



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Análise do efeito de vários tipos de compostos na micropropagação de medronheiro (*Arbutus unedo* L.)

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

Daive Coelho Martins

2015

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

Apoios:



Ao terminar esta fase não posso deixar de agradecer a todos aqueles que, de uma forma mais ou menos directa, apoiaram e contribuíram para este trabalho

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Doutor Jorge Canhoto, orientador do trabalho aqui apresentado, pela confiança depositada e pela oportunidade de poder contribuir para a produção científica do laboratório. Agradeço-lhe a dedicação, a sugestões dadas, as críticas construtivas de todo o processo de revisão e pelos tão preciosos conhecimentos transmitidos durante todo o meu percurso académico.

A toda a minha família, em especial aos meus pais e irmão, que apesar de todas as dificuldades sentidas durante este longo percurso sempre valorizaram o conhecimento e por isso apoiaram incondicionalmente o meu caminho. Obrigado pela confiança, pela dedicação e palavras de encorajamento.

Aos colegas, dentro e fora do mestrado, pela boa-disposição, simpatia e pela amizade. Aos companheiros da R.U. da Alegria agradeço por proporcionarem os momentos de descontração tão importantes. Que nos voltemos a encontrar novamente, se não pelas ruas de Coimbra, noutras quaisquer.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia pelo espírito de entreaajuda, pelos desabafos e partilha de ideais. Um obrigado especial ao João Martins pela tão valiosa disponibilidade que mostrou ao longo do ano, pelos conhecimentos transmitidos e pela sua preciosa contribuição a este trabalho.

À Patrícia por ser uma constante durante toda esta etapa, pelos desabafos, pelas palavras de apoios, vontade incessante de ajudar e por ter o dom de conseguir abstrair-me de todos as complicações enfrentadas ao longo do ano.

A Coimbra, pelos momentos proporcionados, porque me viu crescer e por me ter cruzado com pessoas tão marcantes.

A todos vós, Obrigado.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	xi
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TRABALHO	3
1.2. ARBUTUS UNEDO L.	5
1.2.1. Taxonomia	5
1.2.2. Descrição botânica	5
1.2.3. Distribuição geográfica	6
1.2.4. Importância económica, etnobotânica e ecológica	8
1.3. PROPAGAÇÃO DE PLANTAS	12
1.3.1. Proliferação de meristemas	14
1.3.2. Organogénese	15
1.3.3. Enraizamento	15
1.3.4. Embriogénese somática	17
1.3.5. Meio de cultura	19
1.3.5.1. Proteínas Arabinogalactanas	19
1.3.5.2. Fonte de azoto - ureia e tiourea	21
1.4. OBJECTIVOS	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. MATERIAL VEGETAL	27
2.2. PROLIFERAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO	27
2.3. ENRAIZAMENTO	28
2.3.1. Enraizamento <i>ex vitro</i>	29
2.3.2. Enraizamento <i>in vitro</i>	29
2.4. EMBRIOGÉNESE SOMÁTICA	30
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
3. RESULTADOS	33

3.1.	PROLIFERAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO	35
3.1.1.	Cultura em meios com AGP	35
3.1.2.	Cultura em meios com ureia e tioureia.....	38
3.1.3.	Cultura em meios com 2iP ou zeatina	40
3.2.	ENRAIZAMENTO.....	43
3.2.1.	Enraizamento <i>ex vitro</i>	43
3.2.2.	Enraizamento <i>in vitro</i>	44
3.3.	EMBRIOGÉNESE SOMÁTICA.....	46
4.	DISCUSSÃO.....	49
4.1.	PROLIFERAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO	51
4.1.1.	Cultura em meios com AGPs	51
4.1.2.	Cultura em meios com ureia e tioureia.....	53
4.1.3.	Cultura em meios com zeatina e 2iP	54
4.2.	ENRAIZAMENTO.....	55
4.2.1.	Enraizamento <i>ex vitro</i>	55
4.2.2.	Enraizamento <i>in vitro</i>	56
4.3.	EMBRIOGÉNESE SOMÁTICA.....	57
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	59
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Arbutus unedo é uma espécie de porte arbustivo ou arbóreo e pode ser encontrado um pouco por toda a Bacia Mediterrânica, norte de África e costa Atlântica da Península Ibérica e da Irlanda. Em Portugal, ocorre com maior predominância nas regiões montanhosas do sul (Serra do Monchique, Arrábida e Caldeirão). No norte e centro do país (Oleiros, Pampilhosa, Sertão) as populações de medronheiro encontram-se fortemente fragmentadas devido a intensos programas de reflorestação com eucalipto. A sua forte capacidade de regeneração após ocorrência de incêndios florestais torna-o numa importante ferramenta para a reflorestação de zonas afectadas pelo fogo.

Ainda que possua o estatuto de “Neglected and Underutilized Specie” (www.underutilized-species.org), o medronheiro é uma das espécies com maior importância económica do género *Arbutus*. Tal impacto deve-se quase exclusivamente à comercialização da aguardente produzida a partir da fermentação e posterior destilação do medronho. Ainda que sejam bem conhecidos os benefícios que podem resultar do consumo do fruto fresco, a aposta na sua comercialização tem sido negligenciada. As principais razões que podem explicar esta realidade prendem-se com a inexistência de uma rede de distribuição eficaz, uma reduzida capacidade de produção que não se coaduna com os requisitos das grandes superfícies e ao facto de este continuar a ser um fruto relativamente desconhecido pelo público em geral.

No presente trabalho testou-se, pela primeira vez, o efeito das proteínas arabinogalactanas (AGP) na proliferação de meristemas e ainda da ureia e tioureia e das citocininas 2iP ((6-(γ,γ -Dimethylallylamino)purine)) e zeatina. No caso das AGPs verificou-se que as concentrações de 4 mg/L e 8 mg/L, em ambos os clones testados, estimularam significativamente o desenvolvimento e multiplicação dos novos rebentos. De forma a testar o efeito que a assimilação da AGP poderá exercer na formação da estrutura radicular recorreu-se aos sistemas de enraizamento *in vitro* e *ex vitro* dos rebentos obtidos. A análise da estrutura radicular dos rebentos previamente expostos ao AGP permitiu concluir que não existem diferenças significativas. A tioureia mostrou ser uma fonte de azoto mais eficaz que a ureia, notando-se um maior efeito no crescimento para concentrações de 10 mg/L, ainda que sem diferenças significativas. Também foi testado o efeito das citocininas zeatina e 2iP, tendo-se verificado que a primeira é capaz de induzir um maior crescimento e multiplicação dos rebentos. Foram as concentrações de 1 mg/L, 2 mg/L e 4 mg/L, em ambas as hormonas, que levaram ao aumento

significativo no número de rebentos e peso do material obtido no fim da cultura. Nos ensaios de embriogénese somática avaliou-se o efeito de diferentes fontes de carbono no meio de indução. O incremento dos níveis de sacarose (6% e 9%) foi acompanhado pelo aumento do número de embriões formados. A exposição a 9% induziu a formação de um número significativamente superior de embriões somáticos ao verificado no controlo (3% sacarose)

A descoberta de compostos que possam estimular a resposta dos explantes é essencial para aumentar a eficácia dos diferentes processos de propagação *in vitro*. Os resultados aqui apresentados poderão contribuir para a optimização dos protocolos de micropropagação do medronheiro. No entanto, para que os compostos analisados possam contribuir eficazmente na propagação em larga escala, deverão ser realizados estudos mais detalhados de forma a perceber melhor o modo como actuam nestes processos de morfogénese *in vitro*

Palavras-chave: AGP, citocininas, compostos de azoto, embriogénese somática, enraizamento, proliferação de meristemas

Arbutus unedo is a tree or shrub-like species that can be found throughout the Mediterranean basin, North Africa, the Atlantic coast of the Iberian Peninsula, and Ireland. In Portugal it occurs mainly in the southern mountain regions of Monchique, Arrábida and Caldeirão Mountains. In the north and center (Oleiros, Pampilhosa, Sertão) regions strawberry tree populations are strongly fragmented due to intense reforestation programs with eucalypt. Its strong ability to resprout after the occurrence of forest fires makes it an important species for reforestation programs in areas strongly affected by forest fires.

Although *A. unedo* possess the “Neglected or Underutilized Specie” status (www.underutilized-species.org), it constitutes one of the most economically important species on the *Arbutus* genus. Such economic impact is almost exclusively due to the commercialization of the traditional fruit brandy, known as “Aguardente de Medronho”, produced by the fermentation and subsequent distillation of the fruits. Although the benefits associated to the consumption of the fruits are well known and studied, commercialization as a fresh fruit has been neglected by most producers. Such reality may be related to the lack of an effective distribution system, a lower production volume than required by the large supermarkets and also because the fruit is still quit unknown among urban populations.

In the work here presented, it was tested, for the first time, the effect of AGP on meristem proliferation, as well as that of urea and thiourea and the cytokines 2iP ((6-(γ , γ -Dimethylallylamino)purine)) and zeatin. In both clones tested, the treatment with 4 mg/L or 8 mg/L of AGP significantly stimulate the development and multiplication of new shoots. In order to test the effect that the AGP may have on root formation, shoots produced *in vitro* were submitted to two rooting protocols: *ex vitro* and *in vitro*. No significant differences were found among the root structure formed by the shoots pre-exposed to different AGP concentrations, what may indicate that such compound doesn't affect the root formation. Thiourea proved to be a more efficient nitrogen source when compared with urea, and its major impact on the shoot growth and proliferation was detected at concentrations of 10 mg/L. The effect of the cytokinins zeatin and 2iP was also addressed and it was found that the first one was more efficient promoting shoot growth and proliferation. Statistically significant differences on the effect of both cytokinins were detected at 1 mg/L, 2 mg/L and 4 mg/L through the formation of a higher

number of shoots per explante, as well as more developed shoots. In the somatic embryogenesis assay the effect of different carbon sources added to the induction medium was assessed. Higher sucrose levels (6% and 9% sucrose) stimulate the production of a higher number of somatic embryos. The exposure to 9% sucrose induced the formation of a significantly higher number of embryos, when compared with the control group (3% sucrose)

The effectiveness of new compounds that stimulate the *in vitro* physiological responses is essential to increase the efficiency of *in vitro* propagation. The results here described may contribute to the optimization of *A. unedo* micropropagation protocols. However, further studies are required to understand how these metabolites affect the morphogenic processes occurring *in vitro*

Key-words: AGP, cytokinins, rooting, shoot proliferation, somatic embryogenesis, nitrogen compounds.

1. INTRODUÇÃO



1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TRABALHO

O aproveitamento económico que resulta da exploração do sector florestal, no território nacional, está fortemente associado a um número relativamente reduzido de espécies, que chegam a ocupar mais de 80% da superfície florestal. Nestas estão incluídos o pinheiro-bravo (29%), o sobreiro (21%), o eucalipto (20%) e algumas folhosas nobres (5%) (Plano Estratégico Nacional, 2009). Esta situação acaba por tornar todo o sector florestal nacional bastante vulnerável à ocorrência de determinados fenómenos naturais menos favoráveis. É o caso do pinheiro-bravo e o respectivo nemátode que tem dizimado milhares de espécimes por todo o país, o mesmo se pode dizer de outras espécies como o eucalipto ou o castanheiro que também têm sido muito afectados por determinadas pragas e/ou doenças. É por isso essencial diversificar a economia florestal fomentando a plantação de novas espécies mediterrânicas naturalmente adaptadas às condições do território nacional, cuja exploração possa assegurar um retorno financeiro favorável. É neste âmbito que espécies como o medronheiro têm atraído a atenção de produtores, tanto pelo fruto como pelo valor ornamental da planta. No entanto, ainda não se observa uma adesão significativa dos produtores. Tal pode dever-se ao facto da actividade com maior potencialidade financeira se prender, quase exclusivamente, com a produção da conhecida aguardente, a partir dos seus frutos. No entanto, a obtenção de licenciamento e o custo do equipamento necessário constituem um dos principais entraves. Por outro lado, a aposta na comercialização do fruto fresco continua a ser posta de parte pela maioria dos produtores, principalmente devido à inexistência de uma rede de distribuição eficaz, reduzido volume de produção e escassa divulgação do medronho. Outro factor que terá aumentado a distância entre os produtores e esta espécie poderá estar relacionado com o reduzido investimento em programas de melhoramento, e por isso, o material de propagação disponível apresentar qualidades agronómicas heterogéneas. A selecção e multiplicação de plantas seleccionadas é, por isso, essencial para o melhoramento do medronho, tornando acessível, aos produtores interessados, uma maior quantidade de material de qualidade garantida levando à conseqüente valorização económica. Desde há cerca de 8 anos que o Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Coimbra, em colaboração com outras instituições, como a Escola Superior Agrária de Coimbra e o Instituto Politécnico de Castelo Branco e com o financiamento da FCT, PRODOR e Mais Centro, tem estado associado a vários projectos cujo principal objectivo incide na valorização do medronheiro e promoção do conhecimento da espécie e das suas

INTRODUÇÃO

potencialidades. Neste contexto, estas entidades têm vindo a desenvolver intensos programas de melhoramento através da selecção, caracterização e cruzamento de árvores adultas com genótipos de interesse, bem como o desenvolvimento de protocolos de micropropagação cada vez mais eficientes.

O presente trabalho acaba por se inserir neste âmbito, de promover o *Arbutus unedo* no sector agro-florestal, contribuindo para optimização das metodologias de cultura *in vitro*, tentando procurar novos compostos que as possam tornar mais eficazes.

1.2. *ARBUTUS UNEDO* L.

1.2.1. Taxonomia

Arbutus unedo L., vulgarmente conhecido como medronheiro, é uma das várias espécies (14-20) do género *Arbutus* (Gomes *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2002). Este género pertence à sub-família *Arbutoideae* que inclui vários *taxa* esclerófilos, característica recorrente em plantas de regiões de clima mediterrânico e que lhes permite tolerar melhor ambientes secos (Gratini & Ghia, 2002; Hileman *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2002). A distribuição geográfica deste género é dividida entre o continente Europeu e a costa ocidental do continente Norte-Americano, com especial incidência em regiões de clima mediterrânico (Hileman *et al.*, 2001). *A. Unedo* L., *A. Andrachne* L. e *A. x andrachnoides* Link ocorrem na bacia europeia mediterrânica e em zonas do Norte de África e Médio Oriente, *A. canariensis* Veill. é nativa das ilhas Canárias e as restantes espécies encontram-se distribuídas pelo hemisfério ocidental (Gomes, 2013; Hileman *et al.*, 2001). A coexistência de algumas destas espécies em determinadas zonas levou ao aparecimento de híbridos como é o caso de *A. x andrachnoides* (*A. unedo* x *A. andrachne*) e, ainda que obtido artificialmente, *A. x androsterilis* Salas, Acebes & Arco (*A. unedo* x *A. canariensis*) (Martins, 2012; Torres *et al.*, 2002). Estes híbridos constituem uma importante fonte de variabilidade genética e daqui podem surgir novas características interessantes que permitam a valorização deste género.

1.2.2. Descrição botânica

A. unedo é uma espécie de porte arbustivo ou arbóreo podendo atingir os três metros de altura (Celikel *et al.*, 2008). As suas flores são hermafroditas e encontram-se organizadas em panículas pendentes, com corola urceolada e cor esbranquiçada ou rosada (Fig. 1A), cuja polinização é maioritariamente realizada por insectos do género *Bombus* (Martins, 2012). A maturação das flores tem início nos meses de Outono. Os seus frutos, podendo conter 10 a 50 sementes, são bagas e a sua cor muda ao longo da maturação dos mesmos, passando de verde a vermelho intenso (Fig. 1C-1E). Em virtude do desenvolvimento dos frutos demorarem cerca de 12 meses, o medronheiro pode apresentar, simultaneamente, flores e frutos (Fig. 1A). Os frutos são colhidos de Outubro a Dezembro e cada árvore tem o potencial de produzir cerca de 7-10 kg de medronhos (Pereira, 2014). As folhas, com disposição alternada, recorte serrado e forma oval, têm

INTRODUÇÃO

uma tonalidade verde-clara quando jovens que vai progressivamente escurecendo à medida que as folhas atingem a maturação.

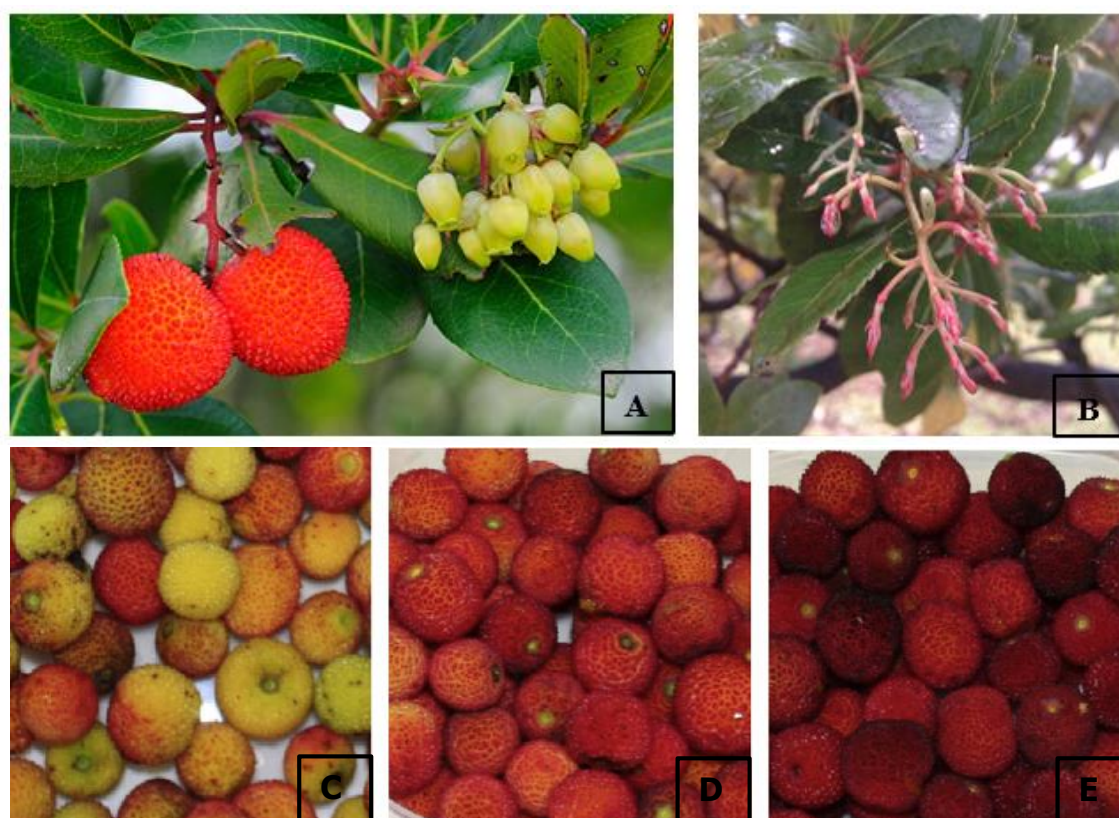


Figura 1. Aspectos da estrutura das flores e frutos do medronheiro. A) Flores organizadas em panículas pendentes, acompanhadas pelos frutos (www.naturagon.com). B) Botões florais. C-E) Diferentes fases da maturação do medronho (Oliveira *et al.*, 2011).

1.2.3. Distribuição geográfica

As diferentes espécies deste género apresentam uma distribuição geográfica em diferentes regiões com clima mediterrânico, nomeadamente na costa ocidental da América do Norte e Central e na Bacia Mediterrânica (Celikel *et al.*, 2008; Hileman *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2002). A sua distribuição pelos continentes atrás referidos pode ser explicada pelo facto de, durante o período do Eoceno, ambos os continentes terem estado em contacto (ca 40 MA) (Hilmen *et al.*, 2001; Tiffney, 1985; Torres *et al.*, 2002). Das cerca de 14 a 20 espécies que compõem o género *Arbutus*, a maioria encontra-se no território Americano, sendo que apenas dois híbridos e quatro espécies são nativas da região Mediterrânica, onde se incluem *A. unedo* e *A. andrachne* a leste do mar Mediterrânico, *A. canariensis* nas Ilhas Canárias, *A. pavarii* Pampan. na

costa da Líbia e os híbridos *A. × andrachnoides* e *A. × androsterilis* (Gomes, 2011; Torres *et al.*, 2002).

O medronheiro encontra-se largamente distribuído pela Bacia Mediterrânica, desde a Península Ibérica até à Turquia e ainda a norte do continente Africano (Fig. 2A). Ainda que seja rara a formação de populações dominantes, esta espécie chega a atingir uma densidade de cerca de 30% em vários bosques de folha persistente da Bacia Mediterrânica, geralmente em associação com árvores da família Fagaceae (Castaldi *et al.*, 2009; Gomes & Canhoto, 2009; Pedro, 2004). As formações de medronhal são espontâneas em quase todo o território nacional, ocupando cerca de 0,5% da área florestal do país, o que se traduz em cerca de 15.500 ha (Fig. 2B) (Godinho-Ferreira *et al.*, 2005). A sua presença é mais abundante na região do Algarve, nomeadamente nas zonas montanhosas das serras do Caldeirão e Monchique (Canhoto *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2002; Martins, 2012; Sá *et al.*, 2001). No Norte e Centro (Oleiros, Pampilhosa e Sertã) as populações de *A. unedo* encontram-se profundamente fragmentadas, o que pode ser consequência das temperaturas mais baixas que se fazem sentir nessas zonas e dos intensos programas de reflorestação com eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), que vem ocupando áreas cada vez maiores (Gomes *et al.*, 2013). Outros factores, como o aumento da pressão antropogénica nas áreas naturais, a frequência anormal de incêndios florestais e a desflorestação, têm também contribuído para a diminuição da área ocupada pelo medronheiro em Portugal (Lopes *et al.*, 2012).

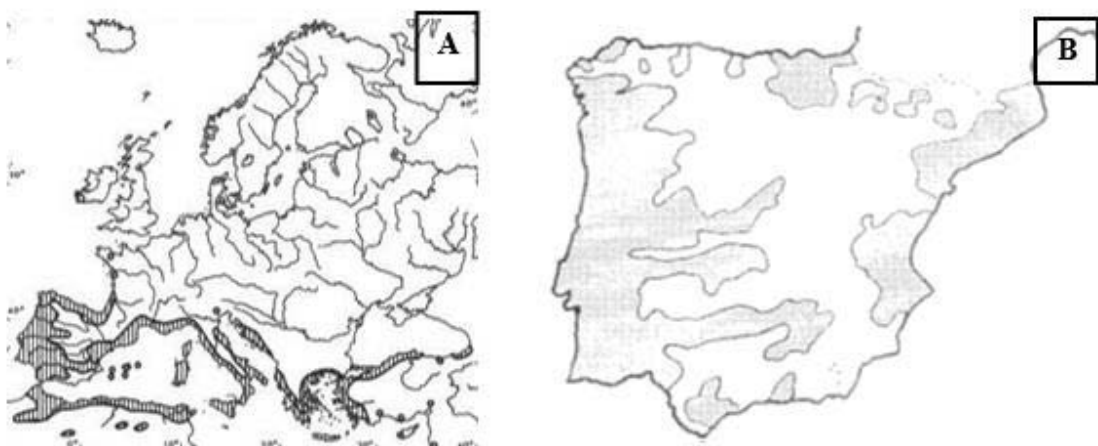


Figura 2. Distribuição do medronheiro, destacada a escuro, ao longo da Bacia Mediterrânica e costa Atlântica (Bolòs O & Vigo, 1998) (A) e Península Ibérica (Torres *et al.*, 2002) (B).

INTRODUÇÃO

O medronheiro pode colonizar zonas com altitudes entre 700 a 1000 m e ocupa, preferencialmente, solos alcalinos ou relativamente ácidos (pH 5-7.2). É mais abundante em solos siliciosos ou carbonatados, mas também pode ser encontrado em substrato de calcário (Celikel *et al.*, 2008; Ertekin & Kridar, 2010; Gomes, 2011; Mereti *et al.*, 2002; Prada & Arizp, 2008).

1.2.4. Importância económica, etnobotânica e ecológica

O medronheiro encontra-se incluído na lista das “Neglected or Underutilized Species” (NUC) pela Global Facilitation Unit for Underutilized Species (www.underutilized-species.org). Tal designação evidencia o enorme potencial desta espécie para a promoção da "segurança alimentar, saúde nutricional/medicinal, gerar incremento de rendimentos e prestação de serviços ambientais” (www.underutilized-species.org) (Underutilized-species, 2008). Algumas destas espécies NUC estão perfeitamente adaptadas às condições das regiões onde se encontram, a solos marginais e a determinadas condições de stresse (Gruère *et al.*, 2006). Estas características fazem destas espécies ferramentas importantes para a diversificação da oferta de produtos de qualidade, num sistema agrícola cada vez mais baseado num reduzido número de cultivares. Ainda que o medronheiro seja explorado do ponto de vista económico através da comercialização da aguardente de medronho, produzida a partir do processamento dos seus frutos, este não ocupa um papel significativo na economia nacional, sendo o seu maior impacto ao nível da agricultura local (Lopes *et al.*, 2012).

Os frutos, folhas e raízes de *A. unedo* têm sido usados na medicina tradicional de vários países Mediterrânicos (Djabou *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2011; Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2011) para o tratamento de patologias inflamatórias, dermatológicas, urológicas, cardiovasculares e em casos de hipertensão, diabetes, entre outras (Haouari *et al.*, 2007; Malheiro *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2011). Vários estudos têm vindo a salientar os inúmeros efeitos benéficos que resultam do consumo dos seus frutos, nomeadamente as propriedades antisépticas, diuréticas, laxativas e anti-microbianas (Barros *et al.*, 2010; Malheiro *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2011).

A análise dos compostos fitoquímicos e nutricionais que podem ser encontrados no medronheiro e que podem explicar os eventuais efeitos benéficos do seu consumo têm

sido alvo de estudo. Nos frutos podem encontrar-se elevadas quantidades de açúcares (42 % a 52 % do peso seco) e minerais como cálcio e potássio (Oliveira *et al.*, 2011). A composição dos frutos também inclui importantes compostos anti-oxidantes como as vitaminas C e E, carotenóides e compostos fenólicos como os flavonóides e taninos (Gonzalez *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011). No entanto, os efeitos benéficos do medronheiro não se limitam apenas ao consumo do medronho. Muitos dos compostos que podem ser encontrados nos frutos existem também nas folhas e estas podem mesmo apresentar uma maior acção anti-oxidante, dado os níveis mais elevados de compostos fenólicos aí presentes (Haouari *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2009). A preparação de extractos aquosos a partir das folhas de *A. unedo* também possui acção antibacteriana, sendo particularmente eficaz contra bactérias Gram⁺, o que pode estar relacionado com o conteúdo em compostos fenólicos presentes no referido extracto (Dib *et al.*, 2013; Malheiro *et al.*, 2012).

Ainda que possa ser consumido fresco, grande parte dos medronhos colhidos são usados para confecção de vários produtos tradicionais a partir do seu processamento (Fig. 3). Como exemplos, podem referir-se a marmelada, geleia, doces, ou iogurtes (Alarcão-e-Silva *et al.*, 2000; Malheiro *et al.*, 2012). No entanto, a principal aplicação do fruto é para a produção de uma bebida alcoólica obtida a partir da fermentação e posterior destilação do medronho. Esta também é produzida em países como Espanha, Grécia e Itália (Espírito Santo *et al.*, 2012). Existem registos da produção desta bebida em Portugal, vulgarmente conhecida como aguardente de medronho, desde a segunda metade do século XIX. No livro “Memórias da Vila Oleiros e do seu Concelho” de 1881, é sublinhado o impacto que a comercialização desta bebida teve na economia do concelho de Oleiros, entre 1856 e 1857 (www.silvapa.com). Desde então, a aguardente de medronho adquiriu uma posição de relevo na tradição sócio-cultural do país, com especial relevância para a zona centro e região do Algarve (Gomes *et al.*, 2010) onde são produzidos, anualmente, cerca de 10.000 litros (Cavaco *et al.*, 2007). Actualmente este produto ainda é explorado a uma escala bastante reduzida e, muitas vezes, de forma artesanal pelas comunidades agrícolas, sendo a sua comercialização uma importante fonte de rendimento para os seus produtores (Canhoto *et al.*, 2009; Cavaco *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2011). O processo de fermentação é muitas vezes feito em condições não controladas, resultando num produto final de qualidade muito variável (Santo *et al.*, 2012). É por isso importante a realização de estudos detalhados sobre os processos de

INTRODUÇÃO

fermentação, bem como formas de produção mais eficazes que permitam a obtenção de um produto de qualidade assegurada (Gonzalez *et al.*, 2011).

O medronheiro é também uma espécie interessante duma perspectiva ecológica. As suas flores constituem uma importante fonte de pólen e néctar para algumas espécies de abelhas que se mantêm activas durante os meses de inverno. Por florescer numa altura do ano em que a maioria das outras plantas se encontram num período de dormência, espécies de abelhas como *Bombus terrestris* encontram nas flores do medronheiro uma fonte essencial de alimento para sustentar as suas colónias (Rasmont *et al.*, 2005).

Como a maioria das espécies tipicamente mediterrânicas, o medronheiro também apresenta determinadas características que lhe permite tolerar a ocorrência de incêndios (Gomes & Canhoto *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2012). Tais atributos são de especial importância tendo em conta que, nestas zonas, os incêndios ocorrem a uma frequência relativamente elevada e desempenham um papel determinante para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas (Konstantinidis *et al.*, 2006; Savé *et al.*, 1993). No caso de *A. unedo*, a sobrevivência após tais perturbações está relacionada com a sua capacidade de



Figura 3. Exemplos de produtos que podem ser obtidos através do processamento do medronho, nomeadamente, aguardente, licor de medronho e compotas (www.silvapa.com)



Figura 4. Regeneração de *A. unedo* após a ocorrência de um incêndio (www.jgpausas.blogs.uv.es).

reiniciar o crescimento vegetativo a partir de gemas pré-existentes (Fig. 4) (Konstantinidis *et al.*, 2006; Savé *et al.*, 1993). O medronheiro constitui, desta forma, uma importante ferramenta para programas de reflorestação em países do sul da Europa, como Portugal, Espanha ou Grécia onde se verifica uma elevada prevalência de incêndios florestais nos meses quentes e secos do verão (Gomes *et al.*, 2010). Por constituir uma espécie característica de zonas Mediterrânicas, contribui também para manutenção da biodiversidade ao fornecer alimento e abrigo a várias espécies (Gomes & Canhoto, 2009; Martins, 2012), promovendo ainda a estabilização dos solos e prevenindo a sua erosão (Lopes *et al.*, 2012; Martins, 2012).

Em termos culturais, o medronho tem sido representado nas várias formas de arte. Hieronymus Bosch é o autor de um quadro intitulado “O Jardim das Delícias Terrenas”, datado no início do século XVI, que acabou por ficar conhecido como “A pintura do medronho”. A semelhança das cores das suas folhas, frutos e flores com a bandeira da Itália não passou indiferente a escritores como o Giovanni Pascali que dedicou um poema a esta espécie, referindo-se a ela como “*O verde albero itálico (...)*” (Ó verde árvore italiana). Também no símbolo da cidade de Madrid está desenhado um medronheiro e um urso a tentar alcançar os seus frutos, que acabou representado numa escultura presente num dos mais conhecidos e movimentados locais da mesma cidade espanhola.

Como o potencial económico do medronheiro ainda não é amplamente reconhecido, a sua área de ocupação tem vindo a ser gradualmente substituída por outras espécies que assegurem um maior retorno financeiro (Lopes *et al.*, 2012; Malheiro *et al.*, 2012). É por isso de extrema importância investir na valorização desta espécie,

INTRODUÇÃO

assegurando também a manutenção da sua biodiversidade e conservação. Ainda que grande parte dos frutos sejam colhidos de plantas que crescem espontaneamente (Martins, 2012), esta situação pode ser melhorada através de programas de selecção e cruzamento de plantas com características de interesse, de forma a tornar disponível cultivares com melhor qualidade. Um maior conhecimento dos compostos bioactivos presentes no medronheiro, bem como os benefícios que resultam do seu consumo, poderão também ajudar a fomentar o interesse por esta espécie. Tendo em conta que muitas das doenças típicas de uma sociedade industrializada estão fortemente associadas à acção de radicais livres (Malheiro *et al.*, 2012), alimentos com forte acção anti-oxidante, como é o caso do medronho, ganham especial interesse para promoção do bem-estar da população geral. Desta forma, o medronheiro mostra também um enorme potencial que poderá captar a atenção da indústria alimentar e farmacêutica, como uma fonte de novos sabores e cores aliados à capacidade de promover a saúde e bem-estar de quem os consome.

1.3. PROPAGAÇÃO DE PLANTAS

São várias as técnicas de propagação desenvolvidas que permitem a multiplicação de espécies vegetais e que podem ser aplicadas, tanto para fins comerciais como em programas de melhoramento e conservação. Devido à sua natureza, estas podem ser divididas em dois grupos principais, os métodos de propagação sexuada e propagação vegetativa, e devem ser escolhidas de acordo com o objectivo do produtor. Tendo em conta a necessidade da valorização económica e dos traços agronómicos do medronheiro, as técnicas que permitam a fixação de determinados genótipos têm interesse para o desenvolvimento de programas de melhoramento.

A propagação seminal do medronheiro é dificultada devido à presença de um conjunto de substância inibidoras que induzem taxas de germinação muito reduzidas, não chegando a atingir os cerca de 4 % (Ertekin & Kirdar, 2010; Hammami *et al.*, 2005). No entanto, tratamentos com ácido giberélico ou estratificação têm-se mostrado eficazes na estimulação da germinação (El-Mahrouk *et al.*, 2010; Gomes & Canhoto, 2009; Hammami *et al.*, 2005). A estacaria, processo de multiplicação vegetativa relativamente simples e económico, é também muito usado na propagação de espécies lenhosas. Quando aplicada ao medronheiro apresenta algumas limitações como, por exemplo, taxas de

enraizamento das estacas inferiores a 50%, ou ainda menores com o uso de material cada vez mais maduro (El-Mahrouk *et al.*, 2010; Gomes & Canhoto, 2009).

Desenvolvida na segunda metade do século XX, a multiplicação de plantas *in vitro*, mais conhecida como micropropagação, surge como uma alternativa mais eficaz para a propagação assexuada, quando comparada com outras práticas mais rudimentares ou convencionais. Estas técnicas de cultura *in vitro* vieram a melhorar a capacidade de produção de novas plantas, tanto pela qualidade como quantidade do material obtido. A micropropagação tem sido adoptada como a principal estratégia de propagação de espécies, cujas características que se pretendem seleccionar, justifiquem tal investimento (Gomes *et al.*, 2013; Thorpe, 2007). Através desta técnica, novos clones podem ser obtidos como resultado da cultura de tecidos (designados por explantes) num meio cuja constituição contenha todos os elementos necessários de forma a induzir, para além do crescimento e desenvolvimento da planta, a reposta fisiológica pretendida (Trigiano & Gray, 2011). O meio de cultura deverá então ser capaz de garantir um suplemento de vitaminas, minerais essenciais, açúcares e também condições ideais de pH, esterilidade, entre outros (Canhoto, 2010). No entanto, são as hormonas, ou os reguladores de crescimento, adicionadas ao meio que têm um papel determinante na manipulação da via de desenvolvimento dos tecidos mantidos *in vitro*, sendo as mais importantes as auxinas, citocininas e giberelinas (Cardoza, 2008). O sucesso da micropropagação implica um vasto conhecimento do organismo em causa para o desenvolvimento de protocolos de regeneração eficientes, uma vez que as várias espécies vegetais apresentam diferentes exigências nutritivas e diversas respostas quando expostas a hormonas semelhantes.

A obtenção de uma grande quantidade de material a curto prazo e partindo de um explante de tamanho relativamente reduzido, produção uniforme ao longo do ano, controlo das condições óptimas de crescimento das plantas, produção de metabolitos secundários, multiplicação de plantas livres de vírus através da cultura de meristemas, propagação clonal de variedades elite e conservação de espécies ameaçadas são apenas algumas das vantagens das técnicas de cultura de tecidos *in vitro* (Canhoto, 2010; Cardoza, 2008; Gomes, 2011; Pereira, 2014). Existem também outros aspectos associados a esta tecnologia que devem ser considerados, como a necessidade da instalação de um conjunto de infraestruturas e equipamentos, bem como mão-de-obra qualificada, o que acaba por aumentar consideravelmente o custo de produção. A vitrificação do material regenerado, ocorrência de variação somaclonal e complicações associadas à fase de

INTRODUÇÃO

enraizamento são outros aspectos que podem limitar o sucesso da micropropagação (Canhoto, 2010; Gomes, 2011; Thorpe, 2007). São já várias as espécies da família Ericaceae para as quais foram desenvolvidos protocolos de micropropagação, podendo indicar-se como exemplos o *Arbutus unedo* (Gomes & Canhoto, 2009; Mackay, 1996; Mereti *et al.*, 2002), *Elliottia racemosa* Muhl. (Radcliffe *et al.*, 2011), *Kalmia latifolia* L. (Lloyd & McCown, 1980), *Oxydendrum arboreum* L. (Banko & Stefani, 1989) e várias do género *Rhododendron* (Anderson, 1984) e *Vaccinium* (Gajdošová *et al.*, 2007; Isutsa *et al.*, 1994; Ostrolucká *et al.*, 2007).

Os principais métodos de micropropagação usados envolvem três tipos de resposta, conhecidas como embriogénese somática, organogénese e proliferação dos meristemas pré-existentes no explante, sendo esta a mais aplicada para a micropropagação de ericáceas (Gomes, 2010; Martins, 2012; Thorpe, 2007).

1.3.1. Proliferação de meristemas

A proliferação de rebentos *in vitro* tanto pode resultar da cultura de meristemas apicais, que continuam com o seu normal desenvolvimento originando novos rebentos com vários fitómeros, ou através dos meristemas axilares que normalmente se encontram num estado de dormência imposto pela dominância apical (Canhoto, 2010; Gomes, 2011; Ngezahayo & Liu, 2014). Ainda que a propagação de plantas seja tradicionalmente efectuada em meios sólidos, através de agentes gelificantes como agar ou agarose, este método pode também fazer uso de meios líquidos. Tal traduz-se na redução dos custos associados e também na necessidade da realização de subculturas, o que diminui a perda de material com a ocorrência de contaminações (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2010). Esta situação, aliada à sua simplicidade e rápida taxa de multiplicação, permitiu que fosse largamente usada para a propagação de ericáceas (Gomes & Canhoto, 2009; Martins, 2012; Ngezahayo & Liu, 2014). Uma outra característica que deve ser referida é o facto de a esta técnica estar associada uma maior estabilidade genética do processo de regeneração, uma vez que os novos rebentos serão formados através do normal desenvolvimento de meristemas pré-existentes no explante e, por isso, menos susceptíveis a alterações ao nível genético e epigenético (Leva *et al.*, 2012; Ngezahayo & Liu, 2014).

1.3.2. Organogénese

No processo conhecido por organogénese ocorre a formação de novos meristemas caulinares adventícios a partir de determinado tecido ou órgão mantido em cultura (Canhoto, 2010). Este processo pode receber duas denominações diferentes tendo em conta a resposta fisiológica obtida, sendo elas a organogénese directa e indirecta (Martins, 2012). No primeiro caso, os meristemas adventícios são obtidos directamente a partir do explante original, sendo depois enraizados para originar novas plantas funcionais. No segundo caso, os meristemas diferenciam-se primeiro a partir de uma massa de células indiferenciadas, conhecida como calo (Canhoto, 2010), o que pode induzir uma maior instabilidade genética e levar à ocorrência de variação somaclonal (Leva *et al.*, 2012).

1.3.3. Enraizamento

Os processos de enraizamento de estacas são já conhecidos desde há muitos anos e têm sido usados para a propagação vegetativa de plantas com determinadas características de interesse. Para além da sua importância nos sistemas de propagação mais convencionais, também para a propagação *in vitro* existe uma elevada preocupação em melhorar os processos de enraizamento das novas plântulas propagadas. Tal ditará a capacidade do sistema radicular, recentemente formado, suportar as plântulas enquanto estas crescem e produzem novas folhas (McClelland *et al.*, 1990). No entanto, foi a descoberta do efeito promotor das auxinas no enraizamento, nos anos 30, que tornou todo o processo mais eficaz e, desde então, estas hormonas têm sido amplamente usadas (Klerl *et al.*, 2002).

O processo de enraizamento pode ser dividido em duas fases principais: as fases de iniciação radicular e de expressão e alongamento do primórdio radicular (Canhoto, 2010). Regra geral, o procedimento aplicado para a diferenciação da raiz envolve a transferência de rebentos propagados, em meio líquido ou sólido, para um meio de enraizamento que contenha uma auxina, cuja concentração varia de espécie para espécie (McClelland *et al.*, 1990).

Em algumas espécies, como nas herbáceas, o referido processo pode ser facilmente obtido ao transferir os rebentos regenerados *in vitro* para um meio sem reguladores de crescimento (Canhoto, 2010; Trigiano & Gray, 2011). No entanto, para muitas das espécies com relevância económica, como em várias espécies lenhosas, o enraizamento pode ser mais problemático, o que acaba por prejudicar a comercialização

INTRODUÇÃO

das mesmas, com impactos económicos consideráveis. A recalcitrância destas para o enraizamento pode estar relacionada com a acumulação de citocininas nos tecidos da planta, como resultado da sua exposição prévia a outros meios de cultura, uma vez que foi comprovada o seu efeito inibitório (Trigiano & Gray, 2011). Para estas espécies, um dos procedimentos a adoptar poderá passar pela redução dos macronutrientes e da sacarose para metade (Canhoto, 2010), o que poderá induzir um stresse nutritivo e assim estimular o desenvolvimento radicular. Um outro factor essencial para a iniciação de raízes adventícias dos rebentos regenerados será a inclusão de auxinas no meio de indução, como anteriormente referido. Dentro desta classe de hormonas vegetais as mais vulgarmente usadas são o IAA (ácido indol-3-acético), NAA (ácido 1-naftaleno acético) e IBA (ácido 3-indol butírico), sendo a última a que se tem mostrado mais eficaz quando aplicada ao medronheiro (Pereira, 2014). Evidentemente nem todas as auxinas enumeradas apresentam a mesma eficácia, sendo por isso essencial atender às necessidades fisiológicas da espécie com que se está a trabalhar, bem como à capacidade desta mesma tolerar a auxina a que ficará exposta (McClelland *et al.*, 1990). Para além da hormona escolhida, a sua concentração e tempo de exposição desempenham também um papel determinante na resposta das plantas e o intervalo ideal destas variáveis altera de espécie para espécie (Trigiano & Gray, 2011). Quando os rebentos regenerados *in vitro* ficam expostos a concentrações de auxinas, ou a tempos de exposição, acima do que seria considerado ideal, os tecidos podem exibir um comportamento indesejado, como a formação de calos (Canhoto, 2010). Nestas situações, as raízes formam-se apenas numa fase posterior e, geralmente, verifica-se uma conexão vascular deficiente entre a raiz e o caule, o que acaba por restringir a absorção de água e solutos necessários para o crescimento dos rebentos (McClelland *et al.*, 1990). Assim, sempre que possível, a origem das raízes deve ser avaliada através de estudos anatómicos (Canhoto, 2010).

Após o enraizamento, segue-se a fase de aclimatização. Esta constitui um passo crítico na conversão das plantas obtidas *in vitro* em “plantas funcionais”, uma vez que as mesmas ficam expostas a condições de stresse que poderão induzir taxas de mortalidade consideráveis (McClelland *et al.*, 1990). Tais condições estão relacionadas com os níveis reduzidos de humidade, maior intensidade de luz e ao ambiente a que ficam expostas (Canhoto, 2010). Outro aspecto que pode afectar a sobrevivência das plântulas durante a aclimatização está relacionado com a necessidade de passarem rapidamente de um estado heterotrófico a autotrófico (Pereira, 2014). A exposição do material à sacarose, ou outra fonte de carbono, e as condições limitadas de luz e trocas gasosas quando mantidos *in*

vitro, podem induzir uma reduzida capacidade fotossintética (Trigiano & Gray, 2011) e, por conseguinte, a capacidade de tolerar as novas condições a que os rebentos caulinares ficam expostos.

Para além dos sistemas de enraizamento *in vitro* referidos atrás, o mesmo processo também pode ser conseguido por enraizamento *ex vitro*. Nestes casos, os rebentos são mergulhados numa solução muito concentrada com auxinas durante um curto período de tempo e a indução da formação da raiz dá-se directamente no substrato de aclimação (Canhoto, 2010). Este processo possui a vantagem de reduzir consideravelmente o tempo de enraizamento e custos associados, uma vez que não há a necessidade da preparação de diferentes meios de cultura para a indução e alongamento da raiz. No medronheiro é também possível o enraizamento *ex vitro* ao mergulhar a extremidade basal dos rebentos numa solução de IBA (9,8 μM) durante 10 segundos, como indicado por Figueiredo *et al.* (2013) e o desenvolvimento da raiz dá-se, ulteriormente, num substrato com perlite.

1.3.4. Embriogénese somática

Em condições naturais, para a ocorrência da embriogénese nas plantas, é essencial a fertilização da oosfera, contida no saco embrionário, pelas células espermáticas dos grãos de pólen que chegam ao óvulo através da emissão do tubo polínico. Ainda que a ocorrência da fertilização seja um pré-requisito para formação do zigoto, o embrião pode formar-se a partir das células do nucelo ou tegumento e, por isso, recebem o nome de embriões adventícios, como acontece nos géneros *Citrus* e *Mangifera* (Dantu & Tomar, 2013).

O reino vegetal possui a característica ímpar de, cada uma das células que compõem o indivíduo, poder exprimir totipotência quando as condições a que estão expostas são apropriadas (Fehér *et al.*, 2003). Esta característica possibilita a manipulação do que seria a via normal de desenvolvimento e crescimento de qualquer célula somática. A partir do momento que as células exprimem totipotência, ocorre a desdiferenciação dos tecidos, levando à formação de uma massa de células indiferenciadas, conhecida como calo (Elhiti & Wang, 2013). Desta forma, o explante adquire competência embriogénica, o que envolve profundas alterações nos padrões de expressão genética e nos processos fisiológicos e metabólicos (Fehér *et al.*, 2003; Zavattieri *et al.*, 2010), podendo então formar novos embriões de origem somática com o mesmo genótipo da planta-mãe. A descrição feita anteriormente, em que há a formação do calo, diz respeito à via indirecta

INTRODUÇÃO

da embriogénese somática, sendo a mais frequentemente usada (Martins, 2012). Por esta induzir profundas alterações nos padrões de expressão genética, a ocorrência da variação somaclonal pode constituir um problema, especialmente quando o objectivo é a propagação de determinados genótipos (Leva *et al.*, 2012). Como alternativa existe a via directa na qual os embriões são formados directamente a partir do explante (Canhoto, 2010).

De todos os factores que poderão influenciar o decorrer da embriogénese somática, a composição do meio onde os explantes são colocados para a fase de indução parece ser a mais determinante, nomeadamente a constituição hormonal e outros factores que possam induzir condições de stresse (Canhoto, 2010; Pereira, 2014; Yang & Zhang, 2010). As auxinas, isoladas ou em combinação com citocininas, são das hormonas mais usadas (Martins, 2012). De todas as auxinas testadas o 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), uma auxina sintética também usada como herbicida, apresenta maior eficiência para a fase de indução (Dantu & Tomar, 2013; Fehér *et al.*, 2003). No entanto, outras auxinas como a dicamba, picloram, IAA e NAA são também usadas, ainda que menos frequentemente (Dantu & Tomar, 2013). Outra variável que deve ser considerada diz respeito ao tipo de explante usado e à sua fase de desenvolvimento, que pode ser crucial na determinação da sua capacidade embriogénica (Gaj, 2004). Ainda que a embriogénese somática possa ser iniciada com diferentes tipos de tecidos, um maior potencial embriogénico está geralmente associado a tecidos cada vez mais jovens, por isso usam-se com maior frequência embriões zigóticos imaturos, meristemas, hipocótilos ou folhas jovens como explante (Dantu & Tomar, 2013; Gaj, 2004; Martins, 2012). Os diferentes genótipos das plantas usadas é outro factor que deve ser considerado e que pode traduzir-se, por exemplo, em diferenças no teor de hormonas endógenas e por isso influenciar o sucesso da embriogénese somática (Dantu & Tomar, 2013).

Desde que foi conseguida pela primeira vez por Steward *et al.* (1958) e Reinert (1958) na cenoura (*Daucus carota* L.) novos protocolos de embriogénese somática têm sido estabelecidos e optimizados para um número crescente de espécies (Chapman *et al.*, 1999; Dantu & Tomar, 2013). Esta técnica, para além de contribuir eficazmente para propagação de genótipos elite, pode também ajudar a compreender melhor os mecanismos associados à embriogénese zigótica, dada a semelhança morfológica e fisiológica dos processos de desenvolvimento do embrião zigótico e somático (Dantu & Tomar, 2013) No entanto, uma comparação entre os dois tipos de embriogénese só poderá ser estabelecida quanto aos processos que ocorrem após a fase globular (Dodeman *et al.*,

1997), uma vez que as fases seguintes são idênticas e o embrião somático passa também pelo estado globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Martins, 2012). Apesar das semelhanças verificadas entre os dois tipos de embriogénese aqui discutidos, existem algumas diferenças óbvias que devem ser referidas. A mais evidente diz respeito ao facto da iniciação da morfogénese zigótica estar dependente da fertilização da oosfera, enquanto que na embriogénese somática a indução é conseguida com a aquisição da capacidade embriogénica pelo explante (Fehér *et al.*, 2003). Além disso, a normal morfogénese do embrião zigótico é acompanhada pelo desenvolvimento do endosperma, enquanto que na embriogénese somática o referido tecido está ausente e será o meio de cultura a satisfazer as necessidades nutritivas do embrião em desenvolvimento (Dodeman *et al.*, 1997).

1.3.5. Meio de cultura

A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura sempre foi considerado essencial para que, a partir de determinado sistema de regeneração, se obtenha a resposta pretendida (Gaj, 2004). No entanto, estes reguladores de crescimento não actuam sozinhos e a sua interação com outros compostos presentes no meio de cultura pode ser determinante para a eficácia do sistema de propagação (Gaspar *et al.*, 1996). Desde o desenvolvimento das várias técnicas de cultura de tecidos *in vitro* tem surgido um interesse crescente em descobrir novos compostos, naturais ou sintéticos, que possam regular o crescimento e desenvolvimento dos tecidos cultivados, tornando o processo mais eficaz.

1.3.5.1. Proteínas Arabinogalactanas

Proteínas arabinogalactanas, vulgarmente conhecidas como AGPs, é o nome atribuído a uma classe de glicoproteínas que podem ser encontradas, com elevada abundância e distribuição, tanto em plantas terrestres como marinhas, como é exemplo nos géneros *Chara*, *Codium* e *Micrasterias* (Kreuger & van Holst, 1996; Popper, 2011). Estas macromoléculas ocorrem nas folhas, caules, raízes, órgãos florais, sementes, associadas à membrana plasmática, parede celular, matriz extracelular e também em determinadas secreções como na superfície do estigma e exsudados de feridas (Seifert & Roberts, 2007; Tan *et al.*, 2012). Grande parte das AGPs até agora caracterizadas contém menos de 10% de natureza proteica e mais de 90% de carboidratos, apresentando um

INTRODUÇÃO

peso molecular entre 60-300 kDa (Kreuger & von Holst, 1996; Mallón *et al.*, 2013; Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000; Seifert & Roberts, 2007; Tan *et al.*, 2012). Os elementos proteicos destas proteínas são ricos em resíduos de hidroxiprolina, alanina, glicina e serina, mas a sua composição em aminoácidos pode variar bastante entre as AGPs de diferentes espécies, ou dos tecidos onde se encontram (Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000). Verifica-se também que 30-40 % dos açúcares presentes são arabinose ou galactose (Kreuger & van Holst, 1996).

Uma característica-chave das AGPs, que se mostrou extremamente útil para uma melhor compreensão da sua actividade biológica e modo de acção, é a sua elevada especificidade com uma classe de corantes sintéticos conhecido como reagente de Yariv (β -D-Galactosil) (Kreuger & van Holst, 1996; Tan *et al.*, 2012). Ainda que o mecanismo de interacção entre o AGP e o reagente de Yariv não seja bem compreendido, este tem sido amplamente usado como método eficaz, tanto para a localização e purificação das AGPs como para testar hipóteses quanto à sua função biológica, inibindo a sua acção por precipitação com o referido reagente (Hu *et al.*, 2006; Popper, 2011).

Desde os anos 80 que este tipo de proteínas tem atraído a atenção de vários investigadores dada a sua aparente influência nos vários processos de desenvolvimento das plantas. Ainda que actualmente não seja possível identificar os tipos de AGPs presentes em determinadas plantas, partindo de informação genética, existem várias técnicas, como a imunocitoquímica, que permitem detectar, quantificar e localizar estes compostos (Popper, 2011). No entanto, o que se sabe da sua função biológica é ainda meramente especulativo (Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000; Popper, 2011). Uma das razões que vem dificultando a melhor compreensão da sua actividade está relacionada com a grande heterogeneidade das AGPs presente nos tecidos vegetais, o que sugere que as várias formas podem exercer efeitos diferentes (Ellis *et al.*, 2010). Apesar destas limitações, as AGPs têm sido associadas a vários processos envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas, como na expansão e proliferação celular, crescimento da raiz, diferenciação do xilema, resposta a stresse abióticos, expansão e orientação do tubo polínico e ainda no desenvolvimento dos grãos de pólen (Chug & Khurana, 2002; Ellis *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2012). A sua influência na embriogénese somática foi sugerida pela primeira vez através de estudos de imunocitoquímica em culturas de cenoura e milho (Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000). Nestas duas espécies foram identificados epítomos de determinadas classes de AGPs abundantes em calos embriogénicos, mas ausentes noutras linhas não-embriogénicas. Outros trabalhos, que parecem indicar a sua

influência na embriogénese somática, consistiram na adição de AGPs exógenos de tecidos com elevada capacidade embriogénica, mostrando-se capaz de aumentar a eficiência do mesmo processo na cenoura e abeto-falso (Kreuger & van Holst, 1996; Majewska-Sawka, 2000).

1.3.5.2. Fonte de azoto - ureia e tiourea

Existem uma série de nutrientes que são essenciais para o correcto desenvolvimento e manutenção dos tecidos vegetais mantidos em cultura *in vitro*. O azoto é um desses compostos podendo ser incorporado nos meios de cultura sobre a forma de iões amónio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) ou também ureia e aminoácidos, como a glutamina (Pereira, 2014; Trigiano & Gray, 2011). A sua importância advém, em certa parte, do facto de fazer parte da constituição de diferentes componentes celulares fundamentais para a manutenção das plantas, como é exemplo os aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas, proteínas (George *et al.*, 2008).

O uso contínuo do solo para cultivo de determinadas plantas pode levar ao desgaste do mesmo, comprometendo a sua capacidade de fornecer às plantas todos os minerais e nutriente essenciais para o normal desenvolvimento e crescimento. A adição de fertilizantes, tanto orgânicos como inorgânicos, vieram providenciar inúmeros benefícios melhorando a composição química dos solos e, conseqüentemente, a produtividade e rentabilidade económica dos sistemas agrícolas. O azoto, juntamente com o fósforo e potássio, é considerado um dos nutrientes mais importantes na agricultura, por isso muitos dos fertilizantes actualmente produzidos possuem um elevado conteúdo do referido elemento (George *et al.*, 2008). Dos fertilizantes azotados conhecidos é a ureia que tem sido mais usada devido ao seu elevado teor de azoto (46%) (Prasard, 1998). Este composto, produzido como subproduto do ciclo do azoto, pode ser incorporado pelas plantas, no entanto, não é particularmente abundante no solo em condições naturais. Quando absorvida, ela é rapidamente hidrolisada sendo convertida em amónio e dióxido de carbono por acção da urease, enzima presente em plantas e bactérias do solo (George *et al.*, 2008). Ainda que a ureia possa ser usada como única fonte de azoto no meio de cultura, a incorporação de outros compostos azotados, como amónio e iões nitrato, podem levar a taxas de crescimento maiores (George *et al.*, 2008). Apesar do seu impacto no crescimento e desenvolvimento das plantas, a ureia não tem sido muito usada para a cultura *in vitro* de tecidos vegetais (Trigiano & Gray, 2011). A

INTRODUÇÃO

tioureia, com estrutura semelhante à ureia à exceção do átomo de oxigênio substituído pelo enxofre, também tem mostrado elevado potencial a ser usado como fertilizante, exercendo uma actividade semelhante às citocininas (Garg *et al.*, 2006). A tioureia pode exercer diversas actividades biológicas quando aplicadas às plantas, tais como a quebra da dormência das sementes, promoção da germinação, aumento da eficiência fotossintética e, conseqüentemente, estimular um maior crescimento e desenvolvimento das plantas (Garg *et al.*, 2006)

Outros compostos derivados da ureia e tioureia têm vindo a ser sintetizados e a análise da sua actividade biológica indica que estes podem apresentar uma actividade semelhante à das citocininas e, por isso, exercer uma maior influência na proliferação celular e regulação do crescimento das plantas, à semelhança de hormonas como BA (benziladenina) ou zeatina (Ricci & Bertolotti, 2008).

1.4. OBJECTIVOS

No sistema agrícola actual, desenvolvido em torno de um número reduzido de cultivares, torna-se essencial apostar em novas espécies que possam assegurar, de igual forma, um retorno financeiro favorável como resultado da sua exploração.

Por tudo o que já foi referido, o medronheiro pode vir a ser uma espécie importante para diversificar a oferta de produção agrícola. Ainda que continue a ser considerada uma espécie subvalorizada, as suas potencialidades são já bem reconhecidas e têm atraído um número crescente de produtores interessados na sua exploração e valorização. Uma das principais falhas que pode ser apontada, e que poderá justificar a exploração em pequena escala que se observa em Portugal, será a dificuldade que os produtores sentem aquando a procura de cultivares seleccionados de medronheiro, cujas características fenotípicas tornem a sua exploração mais rentável. É neste âmbito que entidades como o Laboratório de Biotecnologia da UC, em conjunto com a ESAC, têm apostado no desenvolvimento de programas de melhoramento e na optimização de protocolos de micropropagação, no qual o trabalho aqui apresentado se insere.

Este trabalho teve como principais objectivos tornar mais eficientes os processos de propagação *in vitro* no medronheiro, nomeadamente na proliferação de meristemas em meio líquido e embriogénese somática. Para tal avaliou-se o efeito que diferentes compostos poderão induzir nas técnicas acima referidas. Para a proliferação em meio líquido testou-se a inclusão no meio de cultura de AGP, as citocininas 2iP e zeatina, e ainda ureia e tioureia. Para a embriogénese somática expuseram-se os explantes a diferentes fontes de carbono, nomeadamente a sacarose e/ou manitol. Dada a falta de registos bibliográficos do uso de AGP na cultura *in vitro* no medronheiro procedeu-se ainda ao enraizamento, *in vitro* e *ex vitro*, dos rebentos obtidos da cultura com a macromolécula referida. Desta forma foi possível avaliar o eventual efeito que a sua assimilação poderá causar no desenvolvimento de raízes adventícias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS



2.1. MATERIAL VEGETAL

Os ensaios realizados neste trabalho partiram de plântulas mantidas *in vitro* de dois genótipos diferentes. São eles os clones C1, mantidos a partir de plantas adultas com origem na zona de Coimbra, e P, obtidos da germinação de sementes recolhidas em Penamacor.

Foram realizados ensaios de proliferação de rebentos, em meio líquido, a partir dos meristemas pré-existentes no explante, testando-se diferentes compostos nos meios de cultura, nomeadamente, AGPs de larício, ureia, tioureia e a citocininas 2-iP e zeatina. Os rebentos formados a partir da proliferação com AGP foram posteriormente enraizados em sistema *in vitro* e *ex vitro*, com a auxina IBA. Nos ensaios de embriogénese somática avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de sacarose isoladamente e em combinação com manitol.

2.2. PROLIFERAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

Para determinar o potencial de crescimento e proliferação do material vegetal exposto a diferentes compostos, recorreu-se a dois clones previamente mantidos *in vitro*, P e C1. O meio de cultura usado continha os macronutrientes e vitaminas de Fossard (De Fossard *et al.*, 1974) e ainda os micronutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962). A este meio base foi ainda adicionada uma fonte de ferro (Fe.EDTA) e uma fonte de carbono (sacarose a 0,087 M). Para os ensaios de proliferação em meio líquido testou-se o efeito das citocininas 2iP e zeatina (1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L) e da ureia e tioureia (2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L), servindo como controlo o meio com BAP (8,8 µM). Para o tratamento com AGP (Sigma 10830) usaram-se 3 concentrações (1 mg/L 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L) num meio suplementado com BAP (8,8 µM).

Durante a preparação do meio de cultura, os diferentes componentes que o compõem foram adicionados, em balões Erlenmeyer, a partir de soluções *stock* previamente preparadas e a sacarose foi pesada tendo em conta o volume final pretendido. Todos os componentes foram devidamente dissolvidos recorrendo a uma placa de agitação. Após o volume final ser ajustado com água destilada os valores de pH foram corrigidos com recurso a soluções *stock* de HCl ou KOH a 1 M, 0,1 M e 0,01M, até se obterem valores entre 5,65-5,7. O meio foi depois distribuído por balões Erlenmeyer (volume de 100 ml) até perfazer 50 ml de meio de cultura, esterilizados por autoclavagem a 120°C e a uma

MATERIAIS E MÉTODOS

pressão de 1atm, durante 20 min. Para o tratamento com AGP, os volumes pipetados a partir da solução stock foram esterilizados por filtração (0,22 μm , *Millipore*) e só depois adicionados aos meios de cultura previamente autoclavados.

Os explantes consistiram em 30 rebentos caulinares, aos quais foram removidas as folhas. Os rebentos foram distribuídos em grupos de 6 por cada balão Erlenmeyer (Fig. 5). Por fim, o material contido nos balões Erlenmeyer foi mantido numa incubadora de agitação a 25 °C e 120 rpm durante 8 semanas, para o ensaio com AGP, e 5 semanas para os restantes ensaios. No final deste período foram contabilizados o número de rebentos formados com mais de 1 cm de tamanho, o tamanho do maior rebento e ainda o peso fresco do material contido nos balões Erlenmeyer.

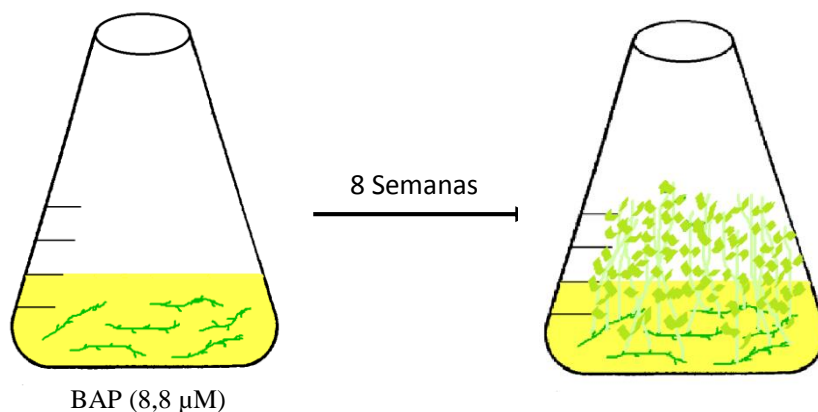


Figura 5. Representação esquemática da proliferação de meristemas em meio líquido, resultando no desenvolvimento de novos rebentos caulinares a partir dos gemas axilares do explante inicial.

2.3. ENRAIZAMENTO

Para os ensaios de enraizamento foram utilizados os rebentos obtidos por proliferação em meio líquido com AGP (secção 2.2.). Recorreu-se a duas abordagens para indução de raízes: a) um protocolo de enraizamento *ex vitro* (Fig. 6A), e b) um outro protocolo *in vitro* (Fig. 6B) que envolve dois passos, a indução radicular e posterior alongamento.

No final dos ensaios foram avaliados os parâmetros, taxa de enraizamento, número de raízes principais, percentagem de raízes laterais, comprimento da maior raiz e taxa de sobrevivência.

2.3.1. Enraizamento *ex vitro*

Para o sistema de enraizamento *ex vitro* foram selecionados 30 rebentos, com tamanho entre os 3 e 4 cm, que apresentavam um menor número de folhas vitrificadas. A estes foram removidas algumas das folhas da extremidade basal e os rebentos caulinares foram posteriormente mergulhados em tubos Eppendorf contendo cerca de 1ml de uma solução da auxina IBA a 9,8 mM, durante 10 segundos. Os rebentos foram depois transferidos para um substrato humedecido contendo perlite, para aclimatização, onde permaneceram durante 4 semanas. Após a colocação dos 30 rebentos no substrato referido estes foram borrifados com água. Os rebentos foram posteriormente tapados com uma tampa de plástico transparente de forma a assegurar a manutenção de uma atmosfera com elevada humidade. Ao longo de 4 semanas, os níveis de humidade a que os rebentos estavam expostos foram diminuindo, gradualmente, ao levantar ligeiramente a tampa que os cobria, permitindo desta forma uma maior circulação do ar.

2.3.2. Enraizamento *in vitro*

Para a abordagem *in vitro* a indução radicular foi iniciada ao manter os explantes num meio constituído pelos macronutrientes Knop (Gautheret, 1959), vitaminas de Fossard sem riboflavina, micronutrientes de MS sem iodeto de potássio, sacarose (0,044 M) e ainda a auxina IBA (24,7 μ M). Os explantes foram posteriormente colocados numa estufa a 26 °C, na obscuridade, durante 10 dias. Ao fim deste período, o material foi transferido para outro meio semelhante ao descrito anteriormente mas com o dobro da sacarose (0,087 M), sem a presença da auxina e com carvão activado (1,5%). Nesta fase, as plantas foram mantidas durante 21 dias numa estufa climatizada a 26°C com um fotoperíodo de 16h.

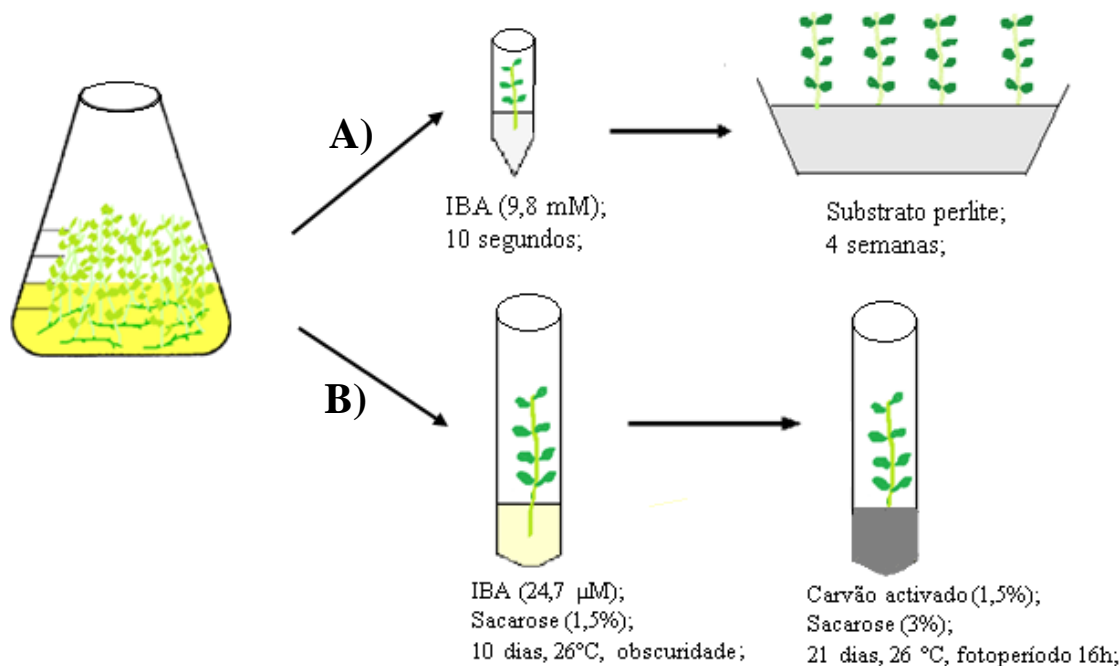


Figura 6. Representação esquemática do procedimento realizado para enraizamento dos rebentos caulinares obtidos por proliferação em meio líquido. A) Protocolo *ex vitro*. B) Protocolo *in vitro*

2.4. EMBRIOGÉNESE SOMÁTICA

Nos ensaios de embriogénese somática recorreu-se a dois clones previamente estabelecidos *in vitro*: C1, P. Os explantes foram colocados num meio de cultura constituído pelos macronutrientes Anderson (1984), micronutrientes MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas Fossard (De Fossard *et al.*, 1974), uma fonte de ferro (Fe.EDTA) e as hormonas BA (8,8 µM) e NAA (26,8 µM). No ensaio de embriogénese somática aqui apresentado foram avaliados o efeito de diferentes fontes de carbono no meio de cultura: 3% sacarose (controlo), 6% sacarose, 9% sacarose, 3% sacarose mais 6% manitol, 4,5% sacarose mais 4,5% manitol. A preparação dos meios de cultura foi semelhante à descrita na secção 2.2. Neste caso, como se procedeu à indução de embriogénese somática em meio sólido, adicionou-se o agente gelificante ágar-ágar (6 g/L). A solução foi depois aquecida de formar a dissolver o ágar e distribuída em tubos de ensaio, cada um com cerca de 10 ml de meio, posteriormente autoclavados a 120°C e a 1 atm, durante 20min.

Os explantes usados consistiram em 30 folhas de cada clone, repartidas por 3 réplicas. Na preparação das folhas para a indução da embriogénese somática foram

removidos o ápice e o pecíolo e efectuaram-se pequenas incisões na face abaxial das mesmas com um bisturi, sempre na câmara de fluxo de forma a assegurar condições de assepsia. As folhas foram depois colocadas nos tubos de ensaio, previamente esterilizados, com a face abaxial em contacto com o meio de cultura e aí mantidos durante três meses, numa estufa a 26°C, na obscuridade. No final do tratamento foram contabilizados o número de embriões formados, taxa de formação de calos e a taxa de indução.

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos de todos os ensaios aqui apresentados foram submetidos a tratamento estatístico pelo STATISTICA. Recorreu-se à análise de variância (ANOVA) dos valores e os casos em que se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) foram sujeitos a um teste de comparações múltiplas (teste Duncan). Os resultados apresentados em percentagem foram previamente transformados pelo arcoseno.

3. RESULTADOS



3.1. PROLIFERAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

3.1.1. Cultura em meios com AGP

Os rebentos caulinares, desprovidos de folhas, foram mantidos no meio Fossard ao qual foram adicionados diferentes concentrações de AGP, de forma a avaliar o efeito que esta poderá exercer na formação de novos rebentos. No fim do período de cultura foram avaliados os seguintes parâmetros: tamanho do maior rebento, número médio de rebentos formados por explante e peso do material contido nos balões Erlenmeyer.

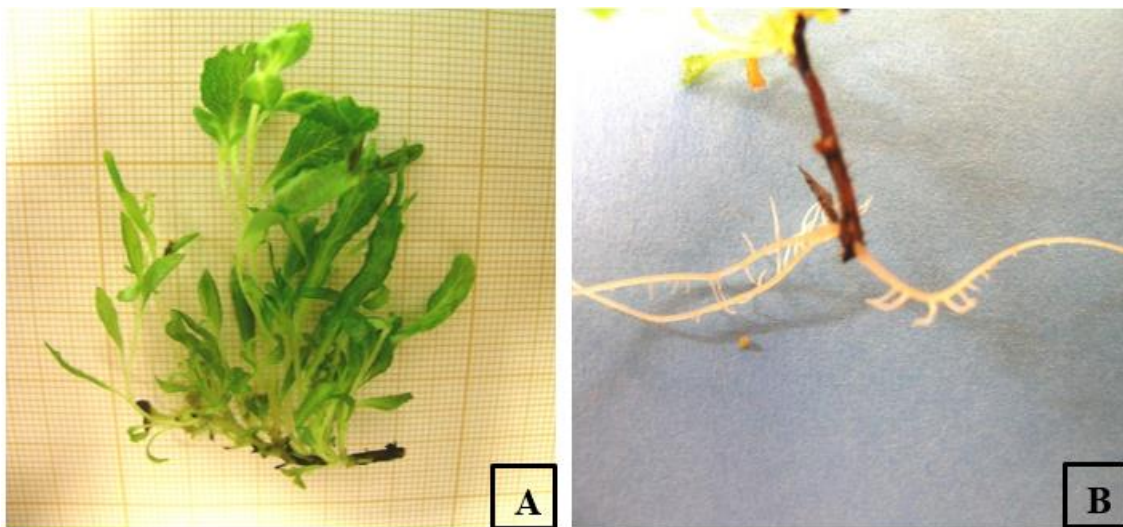


Figura 7. Proliferação em meio líquido de rebentos expostos a várias concentrações de AGP: A) Regeneração de vários rebentos a partir do desenvolvimento de meristemas existentes no explante. (B) Pormenor da formação do sistema radicular a partir da base do explante.

Após o período de cultura, os meios apresentaram-se acastanhados devido à oxidação dos compostos fenólicos libertados. Os explantes mantidos em cultura também sofreram uma oxidação acentuada, o que não afectou a regeneração de novos rebentos (Fig. 7A), tendo ainda ocorrido a formação de raízes adventícias a partir da base de alguns explantes (Fig. 7B). Ainda que os rebentos formados tenham mostrado um desenvolvimento normal, quando expostos às várias concentrações de AGP, notaram-se diferenças visíveis na intensidade da resposta ao mesmo composto. Para além do efeito das diferentes concentrações, também os dois clones responderam com intensidades diferentes. Ao fim de cerca de 10 dias já era visível o desenvolvimento dos meristemas axilares, dando início ao crescimento de novos rebentos a partir dos mesmos (Figs. 8A e 8B).

RESULTADOS

Os explantes do clone P expostos a 4 mg/L e 8 mg/L de AGP produziram rebentos de maior tamanho, com uma média de $7 \pm 1,169$ cm e $7,1 \pm 1,887$ cm, respectivamente, contra os $6,53 \pm 1,150$ cm medidos no controlo (sem AGP). Também no clone C1 as referidas concentrações levaram a um aumento, ainda que muito reduzido, do tamanho dos rebentos (Fig. 9A). No que diz respeito ao peso fresco de todo o material obtido nos balões Erlenmeyer do clone P e C1, foram as concentrações de 4 mg/L e 8 mg/L que levaram a valores significativamente superiores, comparativamente aos valores observados no controlo de cada clone (Fig. 9B). Importa ainda referir que foi neste parâmetro que se notaram diferenças significativas na resposta entre os dois clones. A exposição do genótipo P a 4 mg/L levou a um aumento significativo do peso ($6,1 \pm 1,01$ g), relativamente aos valores obtidos do clone C1 tanto para a mesma concentração ($3,76 \pm 1,02$ g) como para as restantes ($3,63 \pm 1,19$ g e $4,14 \pm 1,23$ g com a exposição a 2 mg/L e 8 mg/L respectivamente) (Fig. 9B). Também para o número médio de rebentos obtidos de cada explante foram observadas diferenças significativas na exposição a 2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L de ambos os clones, comparativamente ao meio sem AGP (Fig. 9C).

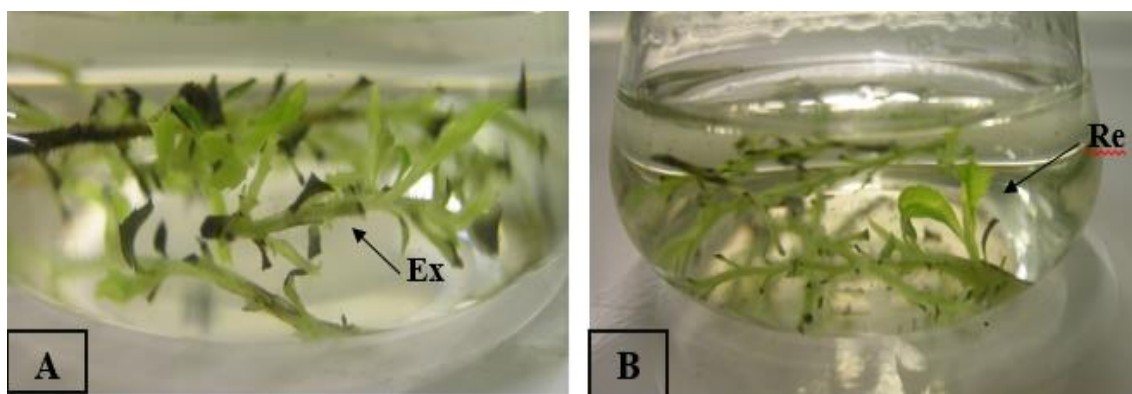


Figura 8. Proliferação dos meristemas após 10 dias de cultura em meio suplementado com 4mg/L (A) e 8mg/l (B) onde se observa a emergência de rebentos (Re) a partir do explante inicial (Ex).

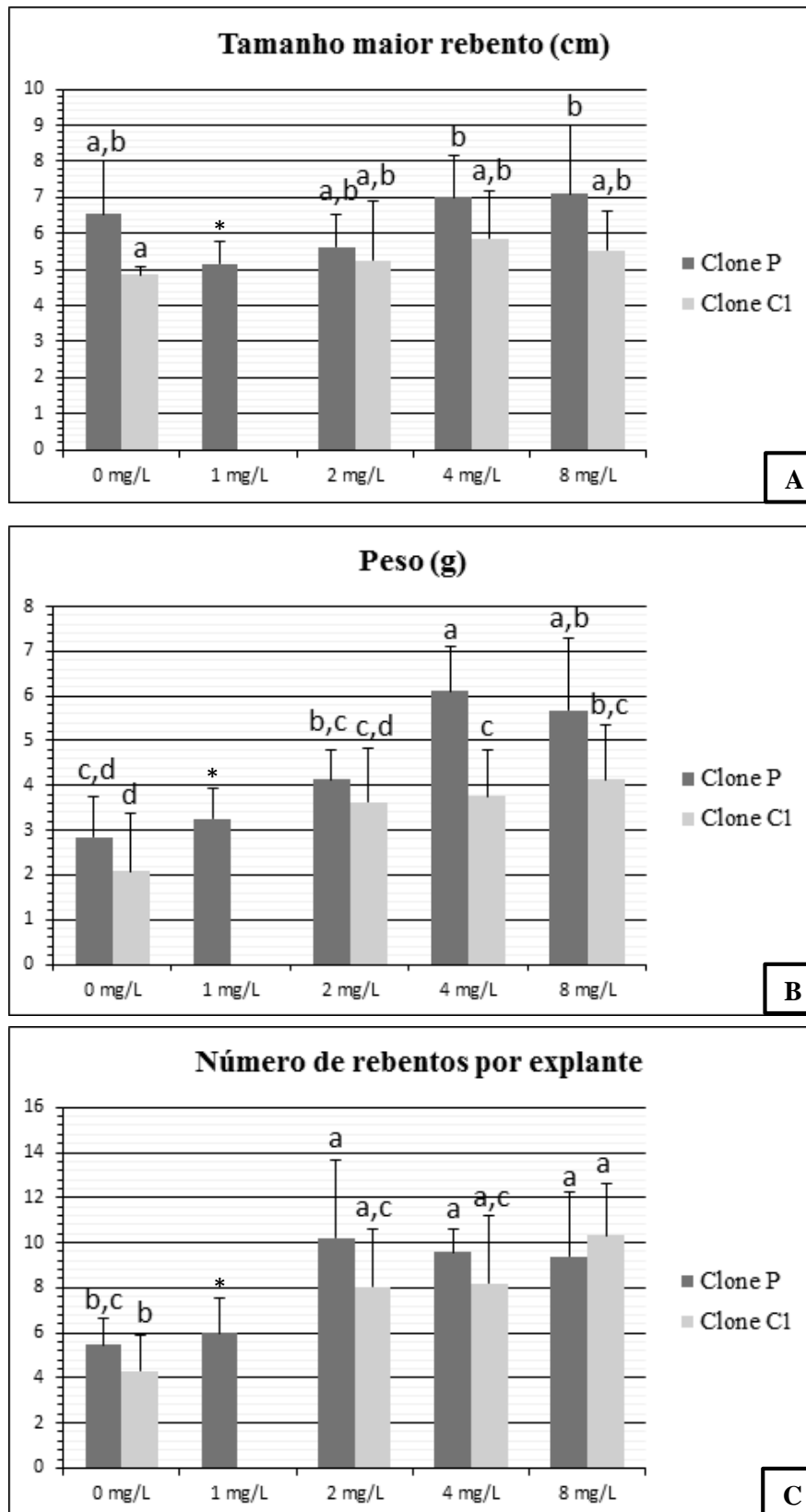


Figura 9. Efeito da AGP na proliferação de meristemas axilares. A) Tamanho dos rebentos; B) Peso do material contido nos balões Erlenmeyer; C) Número de rebentos por explante. Os valores indicados para 1mg/L são relativos apenas ao clone P (*). Os valores apresentados correspondem à média e ao respectivo desvio padrão. Valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) segundo o teste de Duncan.

RESULTADOS

3.1.2. Cultura em meios com ureia e tiourea

De forma a testar o efeito da ureia e tiourea na proliferação de rebentos em meio líquido, expuseram-se os rebentos caulinares do clone P, desprovidos de folhas, a 3 concentrações diferentes (2 mg/L, 5 mg/L e 10 mg/L) durante 5 semanas, sendo depois medidos os mesmos parâmetros referidos em 3.1.1.

Uma vez mais verificou-se uma acentuada oxidação dos explantes a partir dos quais emergiram novos rebentos e ainda a formação de sistema radicular na base dos explantes. A ocorrência da vitrificação do material foi também um processo recorrente, como verificado nos outros ensaios de proliferação em meio líquido apresentados.

Após 5 semanas de cultura, não foi observado qualquer aumento significativo, relativamente ao controlo, da acção da ureia e tiourea no crescimento e multiplicação dos rebentos. Neste caso, as diferenças significativas verificaram-se entre a acção dos dois compostos testados. Para a concentração de 10 mg/L de tiourea foram medidos rebentos significativamente maiores ($5,18 \pm 1,30$ cm) do que aqueles regenerados no meio com 2 mg/L ($3,23 \pm 0,28$ cm) e 5 mg/L de ureia ($2,95 \pm 1,30$) (Fig. 10A). Ainda assim, foi com a concentração de 10 mg/L, tanto de ureia como tiourea, que se verificou uma maior influência no desenvolvimento e multiplicação dos novos rebentos caulinares. As diferenças mais consideráveis, embora não significativas, verificaram-se na contagem do número médio de rebentos por explante para a concentração de 10 mg/L, com uma média de $6,28 \pm 3,80$ rebentos para a ureia e $8,13 \pm 3,63$ para a tiourea, contra os $4,06 \pm 1,42$ rebentos obtidos no controlo (Fig. 10C). A exposição a 5 mg/L de ureia levou à obtenção de um número mais reduzido de rebentos ($3,25 \pm 2,47$) e com menor tamanho ($2,95 \pm 1,30$) comparativamente ao grupo controlo ($4,06 \pm 1,42$ rebentos por explante com uma média de $4,03 \pm 1,08$ cm) (Fig. 10A). Já no caso da tiourea, a mesma concentração induziu valores mais elevados do que o controlo nos vários parâmetros medidos.

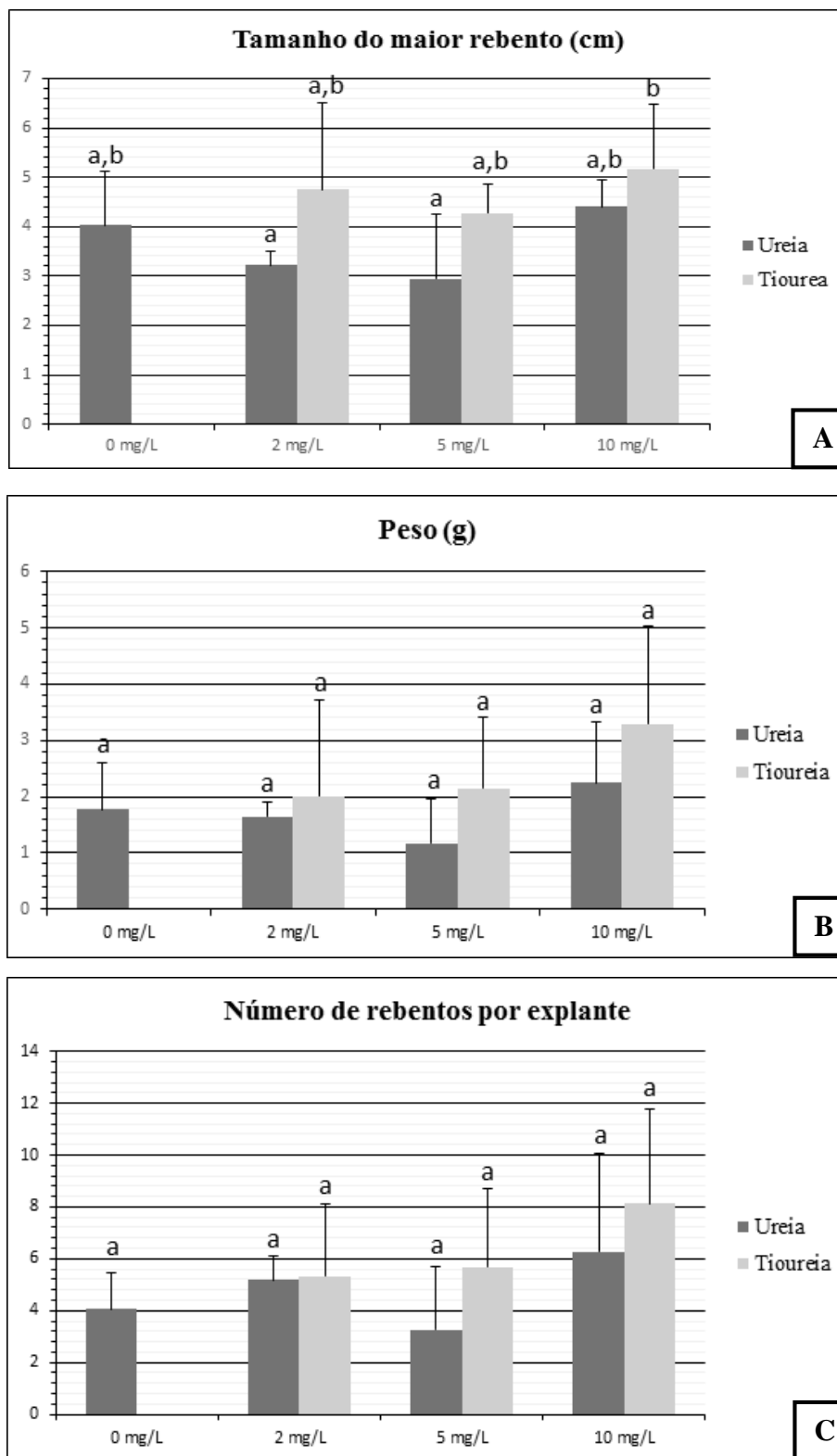


Figura 10. Efeito da ureia e tiourea na proliferação de meristemas axilares. A) Tamanho dos rebentos; B) Peso do material contido nos balões Erlenmeyer; C) Número de rebentos por explante. Os valores apresentados correspondem à média e ao respectivo desvio padrão. Valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) segundo o teste de Duncan.

RESULTADOS

3.1.3. Cultura em meios com 2iP ou zeatina

Da cultura dos explantes num meio Fossard suplementado com várias concentrações de 2iP resultou um fraco desenvolvimento e multiplicação de novos rebentos, comparativamente ao verificado no ensaio com zeatina. Para além do explante original, a exposição a esta hormona levou ao escurecimento de pequenas secções dos rebentos obtidos, bem como algumas folhas, o que as tornou consideravelmente frágeis, causando assim a sua separação do respectivo rebento caulinar (Fig. 11). Ainda assim, foi na concentração de 1 mg/L e 2 mg/L de 2iP que se observaram valores mais elevados para o peso, número de rebentos por explante e tamanho dos rebentos obtidos.

Com a cultura dos explantes num meio suplementado com zeatina (1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L) verificou-se a formação de massas de calos ao longo do mesmo, na zona de contacto entre este e a base dos rebentos formados e ainda nas folhas que permaneceram em contacto com o meio de cultura (Figs. 12A, 12B e 12C). A intensidade da formação do referido calo pareceu ser maior com a exposição a concentrações mais elevadas de zeatina. Foi ainda possível observar a formação de novos meristemas caulinares adventícios a partir do mesmo, indicando que pode tratar-se de calo organogénico (Fig. 12A).

À semelhança do que foi verificado com a citocinina 2iP, foram as concentrações de 1mg/L e 2 mg/L de zeatina que induziram um melhor desenvolvimento dos novos rebentos. Na quantidade de material contido nos balões Erlenmeyer, expostos às três concentrações testadas de zeatina, verificou-se um aumento significativo ($5,69 \pm 1,80$ g, $6,68 \pm 0,92$ g e $6,22 \pm 1,16$ g, para 1 mg/L, 2 mg/L e 4 mg/l respectivamente) relativamente ao controlo ($1,24 \pm 0,77$ g) e às várias concentrações de 2iP (Fig. 13B). Quanto ao número de rebentos por explante foi a concentração de 2 mg/L de zeatina ($8,5 \pm 0,33$ rebentos) que levou a um aumento significativo quando comparado com o controlo ($3,88 \pm 0,64$ rebentos). É importante referir que da exposição à concentração mais baixa de zeatina (1 mg/L) resultou num número significativamente maior de rebentos ($7,125 \pm 4,74$) do que o observado na concentração mais elevada de 2ip (4 mg/L) ($2,42 \pm 1,51$). A comparação da acção das duas hormonas testadas permite concluir que é a zeatina que aparenta estimular, de forma mais intensa, o desenvolvimento e multiplicação de novos rebentos, nomeadamente para parâmetros como o peso e número de rebentos por explante.



Figura 11. Aspecto dos rebentos regenerados da proliferação de meristemas num meio com 2iP.



Figura 12. Pormenor do calo formado nos tecidos dos rebentos caulinares e dos explantes mantidos num meio com zeatina. A) Calo formado na base de um rebento onde se observa a formação de novos meristemas caulinares adventícios. B) Calo apresentando estruturas globosas. C) Massas de calo formando-se maioritariamente ao longo do explante (seta). D) Aspecto geral dos rebentos obtidos.

RESULTADOS

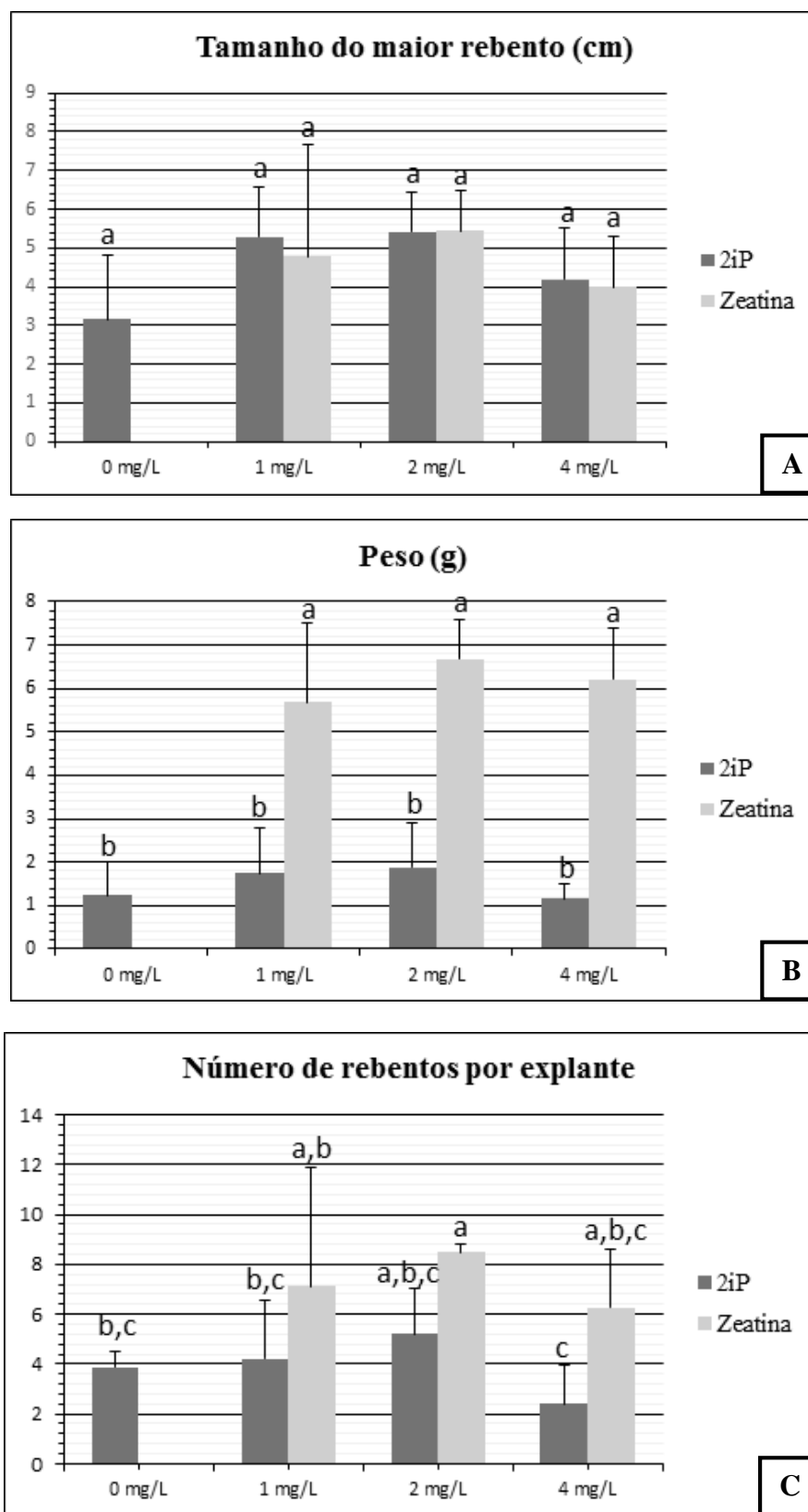


Figura 13. Efeito do 2iP e zeatina na proliferação de meristemas axilares. A) Tamanho dos rebentos; B) Peso do material contido nos balões Erlenmeyer; C) Número de rebentos por explante. Os valores apresentados correspondem à média e ao respectivo desvio padrão. Valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) segundo o teste de Duncan

3.2. ENRAIZAMENTO

3.2.1. Enraizamento *ex vitro*

Os rebentos regenerados a partir do ensaio de proliferação em cultura com AGP foram divididos em 3 grupos (controlo e previamente expostos a 4 mg/L e 8 mg/L). Estes foram submetidos ao enraizamento *ex vitro* e directamente aclimatizados num substrato de perlite durante um período de 4 semanas. No final foi avaliado o desenvolvimento do sistema radicular através de diferentes parâmetros, nomeadamente, o tamanho da maior raiz, número de raízes principais por rebento, percentagem de enraizamento e taxa de formação de raízes laterais. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 1.

Ao fim de 7 dias alguns dos rebentos mantidos no substrato com perlite (Fig. 14) não conseguiram tolerar as condições de aclimatização perdendo algum vigor, enquanto que noutros a contaminação dos tecidos por fungos levou à morte dos mesmos. Ainda assim, verificou-se uma taxa de sobrevivência na ordem dos 88% ao fim 1 semana. A taxa média de rebentos que iniciaram a formação de raízes no referido período de tempo foi de cerca de 32 %, e ao fim de 4 semanas as taxas de enraizamento já rondavam os 90 % (Fig. 15). Ainda que estatisticamente insignificantes, verificaram-se algumas diferenças na resposta dos rebentos dos três grupos ao sistema de enraizamento aqui descrito. Foram os rebentos expostos a 4 mg/L que formaram um maior número de raízes principais ($3,21 \pm 1,21$). Quanto ao tamanho da maior raiz e à taxa de formação de raízes



Figura 14. Rebentos obtidos da proliferação de meristemas em meio líquido mantidos num substrato de perlite.

RESULTADOS

laterais foi no controlo que se registaram valores mais elevados, com cerca de $2,9 \pm 0,62$ cm e com $90 \pm 17,32$ % dos rebentos a formar raízes laterais (Fig. 15).

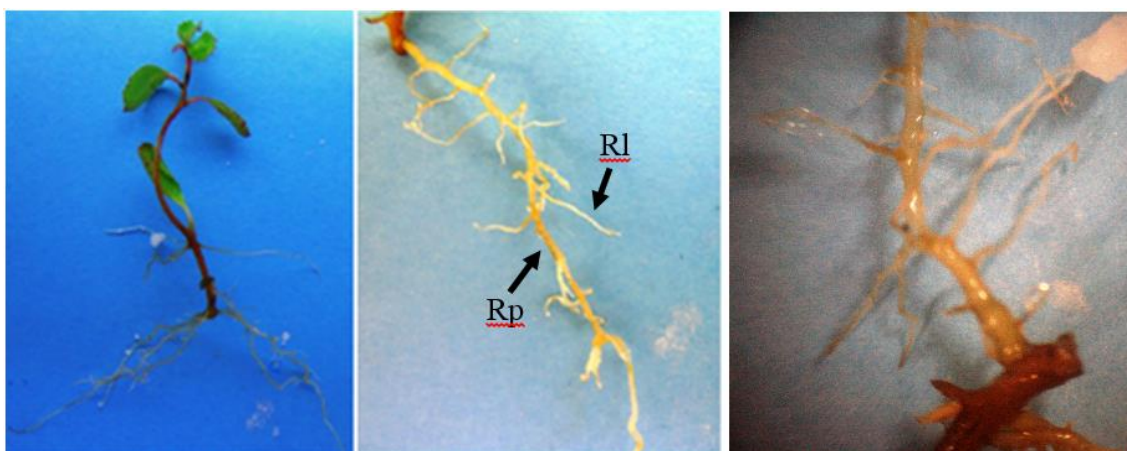


Figura 15. Pormenor das raízes formadas pelos rebentos mantidos num substrato de perlite após 4 semanas. Rp- raiz principal; Rs- raiz lateral.

Tabela 1. Diferenças registadas durante o enraizamento *ex vitro* dos rebentos previamente expostos a 4 mg/L e 8 mg/L de AGP e controlo. Os valores apresentados correspondem à média e ao respectivo desvio padrão das réplicas. Valores acompanhados pela mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Duncan.

	Enraizamento (%)	Comprimento da > raiz (cm)	Número raízes principais	Raízes laterais (%)
0 mg/L	$95,83 \pm 7,22^a$	$2,90 \pm 0,62^a$	$2,05 \pm 0,08^a$	$90 \pm 17,32^a$
4 mg/L	$94,44 \pm 9,62^a$	$2,71 \pm 0,56^a$	$3,21 \pm 1,21^a$	$85 \pm 13,23^a$
8 mg/L	$78,90 \pm 8,09^a$	$2,22 \pm 0,22^a$	$2,75 \pm 0,71^a$	$77,14 \pm 14,85^a$

3.2.2. Enraizamento *in vitro*

Nos ensaios de enraizamento *in vitro* dos rebentos obtidos da proliferação de meristemas com AGP, foram avaliados os mesmos parâmetros que no enraizamento *ex vitro*. O referido ensaio consistiu de duas fases: a indução do enraizamento num meio com IBA ($24,7 \mu\text{M}$) (Fig. 16A) e posterior alongamento das raízes, na ausência de auxinas (Fig. 16B). Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.

Tanto no controlo como nos outros dois grupos de rebentos previamente expostos a 4 mg/L e 8mg/L verificaram-se taxas de sobrevivência de 100% e taxas de enraizamento de $93,3 \pm 5,77$ %, $96,2 \pm 5,77$ % e 100%, respectivamente (Fig. 16C). Relativamente ao

tamanho das raízes verificou-se que os rebentos dos diferentes grupos mostraram um crescimento radicular relativamente uniforme (cerca de 1,60 cm) apresentando valores muito próximos entre si e, conseqüentemente, um desvio-padrão bastante reduzido. As taxas de formação de raízes laterais também se mostraram muito uniformes entre os 3 grupos, com $37 \pm 23 \%$, $33,7 \pm 20,2 \%$ e $36,7 \pm 5,8 \%$ para o controlo e para os rebentos expostos a 4 mg/L e 8 mg/L, respectivamente. Foi na contagem do número de raízes principais formadas que se observaram maiores diferenças entre os diferentes grupos, com os resultados a indicarem que a exposição dos rebentos a 4 mg/L e 8 mg/L de AGP (com $13,71 \pm 5,44$ e $13,8 \pm 5,2$ raízes) poderá estimular a formação de um maior número de raízes, uma vez que no controlo formaram-se uma média de $7,52 \pm 2,79$ raízes por rebento. No entanto, as diferenças aqui apontadas não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

No fim do período de enraizamento verificou-se a formação de pequenas massas de calo na extremidade basal dos rebentos, a partir da qual emergiram uma elevada quantidade de raízes. Outro aspecto peculiar observado foi a formação de raízes a partir das folhas, com maior incidência na zona da nervura central, um vez que se mantiveram em contacto com o meio de cultura.

Tabela 2. Diferenças registadas durante o enraizamento *in vitro* dos rebentos previamente expostos a 4 mg/L e 8 mg/L de AGP e controlo. Valores acompanhados pela mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Duncan.

	Enraizamento (%)	Comprimento > raiz (cm)	Número raízes principais	Raízes laterais (%)
0 mg/L	$93,33 \pm 5,77^a$	$1,63 \pm 0,16^a$	$7,52 \pm 2,79^a$	$37,04 \pm 23,13^a$
4 mg/L	$96,67 \pm 5,77^a$	$1,62 \pm 0,18^a$	$13,71 \pm 5,44^a$	$33,70 \pm 20,19^a$
8 mg/L	100 ± 0^a	$1,58 \pm 0,13^a$	$13,8 \pm 5,2^a$	$36,67 \pm 5,77^a$

RESULTADOS

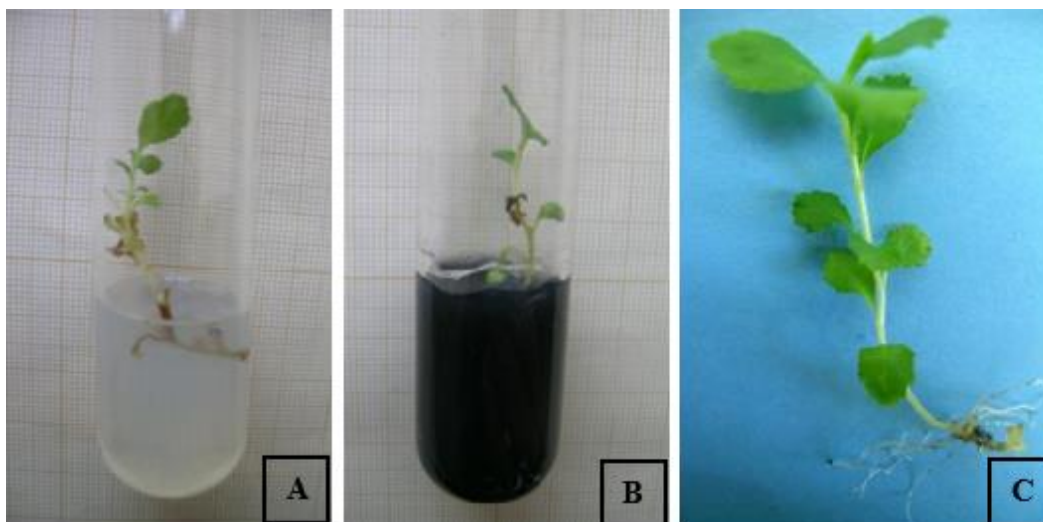


Figura 16. Enraizamento dos rebentos caulinares obtidos da cultura em AGP. A) Fase indução. B) Fase alongamento. C) Rebento após alongamento das raízes.

3.3. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Nos ensaios de indução de embriogênese somática foram testados o efeito de duas fontes de carbono no meio de indução, sacarose (S) e manitol (M), em diferentes concentrações. Ao meio de indução foi adicionado 3% sacarose (controle), 6% sacarose, 9% sacarose, 3% sacarose mais 6% manitol e 4,5% sacarose mais 4,5% manitol. Após cerca de 3 meses foram analisados aspectos como a formação de calos (Fig. 17A), indução de embriogênese somática e o número de embriões somáticos formados por explante. Os dados obtidos encontram-se na tabela 3.

No decorrer do ensaio ocorreu uma elevada oxidação das folhas mantidas em cultura, verificando-se ainda a formação de raízes adventícias num número relativamente reduzido de explantes (Fig. 17B). Após 15 dias de cultura já se verificava a formação de calos com origem na zona onde se efectuaram os cortes. Após 6 semanas de cultura foi contabilizada a formação de calos em cerca de 50 % dos explantes (Fig. 17A). Os vários tratamentos induziram taxas muito semelhantes de formação de calo e não se verificaram diferenças significativas na resposta dos dois clones.

Ao fim de 6 semanas de cultura foram observados os primeiros embriões somáticos. Estes apresentavam-se, em alguns casos, organizados em aglomerados (Fig. 17C, 17D) e em diferentes fases de desenvolvimento embrionário. Tendo em conta os dados obtidos nos vários parâmetros avaliados verificou-se que foi o clone P que melhor respondeu aos diferentes tratamentos. A exposição dos explantes foliares, do clone

RESULTADOS

referido, a quantidades cada vez maiores de sacarose (6% sacarose e 9% sacarose) levou à produção de um número crescente de embriões. Foi no meio suplementado com 9% de sacarose que ocorreu um aumento significativo do número médio de embriões por explante ($4,03 \pm 2,42$). No clone C1, o maior número de embriões foi observado no grupo controlo ($1,733 \pm 0,31$). Quanto às taxas de indução de embriogénese somática as diferenças significativas foram detectadas na resposta do clone P aos tratamentos com 9% sacarose ($36,67 \pm 20,81\%$), comparativamente ao efeito verificado na combinação da sacarose e manitol do clone P e dos valores obtidos com o clone C1 em todos os tratamentos.

Tabela 3. Valores obtidos na indução da embriogénese somática de dois clones expostos a diferentes fontes de açúcar. Cada valor corresponde à média das três réplicas e respectivo desvio-padrão. Valores acompanhados pela mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Duncan.

Clone	Fonte de carbono	Formação de calos (%)	Indução (%)	Nº de embriões
P	3% S (controlo)	$53,33 \pm 25,167^a$	$20 \pm 26,46^{ab}$	$1,033 \pm 1,62^b$
	6% S	$43,33 \pm 15,28^a$	$23,33 \pm 11,55^{ab}$	$1,567 \pm 1,04^b$
	9% S	$56,67 \pm 45,09^a$	$36,67 \pm 20,81^a$	$4,03 \pm 2,42^a$
	4,5% S + 4,5% M	$43,33 \pm 32,15^a$	$3,33 \pm 5,77^b$	$0,133 \pm 0,24^b$
	3% S + 6% M	$46,67 \pm 30,55^a$	0^b	0^b
C1	3% S (controlo)	50 ± 20^a	$16,67 \pm 5,77^b$	$1,733 \pm 0,31^b$
	6% S	$46,67 \pm 37,86^a$	$6,67 \pm 11,55^b$	$0,367 \pm 0,64^b$
	9% S	$66,67 \pm 15,28^a$	$3,33 \pm 5,77^b$	$0,1 \pm 0,17^b$
	4,5% S + 4,5% M	$36,67 \pm 20,82^a$	0^b	0^b
	3% S + 6% M	$40 \pm 17,32^a$	0^b	0^b

RESULTADOS

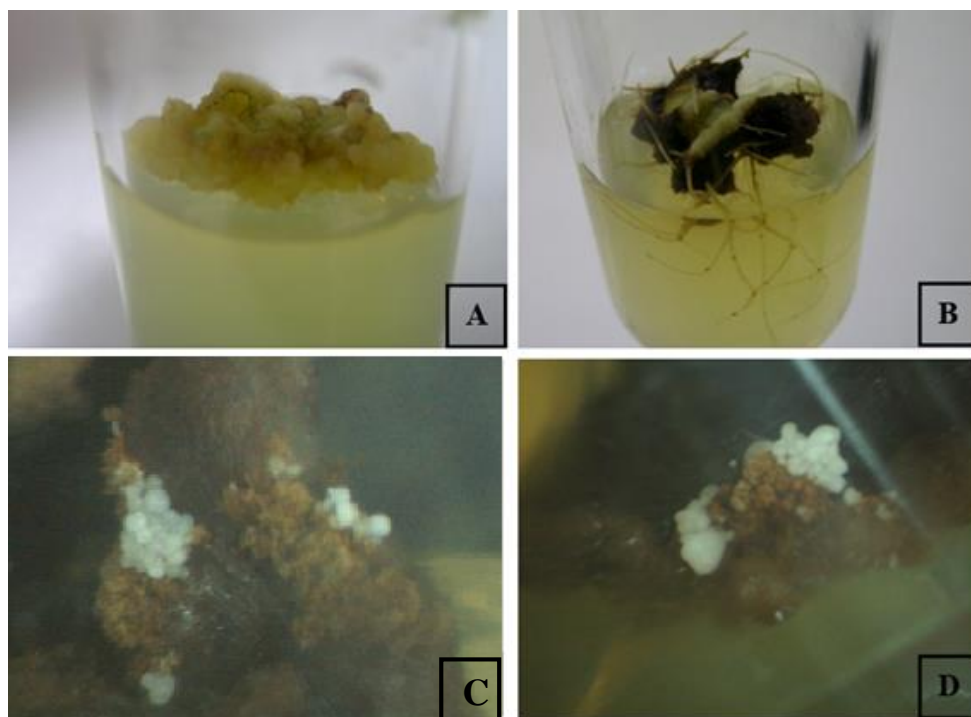
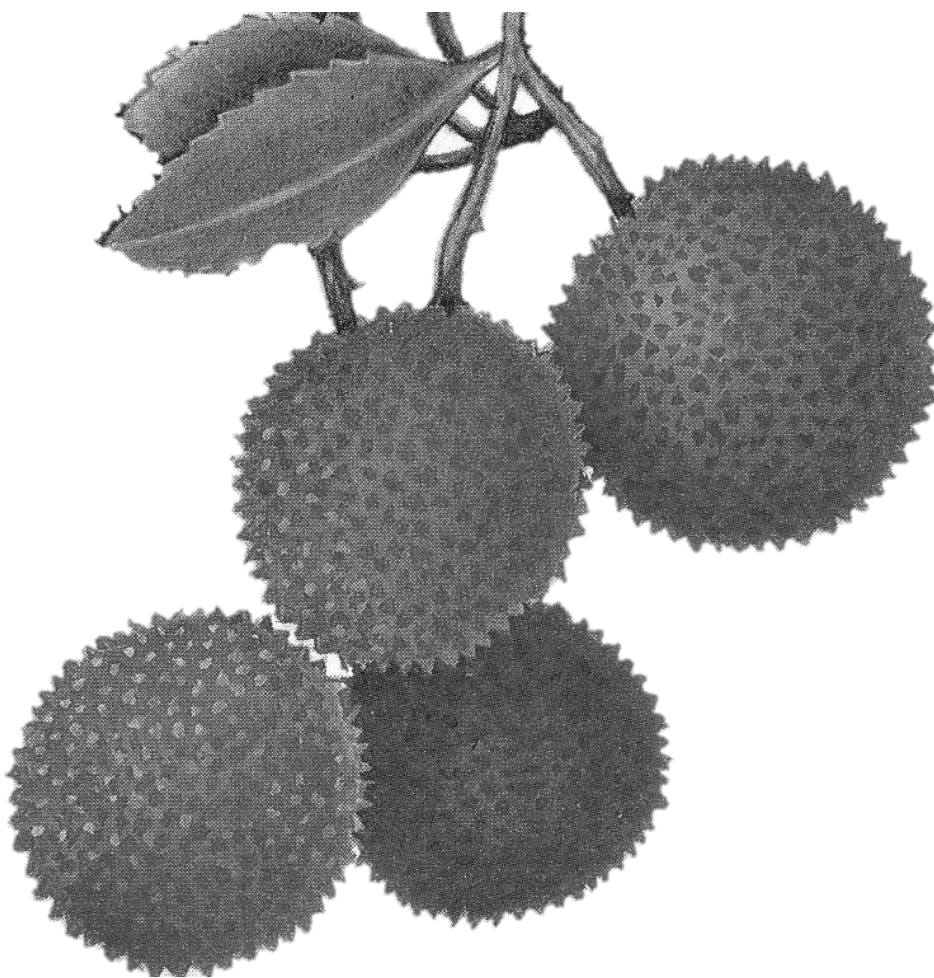


Figura 17. Aspectos observados durante a indução de embriogênese somática em *A. unedo*. A) Calo formado a partir do explante foliar. B) Formação de raízes adventícias. C) Embriões na fase globular formados na superfície do calo. D) Embriões somáticos organizados em aglomerados.

4. DISCUSSÃO



4.1. PROLIFERAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

A eficácia das diferentes técnicas de micropropagação estará sempre dependente da otimização de protocolos que, para além de proporcionarem as condições necessárias para que se obtenha a resposta pretendida dos explantes, possam tornar todo o processo mais eficaz.

A proliferação de rebentos em meio líquido é considerado um método relativamente simples e com um risco de ocorrência de variação somaclonal baixo, assegurando assim a estabilidade do genótipo que se pretende propagar, ao contrário de outras técnicas como embriogénese somática e organogénese indirecta (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2010; Leva *et al.*, 2012; Ngezahayo & Liu, 2014). Ainda que possa levar à multiplicação de rebentos com aspecto frágil e com algum grau de vitrificação, que podem complicar tentativas de enraizamento (Canhoto, 2010), a proliferação em meio líquido permite a obtenção de uma quantidade consideravelmente elevada de material a partir de um único explante (Thorpe, 2007). Tais características fizeram com que esta se tornasse num dos principais métodos de micropropagação de várias espécies lenhosas (Gomes, 2010). Apesar da existência de protocolos relativamente eficazes para a propagação de determinadas espécies, sempre existiu um interesse crescente na descoberta de novos compostos, naturais ou sintéticos, que possam estimular o crescimento e desenvolvimento dos tecidos cultivados.

No decorrer do trabalho aqui apresentado, procurou-se avaliar o efeito que diferentes elementos poderão induzir quando adicionados ao meio de cultura para proliferação em meio líquido. Testaram-se então os compostos AGP, zeatina, 2iP, ureia e tioureia.

4.1.1. Cultura em meios com AGPs

As diferentes funções das AGPs têm sido associadas a vários processos de proliferação e expansão celular, o que pode acabar por estimular o desenvolvimento das plantas (Chug & Khurana, 2002; Tan *et al.*, 2012; Ellis *et al.*, 2010). As AGPs são libertadas através de vesículas para a superfície celular, por exocitose, e foram já detectadas nos meios de cultura de vários sistemas de micropropagação, ainda que a concentrações muito reduzidas (Mallón *et al.*, 2023). A adição de AGPs exógenos para

DISCUSSÃO

os meios de cultura mostrou-se eficaz na estimulação de processos de proliferação celular e embriogénese somática de várias espécies, tanto em angiospérmica como gimnospérmicas (Mallón *et al.*, 2013)

Dos vários trabalhos consultados sobre o uso destes compostos na cultura de tecidos vegetais, nenhum faz referência ao seu efeito em espécies da família Ericaceae. Têm sido usadas como estimuladoras em protocolos de micropropagação para várias espécies como a cenoura (*Daucus carota*) (Kreuger & van Holst, 1993), *Quercus bicolor* (Mallón *et al.*, 2013), *Coffea* spp (Hector *et al.*, 2012), *Brassica napus* (Tan *et al.*, 2012) e *A. thaliana* (Willats & Knox, 1996), utilizadas essencialmente em protocolos de indução de embriogénese somática, organogénese e proliferação celular de culturas em suspensão. O uso de AGPs na proliferação de meristemas em meio líquido e o seu efeito no desenvolvimento e multiplicação dos rebentos de medronheiro é aqui documentada pela primeira vez.

Foi o clone P que melhor respondeu ao tratamento com AGP, verificando-se valores mais elevados nos vários parâmetros medidos. Para ambos os clones as concentrações de 4 mg/L e 8 mg/L induziram um aumento significativo no peso do material obtido nos balões Erlenmeyer, enquanto que no número de rebentos por explante as diferenças significativas foram detectadas em todas as concentrações testadas, relativamente ao controlo de cada genótipo.

Contudo, devem ser realizados mais ensaios testando outros factores, como por exemplo, a adição de concentrações mais elevadas de forma a perceber melhor como respondem os tecidos a esta glicoproteína. Ou ainda a adição de outros tipos de AGP extraídas, por exemplo, de espécies com elevada capacidade de proliferação, ou até AGPs que possam ser extraídos dos próprios tecidos do genótipo a usar, sendo depois incorporados no meio de cultura a concentrações mais elevadas (Toonen *et al.*, 1997). Uma outra alternativa que também permitirá avaliar outros aspectos do mecanismo de acção das AGPs poderá passar pela sua pré-incubação com endoquitinases. Vários trabalhos parecem indicar que as AGPs poderão actuar como substrato para a produção de oligossacarídeos, através da acção de enzimas (Kreuger & van Holst, 1996; Seifert & Roberts, 2007; Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000). O processamento das AGPs por estas enzimas já se mostrou eficaz em processos de embriogénese somática na cenoura (Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000). Os oligossacarídeos poderão posteriormente

actuar como moléculas de sinalização implicadas no desenvolvimento das plantas, ao regular os processos de proliferação e expansão celular (Seifert & Roberts, 2007).

4.1.2. Cultura em meios com ureia e tioureia

Da exposição dos explantes a estas duas fontes de azoto verificou-se que foi a tioureia que se mostrou mais eficaz ao estimular o desenvolvimento e multiplicação dos rebentos. Apesar de não se verificarem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a acção das diferentes concentrações conclui-se que, no caso da tioureia, as três concentrações testadas induziram valores mais elevados do que o controlo, nos parâmetros analisados. No caso da ureia, só a concentração de 10 mg/L se mostrou mais eficaz relativamente ao controlo.

A ureia poder ser usada como única fonte de azoto nos meios de cultura mas a incorporação de outros compostos azotados, como amónio ou iões de nitrato, pode levar a taxas de crescimentos mais elevadas (George *et al.*, 2008). Uma das principais implicações que resulta da incorporação destes elementos nos meios de cultura relaciona-se com o facto de, como resultado do metabolismo da ureia, ocorrer a libertação de iões de hidrogénio para os meios de cultura (George *et al.*, 2008). A acumulação excessiva destes iões pode alterar os níveis de pH a que os tecidos ficam expostos e, conseqüentemente, interferir com a disponibilidade dos outros elementos do meio, essenciais para o desenvolvimento dos rebentos caulinares (Pereira, 2014). Esta alteração do meio pode condicionar a resposta morfogénica uma vez que a acidificação dos tecidos interfere com o transporte polar de auxinas, hormonas fulcrais no controlo de vários tipos de processos de desenvolvimento. Deste modo, seria vantajoso, numa repetição do mesmo ensaio, complementar o meio de cultura com outras fontes de azoto para além da ureia e tioureia e ainda efectuar medições de pH no final do período de cultura. Desta forma, poder-se-ia avaliar o efeito que o metabolismo dos referidos compostos poderá induzir no pH do meio de cultura, bem como a capacidade dos tecidos tamponizarem o meio a que ficam expostos.

DISCUSSÃO

4.1.3. Cultura em meios com zeatina e 2iP

Desde a descoberta das citocininas estes reguladores de crescimento foram associados à estimulação da divisão e expansão celular e à formação de rebentos com origem nas gemas axilares ao inibir a dominância apical (Gaspar *et al.*, 1996; Kadota & Niimi, 2003; Ricci & Bertolotti, 2008; Trigiano & Gray, 2011).

Ao fim de 5 semanas de cultura dos explantes expostos às citocininas 2iP e zeatina, os rebentos regenerados mostraram um desenvolvimento normal, idêntico aos demais ensaios.

A hormona 2iP induziu um desenvolvimento mais acentuado dos rebentos para a concentração de 2 mg/L, no entanto, só se observaram diferenças significativas no peso fresco medido. As plântulas obtidas com a exposição ao 2iP apresentaram um aspecto muito frágil, o que pode ser explicado pela visível falta de vigor dos rebentos, fazendo com que uma elevada quantidade dos mesmos se mantivesse em contacto com o meio durante todo o período de cultura.

O enraizamento de rebentos formados em meio líquido ocorre geralmente a taxas mais reduzidas, o que pode ser causado pela sua vitrificação (Canhoto, 2010). Uma forma de contornar tais dificuldades será optar por manter os rebentos, previamente proliferados em meio líquido, num meio sólido de forma a fortalecer os tecidos das plantas, favorecendo assim o ulterior enraizamento e aclimatização.

A exposição a 1 mg/L, 2 mg/L e 4 mg/L de zeatina levou a um aumento significativo relativamente ao peso medido. A referida hormona mostrou-se mais eficaz que o 2iP no desenvolvimento e multiplicação de novos rebentos. As diferenças mais marcantes entre as duas citocininas observaram-se no peso e número de rebentos obtidos por explante. Para os parâmetros atrás referidos, a concentração de 2 mg/L de 2iP levou à formação de $5,21 \pm 1,79$ rebentos por explante com um peso total de $1,88 \pm 1,03$ g, enquanto que a exposição à zeatina levou à regeneração de $8,5 \pm 0,33$ rebentos por explante com um peso de $6,68 \pm 0,93$ g. Para melhor perceber esta discrepância tão elevada seria interessante repetir o referido ensaio e, no final do período de cultura, medir o tamanho de um maior número de rebentos regenerados e não apenas o de maior tamanho. O aparecimento de calos como resultado da exposição à zeatina também poderá ajudar a explicar as diferenças verificadas entre as duas hormonas quanto ao peso fresco do material obtido.

Outro aspecto que é importante referir prende-se à formação de massas de calo no material obtido com a exposição à zeatina. A intensidade da formação do calo pareceu estar dependente da concentração da dita hormona uma vez que, para concentrações cada vez mais elevadas, verificou-se também uma maior quantidade de calo formado. A sua distribuição pareceu incidir mais nos tecidos que se mantiveram em contacto com o meio de cultura. A formação *de novo* de meristemas caulinares adventícios a partir do calo formado parece indicar que este apresenta potencial morfogénico, no entanto seria interessante manter os calos obtidos em cultura de forma a avaliar a sua natureza. A formação de calo não é um acontecimento raro na proliferação em meio líquido, podendo também verificar-se com a exposição a BAP, hormona normalmente usada na proliferação do medronheiro (Martins, 2012). No entanto, conhecendo melhor a natureza do calo permitiria chegar a conclusões mais definitivas quanto ao sucesso da incorporação da zeatina no meio de cultura porque, ainda que tenha estimulado consideravelmente o desenvolvimento dos novos rebentos, a formação de calos poderá comprometer a viabilidade das novas plântulas e na sua capacidade de enraizarem.

4.2. ENRAIZAMENTO

Para que qualquer composto possa ter algum impacto num sistema de propagação é essencial que o mesmo, para além de induzir resultados favoráveis, não afecte a capacidade de enraizamento dos rebentos. Assim, de forma a avaliar o efeito que a exposição prévia às diferentes concentrações de AGP (4 mg/L, 8mg/L) poderão ter na formação da raiz, procedeu-se ao enraizamento das plântulas obtidas da proliferação em meio líquido, recorrendo a protocolos *ex vitro* e *in vitro*

4.2.1. Enraizamento *ex vitro*

No final de 4 semanas obtiveram-se taxas de enraizamento muito satisfatórias (80%-96%). Embora se tenham verificado diferenças nos parâmetros medidos entre os 3 grupos, estas não se mostraram estatisticamente significativas, o que permite concluir que o tratamento com AGP não interfere com a capacidade de enraizamento. No entanto, será interessante abordar as diferenças que se verificaram entre os dois sistemas de enraizamento e que poderão indicar diferenças na eficácia dos dois métodos referidos.

DISCUSSÃO

Foi no enraizamento *ex vitro* que se verificou a formação de raízes relativamente maiores (cerca de $2,61 \pm 0,47$ cm), comparativamente às obtidas no método *in vitro* ($1,53 \pm 0,23$ cm), ocorrendo também uma maior taxa de formação de raízes laterais ($84,05 \pm 15,13$ % para o sistema *ex vitro* e $35,8 \pm 16,36$ % para o enraizamento *in vitro*). Estas diferenças podem dever-se à menor resistência mecânica que o substrato de perlite impõe ao crescimento das raízes adventícias, comparativamente à encontrada no meio gelificado com o ágar.

Contudo, seria interessante complementar estas observações com estudos histológicos dos sistemas radiculares formados e proceder à aclimatização dos rebentos. Tal permitirá concluir se, de facto, as raízes formadas são funcionais, com ligação vascular aos tecidos internos da planta e capazes de suportar o crescimento *ex vitro* das plantas.

4.2.2. Enraizamento *in vitro*

De uma forma semelhante ao verificado no sistema de enraizamento *ex vitro*, também neste concluiu-se que não existem diferenças significativas na capacidade de enraizamento dos rebentos previamente expostos à AGP. No decorrer deste ensaio verificaram-se taxas de enraizamento elevadas (93-100 %) e taxas de sobrevivência na ordem dos 100 %. Tanto no tamanho das raízes como na taxa de formação de raízes laterais os valores obtidos foram muito uniformes e, por isso, apresentaram um desvio-padrão muito reduzido. As maiores diferenças encontraram-se no número médio de raízes principais formadas pelos rebentos. Nos rebentos previamente expostos a 4 mg/L e 8 mg/L de AGP foram contabilizadas $13,71 \pm 5,44$ e $13,8 \pm 5,19$ raízes laterais por rebento, respectivamente, enquanto que no grupo controlo contaram-se cerca de metade ($7,52 \pm 2,79$ raízes).

Neste sistema verificaram-se taxas de enraizamento e de sobrevivência pouco superiores às contabilizadas no método *ex vitro*, o que seria de esperar se se considerar que a estrutura dos rebentos regenerados em meio líquido pode afectar a capacidade destes tolerarem as condições *ex vitro*. Estes resultados poderão ser melhorados ao manter os rebentos, previamente proliferados em meio líquido, num meio sólido.

Durante o período de enraizamento verificou-se a formação de pequenos calos na extremidade basal dos rebentos e também em algumas folhas, que permaneceram em contacto com o meio de cultura. Desta massa emergiram uma elevada quantidade de raízes adventícias, no entanto, estas podem apresentar uma fraca conexão vascular com os tecidos internos da planta (Canhoto, 2010). Será por isso vantajoso recorrer, como referido anteriormente, a análises histológicas e à aclimatização dos rebentos de forma a avaliar a viabilidade da estrutura radicular formada.

4.3. EMBRIOGÉNESE SOMÁTICA

São factores como as hormonas exógenas adicionadas, ou as condições de stresse a que os explantes ficam expostos durante a fase de indução, que levam à aquisição da capacidade embriogénica (Yang & Zhang, 2010). Tais condições não só promovem a desdiferenciação dos tecidos como também induzem a embriogénese somática (Fehér, 2003). Os níveis de stresse a que os explantes devem ficar expostos para que seja induzida a resposta embriogénica pretendida são determinantes para a eficácia de todo o processo. Níveis muito elevados, que ultrapassem a capacidade de tolerância dos explantes, podem levar à morte dos tecidos, enquanto que níveis muito reduzidos tendem a induzir mecanismos de adaptação por parte do explante, o que poderá diminuir a intensidade da resposta do mesmo (Fehér, 2003). Os açúcares são componentes essenciais em qualquer sistema de cultura *in vitro*, constituem uma importante fonte de energia e criam as condições osmóticas apropriadas ao metabolismo dos tecidos (Anthony *et al.*, 2004). Para além da sua função nutricional, estes elementos, quando presentes em quantidades mais elevadas, podem ser usados para criar os níveis de stresse necessários para estimular a competência embriogénica dos explantes (Anthony *et al.*, 2004; Canhoto, 2010; Fehér, 2003).

No ensaio apresentado verificaram-se taxas de formação de calos relativamente semelhantes entre os dois clones sujeitos aos diferentes tratamentos. Dos dois clones testados foi o P que melhor respondeu às condições de stresse impostas. A exposição dos explantes do clone P a concentrações cada vez mais elevadas de sacarose (6% e 9%) levou à produção de um número crescente de embriões, tendo-se verificado a formação de $4,03 \pm 2,42$ embriões por explante, mantidos no meio suplementado com 9% sacarose. A combinação de sacarose com manitol (4,5% + 4,5%), no clone P, levou à formação de

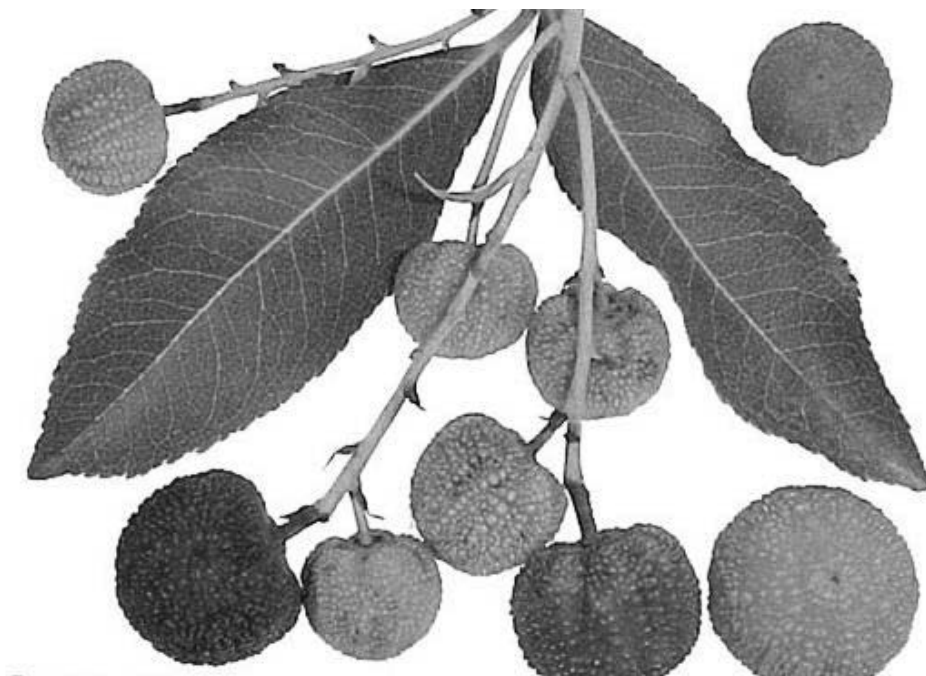
DISCUSSÃO

um número bastante reduzido de embriões, enquanto que no clone C1 impediu a formação dos mesmos. Na exposição a 3% sacarose mais 9% de manitol também não se verificou a formação de embriões somáticos em ambos os clones.

Os resultados obtidos de outros trabalhos de indução de embriogénese somática a partir de explantes foliares do clone P permitiram a observação de uma maior capacidade embriogénica deste genótipo, comparativamente ao C1 (Martins, 2012; Pereira, 2014). Os resultados aqui apresentados acrescentam ainda que, comparativamente ao outro clone testado, ao genótipo P pode estar associada uma melhor capacidade de tolerar as condições de stresse criadas pelas diferentes concentrações de açúcar. A sacarose constitui a fonte de carbono mais utilizada para a indução de embriogénese somática em diferentes espécies, incluindo o medronheiro (Gaj, 2004; Gomes & Canhoto, 2009). Anthony *et al.* (2004) também testou o efeito de diferentes quantidades de açúcares na embriogénese somática de outra ericácea, *Leucopogon verticillatus*. De forma semelhante ao apresentado neste trabalho, o referido autor observou um incremento no número de embriões somáticos com o aumento da concentração de sacarose (2%, 3%, 4%), verificando-se, também, taxas de formação de calo relativamente homogéneas nos vários tratamentos.

A reduzida resposta embriogénica obtida em ambos os genótipos, quando expostos à combinação de sacarose e manitol, poderá indicar que as quantidades usadas foram de tal ordem que os explantes não as conseguiram tolerar, o que pode ter levado à plasmólise das células. Outros trabalhos indicam que o manitol é menos eficaz na indução de embriogénese somática em espécies como *Cucumis sativus* e *Nicotiana tabacum*, chegando mesmo a impedir a formação de calos e embriões (Lou & Kako, 1995). Face estes dados, seria interessante testar a acção do manitol com outras fontes de carbono de forma a perceber se este poderá ser usado eficazmente na estimulação da embriogénese somática. Outra alternativa seria, ao invés de sujeitar os explantes a concentrações elevadas de açúcares durante longos períodos de tempo, expô-los igualmente a quantidades elevadas mas durante um período relativamente reduzido.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS



CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os diferentes métodos de propagação desenvolvidos ao longo dos anos constituem uma ferramenta essencial para programas de melhoramento, na medida em que permitem a regeneração de novos indivíduos geneticamente idênticos. Com o desenvolvimento das técnicas de propagação *in vitro* muitas das complicações associadas às formas de propagação mais convencionais foram ultrapassadas, permitindo uma maior rentabilidade económica quando aplicadas à comercialização de certas espécies.

São várias as técnicas associadas à cultura de tecidos vegetais *in vitro*, desde a embriogénese somática à proliferação de meristemas. A variação somaclonal, vitrificação dos rebentos regenerados em meio líquido e a dificuldade de enraizamento dos mesmos constituem obstáculos consideráveis na micropropagação do medronheiro e que deverão ser considerados em estudos futuros. O enraizamento e aclimatização das plantas regeneradas são a última etapa da propagação *in vitro* e constitui, muitas vezes, um passo problemático que poderá originar consequências económicas consideráveis.

Dada a importância da existência de protocolos eficazes para micropropagação do medronheiro, este trabalho procurou aperfeiçoar a cultura *in vitro*, testando o efeito que diferentes elementos adicionados aos meios de cultura poderão induzir no sucesso das mesmas.

O efeito que as AGPs poderão induzir na cultura *in vitro* de várias espécies vegetais tem sido alvo de estudo desde os anos 80, no entanto, até à data não existem quaisquer registos do seu uso para a propagação de espécies da família Ericaceae. Neste trabalho verificou-se que a exposição dos explantes a concentrações de 4 mg/L e 8 mg/L de AGP estimulou a proliferação e desenvolvimento dos rebentos emergentes. O pré-tratamento das AGP com endoquitinases poderá aumentar ainda mais a eficácia destas macromoléculas. Concluiu-se ainda que, através do enraizamento *in vitro* e *ex vitro* dos rebentos obtidos, a assimilação da AGP pelos tecidos do medronheiro não interferiu com a formação e desenvolvimento das raízes. Este ensaio mostrou ainda que o sistema de enraizamento *ex vitro* usado constitui um método eficaz e que poderá ser usado como uma alternativa mais simples e económica no medronheiro.

Ainda que se tenha verificado uma maior eficácia da tioureia na proliferação dos meristemas, relativamente à ureia, não foram encontradas diferenças significativas comparativamente aos valores obtidos no controlo. Estes resultados podem ser melhorados com a incorporação de outros compostos azotados. Em estudos futuros deve-

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

se ter em conta o efeito que a libertação de iões de hidrogénio, como resultado do metabolismo da ureia, pode exercer no pH do meio, afectando a disponibilidade dos elementos do meio de cultura e, eventualmente, o transporte polar de auxinas, um mecanismo fisiológico que é responsável pelo controlo de muitos processos de desenvolvimento.

As citocininas são já conhecidas pelo seu efeito na estimulação do desenvolvimento das plantas. Neste trabalho também se avaliou o efeito que outras hormonas, da mesma classe, poderão demonstrar. A citocinina BAP é normalmente usada para a proliferação do medronheiro, tanto em meio líquido como sólido, mas a substituição desta pela zeatina produziu melhores resultados. No entanto, a cultura com zeatina resultou na formação de calos, aparentemente morfogénicos, por isso, serão necessários estudos mais detalhados, de forma a determinar se a ocorrência destes calos poderá afectar o normal desenvolvimento dos rebentos. Futuramente, devem ser realizados ensaios de campo com os rebentos obtidos da proliferação de meristemas. Só dessa forma se poderá ter uma melhor perspectiva da qualidade das plantas obtidas e concluir sobre o potencial que as diferentes condições testadas poderão exercer na optimização dos protocolos de propagação do medronheiro.

Dos ensaios de embriogénese somática obtiveram-se taxas de indução relativamente reduzidas, o que acabou por também se traduzir num número reduzido de embriões. A resposta embriogénica dos diferentes explantes verificou-se bastante heterogénea. A exposição dos explantes foliares do clone P a 9% sacarose induziu um aumento significativo do número de embriões somáticos. A combinação de sacarose com manitol levou a uma diminuição acentuada no número de embriões. A exposição a concentrações mais elevadas de sacarose, ou outras combinações diferentes de fontes de carbono, poderá ajudar a perceber se as condições de stresse induzidas poderão ser usadas de forma eficiente na indução da embriogénese somática.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Alarcão-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G. & Leitão, M. C. A. The *Arbutus* Berry: Studies on its Color and Chemical Characteristics at Two Mature Stages. *J. Food Compos. Anal.* **14**, 27–35 (2001).

Anderson, W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *J. American Soc. Hortic. Sci.* **109**, 343-347 (1984).

Anthony, J. M., Senaratna, T., Dixon, K. W. & Sivasithamparam, K. Somatic embryogenesis for mass propagation of Ericaceae – a case study with *Leucopogon verticillatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **76**, 137–146 (2004).

Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S. & Ferreira, I. C. F. R. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* **120**, 247–254 (2010).

Canhoto, J., Lopes, M. L. & Gomes, F. Propagation of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree) through somatic embryogenesis maturation and conversion of somatic embryos. *New Biotech.* **225**, 314 (2009).

Canhoto, J. M. *Biotechnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.* (2010)

Castaldi, S. *et al.* Inhibition of net nitrification activity in a Mediterranean woodland: Possible role of chemicals produced by *Arbutus unedo*. *Plant Soil* **315**, 273–283 (2009).

Cavaco, T., Longuinho, C., Quintas, C. & De Carvalho, I. S. Chemical and microbial changes during the natural fermentation of strawberry tree (*Arbutus Unedo* L.) fruits. *J. Food Biochem.* **31**, 715–725 (2007).

Celikel, G., Demirsoy, L. & Demirsoy, H. The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* **118**, 115–119 (2008).

Chapman, A. *et al.* Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plants. II. Ultrastructural study and pectin immunolocalization on chicory embryos. *Can. J. Bot.* **78**, 824–831 (2000).

- Chugh, A. & Khurana, P. Gene expression during somatic embryogenesis- recent advances. *Current Sci.* **83**, 715-730 (2002).
- Dantu, P. K. & Tomar, U. K. Somatic embryogenesis. In: Bhojwani, S. & Dantu, P. K. *Plant Tissue Culture: And Introductory Text.* (1 Ed.) *Springer.* New Delhi. (2013).
- De Fossard, R. A., Myint, A. & Lee, E. A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum*) pith tissue callus. *Physio. Plantarum.* **31**, 125-130 (1974).
- Dib, M. E. A., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, N. & Tabti, B. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *J. Saudi Chem. Soc.* **17**, 381–385 (2013).
- Djabou, N. *et al.* Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of the phenolic composition of Algerian *Arbutus unedo* L. roots. *Pharmacogn. J.* **5**, 275–280 (2013).
- Dodeman, V. L., Ducreux, G. & Kreis, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* **48**, 1493–1509 (1997).
- El-Mahrouk, M. E-S., Dewir, Y. H. & Omar, A. M. K. In vitro propagation of adult strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) through adventitious shoot and somatic embryogenesis. *Propag. Orn. Plants.* **10**, 93-98 (2010).
- El Haouari, M., López, J. J., Mekhfi, H., Rosado, J. A. & Salido, G. M. Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 325–31 (2007).
- Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C. J. & Bacic, A. Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiol.* **153**, 403–419 (2010).
- Ertekin, M. & Kirdar, E. Breaking seed dormancy of strawberry tree (*Arbutus unedo*). *Int. J. Agric. Biol.* **12**, 57–60 (2010).
- Fehér, A., Pasternak, T. P., & Dudits, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **74**, 201–228 (2003).

Figueiredo, P. & Gomes, F. Rapid propagation of *A. unedo* adult selected plants using *ex vitro* rooting. 8th International Symposium on In Vitro Culture and Horticulture Breeding. Coimbra. (2013)

Gaba, V. Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture and Development. In: Trigiano, N. R. & Gray, D. J. Plant Development and Biotechnology. *CRC Press*. Florida (2005).

Gaj, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Growth Regul.* **43**, 27–47 (200449).

García-Gonzales, R., Quiroz, K., Carrasco, B. & Caligari, P. Plant tissue culture : Current status, opportunities and challenges. *Cien. Inv. Agr.* **37**, 5–30 (2010).

Garg, B. K., Burman, U. & Kathju, S. Influence of thiourea on photosynthesis, nitrogen metabolism and yield of clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) under rainfed conditions of Indian arid zone. *Plant Growth Regul.* **48**, 237–245 (2006).

Gaspar, T. *et al.* Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **1**, 272–289 (1996).

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

George, E. F. & de Klerk, G. J. Chapter 3: The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. *Plant Propag. by Tissue Cult. 3rd Ed. Vol. 1. Backgr.* 65–114 (2008).

Godinho-ferreira, P., Azevedo, A. & Rego F. Carta da Tipologia Florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana.* **13**, 1-34 (2005).

Gomes, F., Lopes, M. L., Santos, T. & Canhoto, J. M. Micropropagation of selected trees of *Arbutus unedo* L. through axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. *Acta Hortic.* **839**, 111–116 (2009).

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

Gomes, F., & Canhoto, J. M. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *Vitr. Cell. Dev. Biol. – Plant.* **45**, 72–82 (2009).

Gomes, F., Costa, R., Ribeiro, M. M., Figueiredo, E., & Canhoto, J. M. Analysis of genetic relationship among *Arbutus unedo* L. genotypes using RAPD and SSR markers. *J. For. Res.* **24**, 227–236 (2012).

Gomes, F., Gama, J., Figueiredo, P., Santo, A. R., & João, C. Clonagem de plantas selecionadas de medronheiro e a sua avaliação de campo. Disponível em <http://www.greenclon.pt/artigofgomesalgarve.pdf> (acedido em 3/04/2015). 1–8 (2014).

González, E. A., Agrasar, A. T., Castro, L. M. P., Fernández, I. O. & Guerra, N. P. Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and arbutus berry (*Arbutus unedo*, L.) and characterization of their distillates. *Food Res. Int.* **44**, 1419–1426 (2011).

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

Gruère, G., Giuliani, A. & Smale, M. Marketing underutilized plant species for the benefit of the poor: A Conceptual Framework. *IFPRI Environmental and Protection Technology Discussion Paper 154*. 1–54 (2006).

Hammami, I., Jellali, M., Ksontini, M. & Rejeb, M. N. Propagation of the Strawberry Tree Through Seed (*Arbutus unedo*). *Int. J. Agricult. & Bio.* **7**, 457–459 (2005).

Hileman, L., Vasey, M. & Parker, V. T. Phylogeny and biogeography of the Arbutioideae (Ericaceae): implications for the Madrean-Tethyan hypothesis. *Syst. Bot.* **26**, 131–143 (2001).

Hu, Y., Qin, Y. & Zhao, J. Localization of an arabinogalactan protein epitope and the effects of Yariv phenylglycoside during zygotic embryo development of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma.* **229**, 21–31 (2006).

- Kamada, H. & Harada, H. Molecular regulation of somatic embryogenesis. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. **37**, 1257–1265 (1992).
- Karp, A. Somaclonal variation as tool for crop improvement. *Euphytica*. **85**, 295–302 (1995).
- Klerk, G-J. Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In Vitro Cell. & Dev. Biol.-Plant*. **38**, 415–422 (2002).
- Konstantinidis, P., Tsiourlis, G. & Xofis, P. Effect of fire season, aspect and pre-fire plant size on the growth of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree) resprouts. *For. Ecol. Manage.* **225**, 359–367 (2006).
- Kreuger, M. & van Holst, G. J. Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Mol. Biol.* **30**, 1077–1086 (1996).
- Lopes, L., Sá, O., Pereira, J. A. & Baptista, P. Genetic diversity of Portuguese *Arbutus unedo* L. populations using leaf traits and molecular markers: An approach for conservation purposes. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **142**, 57–67 (2012).
- Lou, H. & Kako, S. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Scientia Horticulture*. **64**, 11-20 (1995)
- Mackay, W. A. Micropropagation of Texas madrone, *Arbutus xalapensis* H.B.K. *HortScience*. **31**, 1028–1029 (1996).
- Majewska-Sawka, A. & Nothnagel, E. A. The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development. *Plant Physiol.* **122**, 3–9 (2000).
- Mallón, R., Martínez, T., Corredoira, E. & Vieitez, A. M. The positive effect of arabinogalactan on induction of somatic embryogenesis in *Quercus bicolor* followed by embryo maturation and plant regeneration. *Trees - Struct. Funct.* **27**, 1285–1296 (2013).
- Malheiro, R. *et al.* *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Ind. Crops Prod.* **37**, 473–478 (2012).

Martins, J. F. S. Estudos de cultura *in vitro* de medronheiro (*Arbutus unedo* L.) aplicados ao seu melhoramento. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra. (2012).

McLelland, M. T., Smith, M. A. L. & Carothers, Z. B. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent micrcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **32**, 115–123 (1990).

Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P. & Carvalho, M. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 2285–91 (2011).

Mukul-López, H. G., de-la-Peña, C., Galaz-Ávalos, R. M. & Loyolavargas-Vargas, V. M. Evaluation of the extracellular proteome profile during the somatic embryogenesis process of *Coffea* spp. *J. Mex. Chem. Soc.* **56**, 72–79 (2012).

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

Ngezahayo, F. & Liu, B. Axillary Bud Proliferation Approach for Plant Biodiversity Conservation and Restoration. *Int. J. Biodivers.* **2014**, 123-150 (2014).

Oliveira, I. *et al.* Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Res. Int.* **44**, 1401–1407 (2011).

Oliveira, I., Guedes De Pinho, P., Malheiro, R., Baptista, P. & Pereira, J. A. Volatile profile of *Arbutus unedo* L. fruits through ripening stage. *Food Chem.* **128**, 667–673 (2011).

Pedro, J.G. (Eds). Carta da distribuição de figueira e medronheiro- notícia explicativa. D.G.A., *Ministério do Ambiente e Recursos Naturais, Lisboa.* (1994)

Pereira, R. G. Efeito do pH e da fonte de Azoto na cultura *in vitro* de medronheiro (*Arbutus unedo* L.). Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra. (2014).

Plano Estratégico Nacional- Desenvolvimento Rural 2007-2013. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas. (2009)

- Popper, Z. A. Extraction and detection of Arabinogalactan Proteins. *The Plant Cell Wall*. **8**, 245-254 (2011).
- Prada, M. A. & Arizpe D. (Eds). Riparian tree and shrub propagation handbook: an aid to riverine restoration in the Mediterranean Region. *Generalitat Valenciana*. (2008).
- Prasar, R. Fertilizer urea, food security, health and the environment. *Current Science*. **75**, 677-683(1998).
- Radcliffe, C. A., Affolter, J. M. & Wetzstein, H. Y. In Vitro Shoot Regeneration of Georgia Plume, *Elliottia racemosa*, from Multiple Genotypes Collected from Wild Populations. **46**, 287–290 (2011).
- Rasmont, P. *et al.* Analysis of Pollen and Nectar of *Arbutus unedo* as a Food Source for *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* **98**, 656-664 (2005).
- Reinert, J. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaften*. **45**, 344-345 (1958).
- Ricci, a. & Bertolotti, C. Urea derivatives on the move: Cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement depend on chemical structure. *Plant Biol.* **11**, 262–272 (2009).
- Ruiz-Rodríguez, B. M. *et al.* Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Res. Int.* **44**, 1244–1253 (2011).
- Sá, O., Pereira, J. A. & Baptista, P. Optimization of DNA extraction for RAPD and ISSR analysis of *Arbutus unedo* L. leaves. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 4156–4164 (2011).
- Santo, D. E., Galego, L., Gonçalves, T. & Quintas, C. Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Res. Int.* **47**, 45–50 (2012).
- Savé, R., Alegre, L., Pery, M. & Terradas, J. Ecophysiology of after-fire resprouts of *Arbutus unedo* L. *Orsis*. **8**, 107–119 (1993).

Seifert, G. J. & Roberts, K. The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 137–161 (2007).

Silvapa, 2014: <http://silvapa.com/>, aceso em 23/05/2015.

Solís-Ramos, L. Y., Andrade-Torres, A., Sáenz, L. A., Oropeza, C. M. & Castaño, E. Somatic embryogenesis in recalcitrant plants. *Embryogenesis* **19**, 597–618 (2012).

Steward, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*. 705-708 (1958).

Tan, L. *et al.* Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Front. Plant Sci.* **3**, 1–10 (2012).

Thorpe, T. A. History of plant tissue culture. *Mol. Biotechnol.* **37**, 169–180 (2007).

Tiffney, B. H. The Eocene North Atlantic land bridge: its importance in Tertiary and modern phytogeography of the Northern Hemisphere. *J. Arnold Arbor.* **66**, 243–273 (1985).

Toonen, M. J., Schmidt, E. D. L., van Kammen, A. & De Vries, S. C. Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta.* **203**, 188–195 (1997).

Torres, J. A. *et al.* *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula Mountains. *Plant Ecol.* **160**, 207–223 (2002).

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

Yang, X. & Zhang, X. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **29**, 36–57 (2010).

