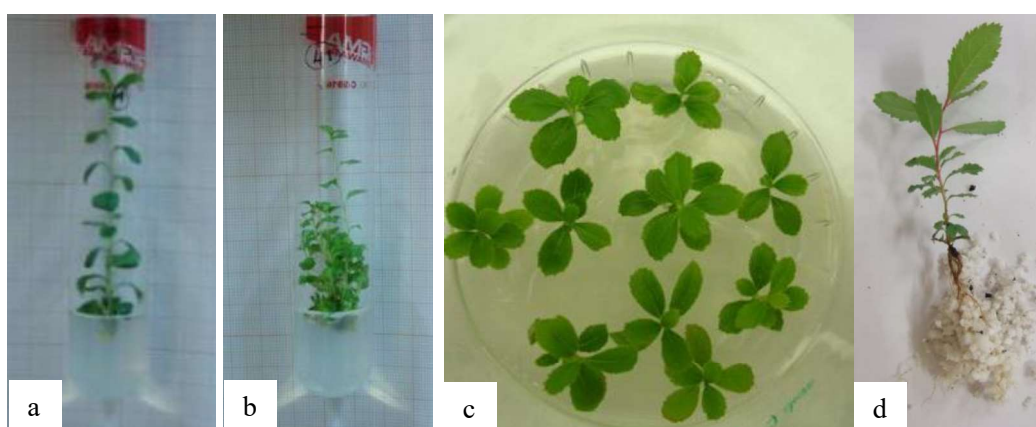
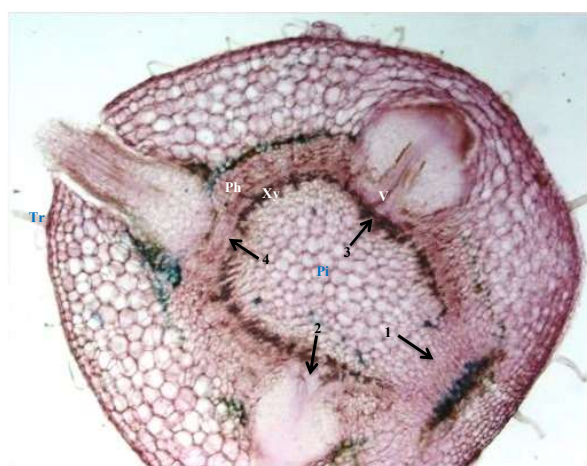


Fig. 3 – Na fase de multiplicação *in vitro* foram identificados os meios de cultura e reguladores de crescimento mais favoráveis ao alongamento dos rebentos (a), e formação de tufos (b), de forma a permitir a sua multiplicação (c) e posterior enraizamento (d).



a



b



c

Fig. 4 – Corte transversal de um rebento mostrando diferentes estados de desenvolvimento de 4 raízes adventícias (setas), verifica-se que a origem das raízes é profunda, na zona do sistema vascular, bem como o estabelecimento de uma boa conexão entre o sistema vascular da raiz e do rebento e ainda a não formação de

callus (a). Estas características permitiram taxas elevadas de sobrevivência na aclimatização (b) e após 1 ano no ensaio clonal (c); (Ph – floema; Xy – xilema; Pi – medula; V – sistema vascular; Tr – tricoma; a barra indica 100 μ m).

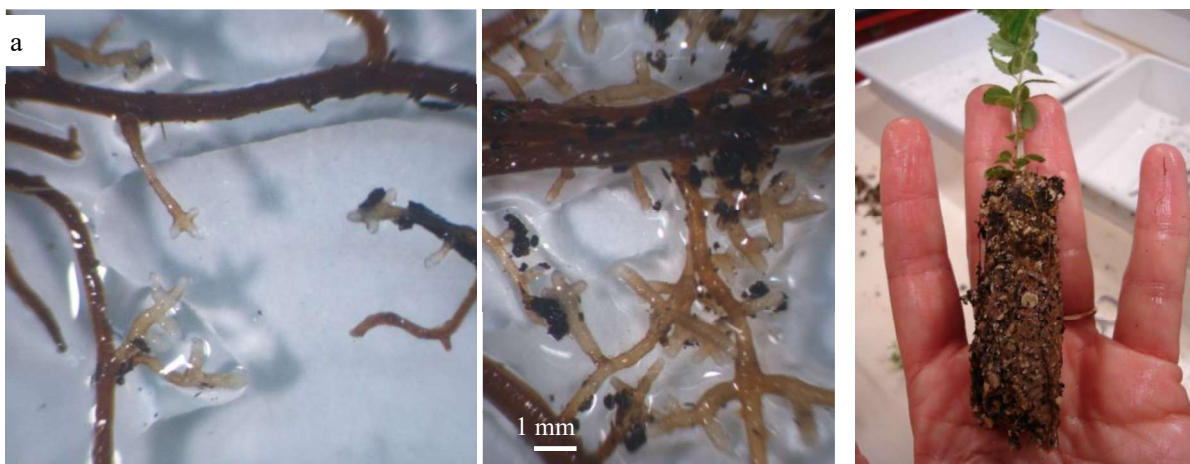


Fig. 5 – Observação de micorrizas arbutoides com o *P. tinctorius*. Observação da típica formação cruciforme de micorrizas arbutoides (a; b) no viveiro e a presença do manto amarelo típico do *P. tinctorius* em condições *in vitro* (c).