

Biotecnologia do medronheiro (*Arbutus unedo* L.): ensaios de cultura *in vitro* e hibridação

João Martins¹ & Jorge Canhoto^{1,2}

¹CEF, Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra

joao.martins@uc.pt

²Associação UC InProPlant – Investigação, Desenvolvimento Tecnológico e Internacionalização, Paço das Escolas, Praça da Porta Férrea, 3004-531 Coimbra
jorgecan@ci.uc.pt

Resumo

O medronheiro (*Arbutus unedo*, Ericaceae) é um arbusto ou pequena árvore que cresce em redor da bacia mediterrânica e em alguns locais da costa atlântica europeia. Em Portugal ocorre de forma espontânea em diferentes zonas de Norte a Sul do país. É uma planta bem adaptada a condições de stresse e tem uma grande capacidade de regeneração após fogos florestais, o que torna a espécie interessante para programas de reflorestação. Pela sua capacidade de colonizar solos marginais e devido aos reconhecidos problemas de fitossanidade de outras espécies em Portugal, o medronheiro apresenta-se como uma alternativa interessante para produtores, pelo seu potencial como fruteira e ornamental. O fruto do medronheiro (medronho) é uma baga esférica comestível, de cor vermelha, com um baixo teor em lípidos e proteínas, mas altos teores de hidratos de carbono e ainda antioxidantes. Devido a estas características o medronheiro apresenta grande potencial como espécie fruteira, e a quase totalidade da produção atual destina-se exclusivamente à obtenção de aguardente, um produto muito valorizado. De forma a tornar a espécie mais interessante e competitiva, e disponibilizar material de qualidade aos produtores tem vindo a ser desenvolvido um intenso programa de propagação e melhoramento do medronheiro.

Foram selecionados vários genótipos com base na produção de frutos e desenvolveram-se protocolos de multiplicação por proliferação de meristemas, organogénese e embriogénese somática, que estão a ser aplicados na multiplicação desta espécie. Com o objetivo de obter novos genótipos, procedeu-se ao cruzamento de árvores fenotipicamente interessantes e levaram-se a cabo alguns ensaios de poliploidização. Atualmente, graças aos protocolos de multiplicação existentes, é possível obter um grande número de plantas clonadas, de genótipos selecionados e com características interessantes. Estas plantas garantem geralmente uma produção mais homogénea e de melhor qualidade, o que pode permitir um aumento substancial dos benefícios por parte dos produtores. A oferta de material vegetal deste tipo é crescente, e, num futuro próximo, estarão disponíveis genótipos cada vez mais tolerantes a condições de stresse e por isso com melhores características do ponto de vista produtivo.

Palavras-chave: embriogénese somática, micropropagação, organogénese, poliploidia

Abstract

Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) biotechnology: *in vitro* culture and hybridization

Strawberry tree (*Arbutus unedo*, Ericaceae) is a bush or small tree growing around the Mediterranean basin and in Ireland and Portugal. In our country the species can be seen all over the country but reaches higher densities both in Algarve and the centre region. It is well adapted to stress conditions and shows a great regenerative aptitude following forest fires making it an interesting species for reforestation programs. Owing to its ability to thrive in poor marginal soils and to the phytosanitary problems that other species are suffering, strawberry tree is nowadays seen as an interesting alternative for farmers due to its potential for fruit production as well as ornamental. The fruits of *A. unedo* are edible round berries, red when mature, with a low content in lipids and proteins and considerable amounts of carbohydrates and antioxidant compounds such as phenolics. Fruits are mainly used for the production of a very alcoholic spirit called *medronheira* but attempts are being made to make this species a fruit tree for fresh fruit consumption. During the last years a considerable effort has been carried out in order to convert strawberry tree into a species more interesting for fruit production through the selection and propagation of selected trees by *in vitro* culture methods, through hybridization assays and by polyploidization experiments.

Selected trees were propagated through different *in vitro* culture techniques such as axillary shoot proliferation, organogenesis and somatic embryogenesis. Controlled *in vitro* and field pollinations were used to understand the pollination process and to obtain hybrids between selected trees. Polyploidization assays were also carried out. Plantlets from these crosses have been obtained following seed germination and will be transferred to the field for phenotype evaluation. Genotypes selected for productivity and stress tolerance arising from these crosses will be propagated by the *in vitro* culture techniques already optimized and will be available for the farmers whose profits might increase due to the improved quality of the propagated materials. **Keywords:** micropropagation, organogenesis, polyploidy, somatic embryogenesis

Introdução

Portugal é um país onde a floresta desempenha um papel de grande relevo na economia do país e na configuração ecológica do território. Nos últimos anos tem-se assistido com preocupação ao acentuar de problemas que afectam a floresta. Para além dos recorrentes fogos florestais, o aparecimento de pragas como o nemátoide-do-pinheiro e de outras que afectam o eucalipto colocam sob ameaça a produção e o equilíbrio dos ecossistemas florestais. Uma das espécies que pode ajudar a solucionar alguns dos problemas que se têm manifestado é o medronheiro. Trata-se de uma espécie que cresce espontaneamente em diferentes locais do nosso território, em particular na região do Algarve e na região centro (Godinho-Ferreira et al., 2005). Existem várias espécies do género *Arbutus*, mas *A. unedo* é a espécie mais comum na bacia do mediterrâneo, ocorrendo também em países da costa atlântica europeia como Portugal e a Irlanda (Piotto et al., 2001). 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 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 (Nepi, 2001; Gomes, 2011).

Os medronhos são comestíveis e apresentam um teor em lípidos e proteínas reduzido, mas elevados teores de hidratos de carbono (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). Os frutos são essencialmente utilizados para a produção de uma aguardente muito popular em algumas regiões do país. São também utilizados na confecção de produtos tradicionais como compota e geleia.

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 mesmo considerado como “Neglected or Underutilized Crop” pela Global Facilitation Unit for Underutilized Species (www.cropsforthefuture.org), que considera o potencial da espécie em determinadas áreas (por exemplo farmacêutica e cosmética) como muito relevante. 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.

Tendo em conta este quadro geral, o nosso laboratório tem realizado uma intensa investigação no medronheiro com dois objectivos principais: 1) desenvolver e optimizar protocolos de micropropagação em larga escala de árvores selecionadas e 2) obter novos genótipos de medronheiro que possam ulteriormente ser produzidos em larga escala e distribuídos aos agricultores de forma a aumentar a produção. Para atingir o primeiro objectivo têm sido utilizados protocolos de micropropagação por proliferação de meristemas (Gomes e Canhoto, 2009; Gomes et al., 2010), organogénese (Martins, 2012) e embriogénese somática (Gomes et al., 2009). Para atingir o segundo objectivo têm sido realizados ensaios de polinização artificial *in vitro* e em condições de campo com o objectivo de obter plantas com novas características. Ensaios de poliploidização têm também sido conduzidos (Antunes, 2010; Martins, 2012).

Multiplicação *in vitro*

Para a multiplicação *in vitro* de medronheiro têm sido utilizadas várias técnicas de micropropagação. Têm também sido testados diferentes tipos de explantes como embriões zigóticos, folhas jovens, pecíolos e hipocótilos.

Os resultados obtidos mostram que é possível a propagação através das seguintes técnicas: proliferação de meristemas, organogénese e embriogénese somática.

No que diz respeito à proliferação de meristemas, esta tem sido conseguida pela cultura de segmentos nodais e ápices de plantas micropropagadas. As culturas são realizadas num meio MS (Murashige e Skoog, 1962) modificado suplementado com benziladenina (BA) ou combinações de BA e NAA. Ensaios com tidiazurão, outra citocinina, têm

também sido realizados. Ensaios realizados em meio líquido revelaram que estas condições são muito eficazes na proliferação de meristemas axilares, com um máximo de 6 rebentos por explante num dos genótipos testados. O enraizamento dos rebentos caulinares obtidos é conseguido após tratamento com ácido-3-indol butírico (IBA, 1 mg/l) seguido de transferência para meio sem reguladores de crescimento. Este protocolo tem sido utilizado para propagar diferentes genótipos em larga escala à semelhança do verificado por Mereti et al. (2002). Para além disso, segmentos foliares dos rebentos caulinares propagados por proliferação de meristemas têm sido utilizados para a indução de embriogénese somática.

Folhas jovens de rebentos caulinares em condições de micropropagação têm sido utilizadas para a indução de embriogénese somática. As folhas são removidas dos rebentos caulinares e transferidas para meios de indução de embriogénese somática. Os meios são compostos pelos nutrientes do meio MS modificado e contendo combinações de BA e de NAA (ácido 1-naftaleno acético). Antes da colocação em cultura as folhas são feridas com o objectivo de induzir stress e aumentar a exposição dos tecidos aos reguladores de crescimento. Os resultados mostram que as melhores taxas de indução são obtidas em meios com 8,8 μ M BA e 26,8 μ M NAA. Nestas condições, dependendo do genótipo, taxas de indução superiores a 50% podem ser obtidas. Os embriões somáticos são formados após desdiferenciação celular e formação de um calo à semelhança do verificado por El-Sayed et al. (2010). Os embriões são morfologicamente semelhantes aos embriões zigóticos embora com dimensões superiores e passam pelas mesmas fases de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar). Anomalias morfológicas nos embriões são comuns, tais como alterações no número de cotilédones, cotilédones fundidos e inibição do meristema apical da raiz. No entanto, a presença de algumas anomalias não é impeditiva da conversão dos embriões em plantas. Os embriões somáticos formam-se de forma assíncrona e num mesmo explante podem ser observados embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento. Esta situação dificulta a conversão pelo que métodos que permitam uma sincronização no desenvolvimento embrionário necessitam de ser desenvolvidos.

A regeneração de plantas por organogénese foi inicialmente observada na base de segmentos nodais em ensaios de multiplicação. Na base destes segmentos nodais formam-se pequenos calos e meristemas adventícios a partir dos quais de originam novos rebentos caulinares. Esta situação verifica-se quer em meio líquido quer em meio sólido. À semelhança dos rebentos obtidos por proliferação de meristemas axilares, os meristemas adventícios originam rebentos caulinares que enraízam nas mesmas condições que foram descritas anteriormente.

Ensaios de hibridação

Numa primeira fase foram realizados ensaios com o objectivo de determinar o grau de compatibilidade entre o pólen e o pistilo de diferentes árvores, flores da mesma árvore e parte masculina e feminina de uma mesma flor. Estes ensaios foram realizados *in vitro* em condições controladas e *ex vitro* em condições de campo. Anteriores próximas da maturação foram recolhidas de diferentes árvores e colocadas no laboratório, numa caixa de Petri à temperatura ambiente. O pólen libertado foi utilizado nos ensaios de polinização. Nos ensaios de polinização *in vitro*, flores fechadas de medronheiro foram recolhidas e, após remoção das restantes peças florais, os carpelos colocados em caixas de Petri com um meio gelificado que servia de suporte e que permitia manter um elevado grau de humidade. O pólen foi colocado no estigma com o auxílio de um pincel

e o crescimento do tubo polínico no estilete observado por microscopia de fluorescência utilizando o fluorocromo azul de anilina para visualizar os tubos polínicos em crescimento. Ensaios semelhantes foram realizados no campo. Neste caso, as flores polinizadas artificialmente foram envolvidas por um saco poroso e marcadas para ulterior recolha dos frutos.

Os ensaios realizados mostraram que a polinização pode ocorrer dentro da mesma flôr, entre flores da mesma árvore e entre flores de diferentes árvores (alopolinização) não se verificando diferenças no crescimento do tubo polínico nos diferentes casos. Dados preliminares mostram que os frutos resultantes das polinizações artificiais possuem menos sementes que os frutos obtidos em condições normais. Sementes resultantes das polinizações cruzadas foram isoladas e colocadas a germinar. As plântulas obtidas foram transferidas para vasos. Estas plantas serão ulteriormente transferidas para condições de campo para análise fenotípica.

Os ensaios de poliploidização até agora realizados (Antunes, 2010, Martins, 2012) permitiram a obtenção de plantas tetraplóides e mixoplóides. No entanto, o número de tetraplóides obtidos foi muito reduzido (3 plantas). Para além disso, estas plantas apresentam um crescimento muito lento e reduzida capacidade proliferativa tendo todas as plantas morrido antes da transferência para solo. Verificou-se ainda que os mixoplóides obtidos têm tendência a reverter ao estado diplóide o que mostra a instabilidade das células tetraplóides.

Conclusões e perspectivas futuras

Os resultados obtidos mostram que o medronheiro tem uma elevada capacidade de resposta *in vitro* tendo sido possível regenerar plantas através de todas as técnicas de micropropagação testadas. Importa agora analisar a uniformidade genética das plantas obtidas por embriogénese somática e organogénese pois a passagem por uma fase de calo pode levar ao aparecimento de variação somaclonal. É necessário também modificar o protocolo de regeneração por embriogénese somática com o objectivo de aumentar a sincronização do desenvolvimento embrionário e as taxas de conversão. No que se refere à indução de organogénese, é importante testar outros expantes, em particular as folhas para aumentar a eficiência do processo.

Os ensaios de polinização mostram que não parecem existir barreiras de incompatibilidade entre o pólen e a parte feminina de diferentes árvores abrindo assim a possibilidade de realização de hibridações em larga escala com o objectivo de produzir novas combinações genéticas interessantes do ponto de vista comercial. O facto dos frutos resultantes de polinizações cruzadas terem um menor número de sementes significa que a técnica de polinização não é a mais adequada, podendo optimizar-se em ensaios futuros. Finalmente importa optimizar as condições de obtenção de tetraplóides e criar as condições para a sua viabilidade e durante o processo de propagação *in vitro*.

Agradecimentos: trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, contrato PTDC/AGR-FOR/3746/2012 e pelo Projecto PRODER Nº 43750 enquadrado no Subprograma 4, Medida 4.1 Cooperação para a inovação – O medronheiro – conversão de uma da planta silvestre numa espécie fruteira sustentável.

Referências

- Antunes, P. 2010. Indução de plantas tetraplóides através de tratamento com agentes c-mitóticos no tamarilho (*Cyphomandra betacea*) e no medronheiro (*Arbutus unedo*). Tese de mestrado. Universidade de Coimbra.
- Godinho-Ferreira, P.G., Azevedo, A.M., Rego, F. 2005. Carta da tipologia florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana* 13: 1-34.
- Gomes, F. 2011. Strategies for the improvement of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree): *in vitro* propagation, mycorrhization and diversity analysis. Tese de doutoramento, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Gomes F., Canhoto J.M. 2009. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 45:72-82.
- Gomes, F., Lopes, M.L., Santos, T. *et al.* 2009. Micropropagation of selected trees of *Arbutus unedo* L. through axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae* 839:111-116.
- Gomes, F., Simões, M., Lopes, M.L. 2010. Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). *New Biotechnol* 27:882-892.
- Martins, J.F. 2012. Estudos de cultura *in vitro* em medronheiro (*Arbutus unedo* L.) aplicados ao seu melhoramento. Tese de mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Mereti, M., Grigoriadou, K., Nanos, G.D. 2002. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Sci Hortic* 93:143-148.
- Mohamed El-Sayed, E.-M., Dewir, Y.H., Omar, A.M.K. 2010. *In vitro* propagation of adult strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) through adventitious shoots and somatic embryogenesis. *Propagation of Ornamental Plants* 10:93-98
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Neppi, M. 2001. Alberi ed arbusti della flora mellifera della regione 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 Protezi. dell'Ambiente, pp. 44-49.
- Piotto, B., Piccini, C., Arcadu, P. 2001. La ripresa della vegetazione dopo gli incendi nella regione 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 Protezi. dell'Ambiente, pp. 32-38.