

DM

**Estudo fenológico e bioquímico  
da germinação de 4 espécies nativas da Madeira**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Abel Martinho Silva Martins**

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

*A Nossa Universidade*

[www.uma.pt](http://www.uma.pt)

fevereiro | 2024

# **Estudo fenológico e bioquímico da germinação de 4 espécies nativas da Madeira**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Abel Martinho Silva Martins**

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTAÇÃO

Miguel Ângelo Almeida Pinheiro de Carvalho

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho foi uma realidade graças ao apoio e orientação valiosa de diversas pessoas, às quais, expresso a minha sincera gratidão.

Ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Ângelo Almeida de Carvalho, manifesto o meu profundo agradecimento pela dedicação, incentivo, realização das revisões necessárias e tempo disponibilizado, sem os quais esta dissertação de mestrado não teria sido possível.

Um especial agradecimento à Doutora Carla Gouveia, Investigadora do ISOPlexis, pelo interesse, pelo apoio, disponibilidade para ajudar sempre que lhe foi solicitado, e pelo aconselhamento ao longo de toda a realização deste projeto.

Ao Filipe Ganança, Técnico Superior do ISOPlexis, e ao Humberto Nóbrega, Técnico Superior e Curador do germobanco do ISOPlexis, por terem disponibilizado apoio e transmitido os seus conhecimentos nas respetivas áreas de intervenção.

Um agradecimento particular ao Eng.º Manuel Filipe, Presidente do Instituto das Florestas e Conservação da Natureza, IP-RAM, por ter permitido a realização de ensaios no laboratório do Jardim Botânico e testes em campo nos locais sob gestão daquele Instituto.

Agradeço igualmente ao Banco de Germoplasma ISOPlexis e à Universidade da Madeira pelo fornecimento de todos os recursos essenciais à realização deste projeto.

Por fim, um particular agradecimento à minha família e a todos os que aqui não foram referidos e que direta ou indiretamente me incentivaram e ajudaram a concluir esta etapa.

## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo aprofundar o conhecimento do processo de germinação de quatro espécies nativas lenhosas da Madeira (*Teline maderensis* Webb & Berthel., *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousa, Fern. Prieto, E. Dias, J.C. Costa & C. Aguiar, *Vaccinium padifolium* Sm. e *Myrica faya* Aiton). O estado do conhecimento sobre a germinação destas espécies é limitado, condicionando a obtenção de sementes com qualidade que permitam assegurar a viabilidade e elevados padrões de germinação. Assim, foram realizados ensaios com sementes em diferentes estados de maturação. Lotes de sementes foram colocados a germinar em locais distintos da ilha da Madeira, de forma a testar a influência das condições edafoclimáticas. Foi igualmente testada a germinação das sementes em estufa e em diferentes tipos de substratos. Posteriormente, sementes foram submetidas a distintos tratamentos pré-germinativos e colocadas em câmaras fitoclimáticas para estudar a presença de dormências associadas. Por fim, avaliou-se a alteração da composição bioquímica das sementes durante a germinação e o papel de dois marcadores do metabolismo.

O sucesso germinativo variou conforme as espécies. O *Vaccinium padifolium* apresentou a melhor taxa de germinação nas sementes com estado de maturação mais avançado. A espécie exibiu um sucesso superior a 75% nos ensaios realizados em câmara fitoclimática. O *Laurus novocanariensis* obteve a melhor percentagem de germinação em campo e em estufa, variando entre os 76,67% e os 90%. A *Myrica faya* e a *Teline maderensis* obtiveram taxas mais elevadas em laboratório, superiores a 66% e 71%, respetivamente.

Em termos de composição bioquímica, as quatro espécies apresentaram maior concentração de amido no estado de maturação mais avançado. Nos açúcares, as concentrações são marcadamente reduzidas para a maioria das amostras. Os lípidos e a proteína bruta exibiram baixa taxa de mobilização durante a germinação. O *Laurus novocanariensis* apresentou a redução mais acentuada em açúcares solúveis, lípidos e proteína durante o processo germinativo (84,43%, 28,41% e 17,63%, respetivamente), e a *Myrica faya* a espécie que obteve maior mobilização em amido (81,65%). Quanto aos marcadores do metabolismo, a malato-desidrogenase apresenta um aumento da atividade enzimática durante a germinação e na peroxidase observou-se uma baixa atividade em todas as amostras.

Palavras-chave: germinação, substratos, condições edafoclimáticas, pré-tratamentos, composição bioquímica, metabolismo celular

## Abstract

The aim of this study was to deepen the understanding of the germination process of four native woody species from Madeira (*Teline maderensis* Webb & Berthel., *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousa, Fern. Prieto, E. Dias, J.C. Costa & C. Aguiar, *Vaccinium padifolium* Sm. and *Myrica faya* Aiton). Current knowledge on the germination of these species is limited, making it difficult to obtain quality seeds that ensure viability and high germination standards. Trials were conducted with seeds at different stages of ripeness. Seed batches were germinated in various locations on Madeira to test the influence of soil and climatic conditions. Seed germination was also tested in greenhouses and on different substrates. Subsequently, seeds underwent different pre-germination treatments and were placed in phytoclimatic chambers to study associated dormancy. Finally, changes in the biochemical composition of the seeds during germination and the role of two metabolic markers were assessed.

Germination success varied by species. *Vaccinium padifolium* showed the best germination rate in seeds at a more advanced stage of ripeness, with a success rate exceeding 75% in phytoclimatic chamber. *Laurus novocanariensis* had the highest germination percentage in the field and greenhouse, ranging from 76.67% to 90%. *Myrica faya* and *Teline maderensis* achieved higher rates in the laboratory, over 66% and 71%, respectively.

In terms of biochemical composition, the four species showed the highest starch concentration at the most advanced stage of ripeness. Sugar concentrations were markedly low in most samples. Lipids and crude protein exhibited a low rate of mobilization during germination. *Laurus novocanariensis* showed the sharpest reduction in soluble sugars, lipids, and protein during germination (84.43%, 28.41%, and 17.63%, respectively), while *Myrica faya* exhibited the highest starch mobilization (81.65%). Regarding metabolic markers, malate dehydrogenase showed increased enzymatic activity during germination and peroxidase activity was low in all samples.

Keywords: germination, substrates, edaphoclimatic conditions, pre-treatments, biochemical composition, cell metabolism

## Declaração

O plágio consiste na apresentação, como sendo suas/seus e mesmo que tenha havido tradução, de ideias, opiniões, frases/textos, resultados ou conclusões de outros. A prática de plágio constitui uma grave violação da ética académica, além de poder levar à reprovação ou à retirada do grau, assim como a responsabilidade civil, criminal e disciplinar.

Assim, declaro por minha honra que a presente dissertação de mestrado é da minha exclusiva autoria, é original, e nela referenciei e citei todas as fontes utilizadas.

Fevereiro de 2024



Abel Martinho Silva Martins

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Declaração</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Glossário</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xi</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Geografia, geologia, clima e vegetação da Madeira .....	2
1.2. Espécies vegetais estudadas .....	3
1.2.1. <i>Laurus novocanariensis</i> Rivas Mart., Lousa, Fern. Prieto, E. Dias, J.C. Costa & C. Aguiar .....	4
1.2.2. <i>Vaccinium padifolium</i> Sm .....	5
1.2.3. <i>Myrica faya</i> Aiton .....	7
1.2.4. <i>Teline maderensis</i> Webb & Berthel .....	8
<b>2. Sementes</b> .....	<b>9</b>
2.1. Sementes ortodoxas e recalcitrantes .....	10
2.2. Dormência em sementes .....	12
2.3. Pré-tratamentos germinativos .....	14
2.3.1. Pré-tratamentos em sementes com dormência tegumentar .....	14
2.3.2. Pré-tratamentos em sementes com dormência endógena .....	15
<b>3. Germinação</b> .....	<b>17</b>
3.1. Fatores .....	17
3.1.1. Fatores abióticos .....	17
3.1.2. Fatores bióticos .....	19
3.2. Espécies reativas de oxigénio .....	19
3.3. Processo germinativo .....	20
3.3.1. Marcadores enzimáticos do metabolismo celular .....	21
3.4. Alterações da composição bioquímica das sementes .....	22
3.4.1. Hidratos de carbono .....	23

3.4.2. Proteínas .....	24
3.4.3. Lípidos .....	25
3.4.4. Minerais .....	26
<b>4. Substratos.....</b>	<b>27</b>
4.1. Textura.....	28
4.2. Propriedades físicas .....	29
4.3. Propriedades químicas .....	31
4.4. Disponibilidade de nutrientes.....	32
4.5. Componentes utilizados na formulação dos substratos .....	33
4.6. Características recomendáveis num substrato .....	35
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>36</b>
<b>6. Material e métodos .....</b>	<b>37</b>
6.1. Processamento e conservação das sementes.....	38
6.2. Caracterização dos lotes .....	39
6.2.1. Número de sementes por kg e peso de 1000 sementes .....	39
6.2.2. Morfologia das sementes.....	39
6.2.3. Embebição das sementes .....	39
6.3. Germinação das sementes .....	40
6.3.1. Desinfecção do material vegetal .....	40
6.3.2. Testes de germinação em campo/estufa .....	41
6.3.2.1. Substratos testados .....	42
6.3.2.2. Colheita dos substratos.....	42
6.3.2.3. Condições de germinação.....	42
6.3.2.4. Recolha de dados climáticos.....	44
6.3.3. Testes de germinação em laboratório .....	44
6.3.3.1. Pré-tratamentos .....	44
6.3.3.2. Condições dos ensaios germinação.....	45
6.4. Composição bioquímica das sementes .....	47
6.4.1. Preparação das farinhas .....	47
6.4.2. Matéria seca .....	47
6.4.3. Cinzas .....	48
6.4.4. Teor de açúcares solúveis.....	48
6.4.5. Amido .....	48
6.4.6. Proteína total .....	49

6.4.7. Lípidos .....	49
6.4.8. Minerais .....	49
6.4.9. pH .....	50
6.4.10. Acidez .....	50
6.5. Metabolismo das sementes.....	50
6.5.1. Atividade catalítica .....	50
6.5.1.1. Malato desidrogenase .....	50
6.5.1.2. Peroxidase .....	51
6.5.2. Concentração proteica .....	51
6.5.3. Separação eletroforética .....	52
6.5.4. Revelação .....	52
6.6. Análise de dados e tratamento estatístico .....	52
<b>7. Resultados e Discussão .....</b>	<b>54</b>
7.1. Caracterização dos lotes .....	54
7.2. Processo de embebição .....	55
7.3. Ensaio de germinação.....	57
7.3.1. Ensaio em estufa.....	58
7.3.2. Ensaio em campo.....	62
7.3.3. Ensaio em laboratório .....	66
7.4. Análise Bioquímica das sementes .....	70
7.4.1. Matéria orgânica e minerais .....	70
7.4.2. Hidratos de carbono .....	72
7.4.2.1. Açúcares solúveis .....	73
7.4.2.2. Amido .....	74
7.4.3. Lípidos .....	74
7.4.4. Proteína Bruta .....	76
7.4.5. pH e acidez titulável.....	77
7.4.6. Metabolismo das sementes.....	79
7.4.6.1. Atividade enzimática.....	79
7.4.6.2. Eletroforese e revelação .....	80
7.5. Análise global dos ensaios realizados .....	82
7.5.1. <i>Myrica faya</i> .....	83
7.5.2. <i>Vaccinium padifolium</i> .....	86
7.5.3. <i>Teline maderensis</i> .....	89

7.5.4. <i>Laurus novocanariensis</i> .....	92
<b>8. Conclusão .....</b>	<b>96</b>
<b>9. Perspetivas futuras .....</b>	<b>97</b>
<b>10. Referências .....</b>	<b>99</b>
<b>11. Anexos.....</b>	<b>105</b>

## Lista de Abreviaturas

**ABA** – Ácido absísico

**BSA** – Albumina de soro bovino

**CC** – Capacidade em contentor, capacidade de retenção de água do substrato

**CT** – Classificação textural do solo

**CTC** – Capacidade de troca catiónica

**GA<sub>3</sub>** – Ácido giberélico

**Hr** – Humidade relativa, %

**IFCN** – Instituto das Florestas e Conservação da Natureza, IP-RAM

**ISTA** – *International Rules for Seed Testing*

**LQA-DASP** – Laboratório de Qualidade Agrícola - Divisão de Análises de Solos e Plantas

**MDH** – Malato desidrogenase

**meq** – Miliequivalentes

**MO** – Matéria orgânica

**MS** – Matéria seca

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** – Oxigénio singlete

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – Superóxido

**OH<sup>•</sup>** – Radical hidróxilo

**ppm** – Partes por milhão

**ROS** – Espécies reativas de oxigénio

**SDS** – Dodesilsulfato de sódio

**TAGs** – Triacilglicéridos

**UC** – Unidades catalíticas

**UICS** – União Internacional de Ciências do Solo

## Glossário

**As** – Pré-tratamento germinativo em atmosfera saturada (72 horas)

**AD** – Água disponível que pode ser absorvida pelas plantas

**ADD** – Água dificilmente disponível pelas plantas

**AFD** – Água facilmente absorvível pelas plantas

**AR** – Água de reserva presente no substrato

**BP** – *Between-paper*

**Ef** – Pré-tratamento germinativo de estratificação a frio (4 semanas)

- Esc** – Pré-tratamento germinativo com escarificação mecânica
- Fr** – Frutos colocados em refrigeração
- H<sub>2</sub>O (100°C)** – Pré-tratamento germinativo com escaldão em água a 100°C (60 segundos)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Pré-tratamento germinativo em ácido sulfúrico concentrado (96%) por 30 minutos
- JB** – Jardim Botânico da Madeira - Eng. Rui Vieira
- L1** – Lote 1 – Lote de sementes em estado inicial de maturação
- L2** – Lote 2 – Lote de sementes em estado de maturação mais avançado
- L3** – Lote 3 – Lote de sementes de *Laurus novocanariensis* recolhido no ano subsequente
- Lrn** – Espécie *Laurus novocanariensis*
- M** – Local de ensaio - Sítio da Queimada de Baixo, Matur, Machico (100 metros de altitude)
- MO** – Matéria orgânica
- Mtg** – Meio tempo de germinação
- Myr** – Espécie *Myrica faya*
- PL** – Porosidade livre ou volume de ar no substrato
- PM** – Local de ensaio – Portas da Vila – Santa, Porto Moniz (688 metros de altitude)
- PP** – Local de ensaio – Pico das Pedras, Santana (912 metros de altitude)
- Pr** – Forma inativa do fitocromo
- Prf** – Forma ativa do fitocromo
- Pt** – Porosidade total de um substrato
- S** – *Sand* (areia)
- SAT** – Substrato nas proporções 50:50 de solo com origem em áreas agrícolas e adubo orgânico proveniente de cavalariças
- SCrj** – Matéria orgânica recolhida no interior de um povoamento de *Criptomeria japonica*
- SL** – Solos recolhidos *in situ* das quatro espécies estudadas
- Sn** – Sementeira normal, sem pré-tratamento germinativo
- STP** – Substrato nas proporções 2/3 de turfa e 1/3 de perlite
- Tem** – Espécie *Teline maderensis*
- TP** – *Top-of-paper*
- TT** – Tempo térmico
- TxG<sub>100</sub>** – Taxa de germinação obtida no final da etapa germinativa
- TxG<sub>50</sub>** – Taxa de germinação obtida a metade do período germinativo
- Tzg** – Tempo zero de germinação
- Vap** – Espécie *Vaccinium padifolium*

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Características recomendáveis num substrato .....	35
<b>Tabela 2:</b> Origem do material reprodutivo utilizado no estudo .....	37
<b>Tabela 3:</b> Ensaios de germinação realizados em campo e em estufa .....	43
<b>Tabela 4:</b> Ensaios de germinação realizados em laboratório .....	46
<b>Tabela 5:</b> Valores médios do número de sementes/kg e do peso de 1.000 sementes .....	55
<b>Tabela 6:</b> Dimensão média das sementes .....	55
<b>Tabela 7:</b> Síntese das características mais relevantes dos substratos .....	59
<b>Tabela 8:</b> Taxa de germinação a metade do período germinativo e comparação com os valores da taxa obtida no final da etapa germinativa em estufa .....	61
<b>Tabela 9:</b> Taxa de germinação a metade do período germinativo e comparação com os valores da taxa obtida no final da etapa germinativa em campo .....	63
<b>Tabela 10:</b> Sinopse dos valores médios de humidade e temperatura .....	64
<b>Tabela 11:</b> Valores do tempo térmico obtidos para as 4 espécies .....	65
<b>Tabela 12:</b> Taxa de germinação obtida a metade do período germinativo e comparação com os resultados obtidos no final da etapa germinativa em laboratório .....	69
<b>Tabela 13:</b> Valores médios do teor de cinzas e matéria orgânica .....	70
<b>Tabela 14:</b> Composição mineral de macro e micronutrientes presentes nas cinzas .....	71
<b>Tabela 15:</b> Valores médios de pH e acidez .....	79
<b>Tabela 16:</b> Evolução da atividade enzimática da MDH e Peroxidase .....	80

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Exemplos das espécies estudadas nos primeiros estádios de desenvolvimento..	4
<b>Figura 2:</b> Exemplar adulto de <i>Laurus novocanariensis</i> e identificação de algumas fases do ciclo biológico da espécie .....	5
<b>Figura 3:</b> Exemplos adultos de <i>Vaccinium padifolium</i> e identificação de algumas fases do ciclo biológico da espécie .....	6
<b>Figura 4:</b> Planalto do Paul da Serra .....	6
<b>Figura 5:</b> Exemplar da <i>Myrica faya</i> e identificação de algumas fases do ciclo biológico da espécie .....	7
<b>Figura 6:</b> Exemplos adultos de <i>Teline maderensis</i> e identificação de algumas fases do ciclo biológico da espécie.....	9
<b>Figura 7:</b> Representação esquematizada dos dois tipos de padrão de crescimento.....	21
<b>Figura 8:</b> Representação esquematizada da hidrólise das proteínas de reserva .....	24
<b>Figura 9:</b> Diagrama representando as classes de textura dos solos .....	29
<b>Figura 10:</b> Variação da capacidade de retenção da água.....	30
<b>Figura 11:</b> Identificação e enquadramento cartográfico dos locais de colheita .....	38
<b>Figura 12:</b> Localização dos 4 locais onde decorreram os ensaios germinativos.....	41
<b>Figura 13:</b> Evolução da absorção de água nas sementes .....	56
<b>Figura 14:</b> Evolução germinativa por espécie em estufa.....	58
<b>Figura 15:</b> Diferentes estádios de desenvolvimento das plântulas em estufa .....	61
<b>Figura 16:</b> Evolução da germinação das sementes em campo.....	62
<b>Figura 17:</b> Variação da temperatura média e da humidade média relativa do ar .....	64
<b>Figura 18:</b> Evolução da germinação das sementes submetidas aos pré-tratamentos e colocadas em câmaras fitoclimáticas .....	67
<b>Figura 19:</b> Placa de Petri com plântulas e sementes de <i>Tem</i> .....	67
<b>Figura 20:</b> Pormenor das plântulas nos suportes de germinação .....	68
<b>Figura 21:</b> Valores médios do teor de açúcares solúveis presentes nas sementes .....	73
<b>Figura 22:</b> Valores médios do teor de amido presente nas sementes.....	74
<b>Figura 23:</b> Teor médio de lípidos totais .....	75
<b>Figura 24:</b> Composição média da proteína bruta presente nas sementes .....	77
<b>Figura 25:</b> Eletroforese em poliacrilamida (NATIVE PAGE) .....	81
<b>Figura 26:</b> Aspeto das sementes de <i>Lrn</i> .....	92

## 1. Introdução

A Madeira, a quando da sua descoberta, em 1420, apresentava uma vegetação exuberante, que cobria densamente as encostas da ilha [1, 2, 3]. Desde muito cedo, esta vegetação foi alvo de uma enorme destruição, quer pelo fogo, para desbravar áreas para a prática da agricultura, quer para a obtenção de madeiras e lenhas. A devastação foi intensa e, poucos anos volvidos, eram já bem perceptíveis os problemas relacionados com a água e erosão dos solos [2]. Na atualidade é bem visível a degradação do coberto vegetal na paisagem que, aliado aos fenómenos cíclicos, como os incêndios e as cheias ou aluviões, tornam imprescindível a recuperação dos habitats. De acordo com Vieira [3], torna-se “obrigatório”, por razões científicas, hidrológicas, paisagísticas e de defesa contra a erosão, enriquecer as matas e revestir os terrenos incultos, sempre que possível, com espécies nativas próprias do ecossistema primitivo.

Na atualidade, os desafios no âmbito do desenvolvimento socioeconómico da Região Autónoma da Madeira (RAM) consistem em gerar conhecimento e, posteriormente, aplicá-lo numa perspetiva de gestão e uso sustentável do território e dos recursos naturais [4].

Assim, no âmbito deste trabalho, são estudadas 2 espécies endémicas e 2 nativas da Madeira: piorno (*Teline maderensis* Webb & Berthel.), uveira-da-serra (*Vaccinium padifolium* Sm.), loureiro (*Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousa, Fern. Prieto, E. Dias, J.C. Costa & C. Aguiar) e a faia-das-ilhas (*Myrica faya* Aiton) respetivamente [5]. Os resultados obtidos permitiram compreender melhor o seu processo germinativo e, conseqüentemente, aumentar o sucesso dos esforços de repovoamento e recuperação dos ecossistemas, sem descurar o seu potencial económico, direto ou indireto, enquanto provedores de serviços ecossistêmicos de produção, suporte, regulação e culturais.

Em síntese, este estudo envolve a realização de diversos ensaios de germinação, realizados de acordo com as normas da *International Rules for Seed Testing* (ISTA) [6], utilizando sementes em diferentes estados de desenvolvimento. Pretende-se relacionar o sucesso da germinação com as condições ambientais e caracterizar alguns aspetos chave da bioquímica e fisiologia da germinação.

O trabalho encontra-se dividido em 4 fases distintas. Numa primeira fase, as sementes foram colocadas a germinar em distintos locais da Madeira, a fim de testar a influência das condições edafoclimáticas no processo germinativo. Paralelamente, foi testada a germinação das sementes em diferentes substratos em estufa. Numa segunda fase, as sementes foram submetidas a diferentes pré-tratamentos para quebrar as dormências, estimular e promover a germinação e colocadas em câmaras fitoclimáticas. Numa terceira fase efetuou-se a análise da

composição bioquímica das sementes nas fases iniciais de germinação (minerais, lípidos, açúcares, proteínas e amido, pH e acidez). Por último procedeu-se a uma análise de algumas funções metabólicas, estudando a atividade da malato-desidrogenase (MDH) e peroxidase no metabolismo da germinação, quantificando as atividades catalíticas e catalítica específica, e o espectro enzimático destas enzimas.

Nota sobre os registos fotográficos: neste trabalho, todas os registos fotográficos apresentados são originais e produzidos pelo autor.

### **1.1. Geografia, geologia, clima e vegetação da Madeira**

O Arquipélago da Madeira está localizado a sudoeste de Portugal continental, entre a latitude 32° 24' e 33° 07' N e longitude 16° 16' e 17° 16' W, com origem vulcânica, a sua formação teve início no período Miocénico, há aproximadamente 18 milhões de anos, excetuando-se o sub-arquipélago das selvagens, com início de formação há sensivelmente 27 milhões de anos [7].

A ilha da Madeira apresenta uma cordilheira montanhosa central, com orientação este-oeste, onde se situam os pontos mais altos (Pico Ruivo e Pico do Areeiro). A disposição desta cordilheira resulta em duas vertentes, norte e sul, com clima e vegetação contrastantes. O relevo é muito acentuado, com vales profundos, gargantas estreitas, numerosas arribas altas e precipícios, que são essencialmente o resultado da intensa erosão causada pela escorrência das águas superficiais [7].

A Madeira é constituída essencialmente por rocha basáltica e, ao contrário do que acontece com os Açores e Canárias, não apresenta qualquer atividade vulcânica recente [8], cujos registos datam de há 6.000-7.000 anos [5]. Os solos da ilha são pobres em cálcio e potássio, mas ácidos e ricos em matéria orgânica [8].

A localização e orografia da Madeira condiciona o clima da ilha e, por conseguinte, todo o tipo de vegetação [5]. O clima é fortemente influenciado pelo anticiclone dos Açores e pelos ventos alísios, principalmente oriundos do Norte e Nordeste [8]. Na encosta sul, até cerca de mil metros de altitude, e nas cotas mais baixas da encosta norte, o clima apresenta uma secura estival prolongada, durante os meses de verão. A partir da cota de 1.000 metros na encosta sul e na globalidade da encosta norte, ocorre um regime climático temperado, caracterizado por apresentar uma precipitação bem distribuída ao longo do ano em consequência da persistência localizada dos nevoeiros, resultantes da subida forçada do ar

carregado de humidade ao longo das encostas, originando a precipitação direta e a precipitação oculta. Nesta zonas o clima não ostenta seca estival ou apenas escassa, não chegando a esgotar as reservas de água no solo [7, 5].

Na Madeira existem essencialmente três andares de flora natural. A vegetação do litoral, predominantemente rasteira, de características xerofíticas, herbácea e arbustiva, raramente atinge 1 metro de altura e distribui-se desde o nível do mar até 300 metros de altitude na costa sul e 100 metros na costa norte. Neste andar vive uma grande diversidade de endemismos madeirenses e macaronésicos [7, 1].

A floresta Laurissilva ocupa o segundo andar de vegetação. Trata-se de uma floresta laurilenhosa e pluriestratificada, constituída predominantemente por árvores e arbustos de folhagem persistente, com folhas verde-escuras, planas, geralmente glabras e coriáceas. Plantas de menores dimensões, os fetos e as formações liquénicas também proliferam por toda a parte. Na fauna especial destaque merecem os insetos e moluscos terrestres e aves. Esta flora e fauna possui uma enorme biodiversidade, com elevada percentagem de espécies exclusivas da Madeira ou da Macaronésia (região com as mesmas afinidades fitogeográficas, constituída pelos arquipélagos da Madeira, Açores, Canárias e Cabo Verde). A floresta ocupa aproximadamente 15.000 hectares, o equivalente a 20% da ilha, em áreas de humidade relativa elevada da ilha, 85% geralmente na partes altas, sobretudo entre 300 e 1.300 metros na costa norte e entre 700 e 1.200 metros na costa sul, em locais de difícil acesso [1, 7, 9].

A vegetação de altitude desenvolve-se no terceiro andar de flora natural, acima de 1.200-1.300 metros de altitude. Este andar é caracterizado por apresentar um clima rigoroso, com grandes amplitudes térmicas, com ocorrência de temperaturas médias mínimas anuais perto dos 0°C, precipitação elevada e ventos intensos, onde predominam espécies herbáceas e arbustivas [7, 1].

## **1.2. Espécies vegetais estudadas**

A flora autóctone de um determinado território, seja insular ou continental, com maior ou menor dimensão, deve ocupar um lugar de destaque. Neste tipo de vegetação espontânea e natural, os estudos devem incidir em primeira instância sobre a sua biologia, a monitorização do estado de conservação e os planos de proteção [10]. Pelo que o presente estudo foca quatro espécies lenhosas da ilha da Madeira (Figura 1), de maior interesse agroflorestal não só para as entidades públicas e privadas, mas também para os particulares em geral.



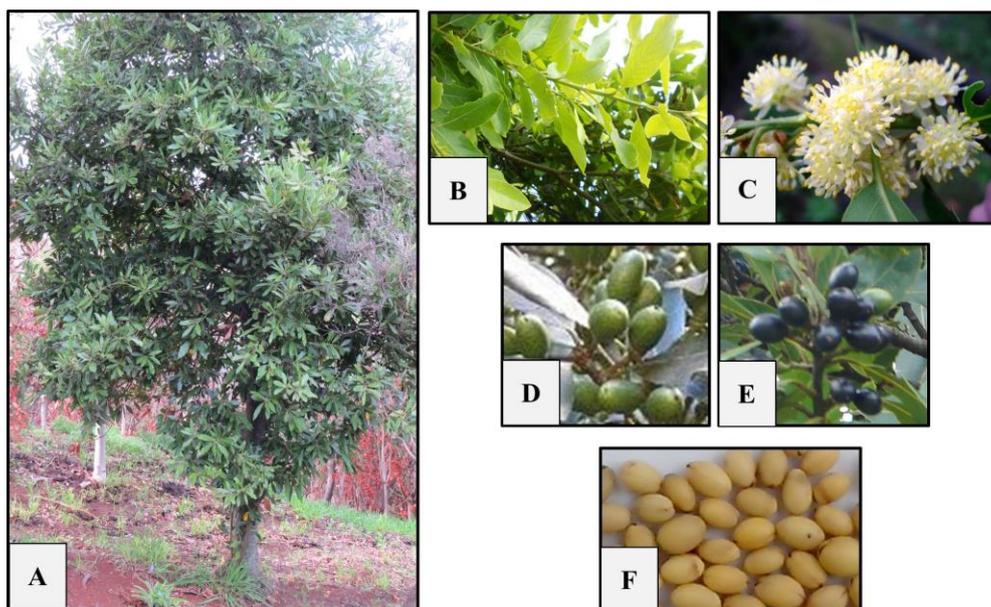
**Figura 1:** Exemplos das espécies estudadas nos primeiros estádios de desenvolvimento: A – *Laurus novocanariensis*, B - *Vaccinium padifolium*, C - *Myrica faya*, D - *Teline maderensis*.

A exploração em maior escala deste tipo de espécies poderá, por um lado, contribuir para a conservação da natureza, mantendo o equilíbrio biológico e biofísico [3] e, por outro lado, gerar um maior interesse económico direto para as populações, incentivando os privados no seu uso na produção das matérias-primas necessárias à atividade.

### **1.2.1. *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousa, Fern. Prieto, E. Dias, J.C. Costa & C. Aguiar [5]**

Trata-se de uma árvore endémica dos arquipélagos da Madeira e das Canárias sendo a espécie mais numerosa na Laurissilva [11, 12], onde devido à sua rusticidade ocorre uma grande variedade de habitats, distribuindo-se desde a beira-mar até os 1.600 m de altitude [1]. É uma espécie dicotiledónea e pertence à família Lauraceae, atingindo um porte mediano, que pode atingir 20 metros de altura, copa densa, piramidal a ampla, de tronco cinzento-escuro a acastanhado, gretando na base das árvores velhas [3].

A espécie é perenifólia, dioica, com ramos jovens densamente tomentosos. As folhas, com 5-18 x 3-8 centímetros, são verde-escuras, lanceoladas, agudas ou obtusas, coriáceas e aromáticas. A floração é constituída por inflorescências formadas por pseudo-umbelas, curtamente pecioladas, cada uma, com cerca de cinco pequenas flores branco-amareladas [13]. O fruto (baga) é ovoide, de coloração verde a negro, quando maduro ou, raramente, amarelado, podendo atingir uma dimensão máxima de 2 centímetros [3]. Floresce de fevereiro a abril e os seus frutos amadurecem entre setembro e outubro [1]. Na Figura 2 estão identificadas algumas das fases fenológicas da espécie.



**Figura 2:** Exemplar adulto de *Laurus novocanariensis* e identificação de algumas fases do ciclo biológico da espécie: A – Árvore, B – Ramificação nova, C – Flor, D – Fruto em desenvolvimento, E – Fruto maduro, F – Sementes (dimensão média: 13,99mmX9,69mmX9,87mm).

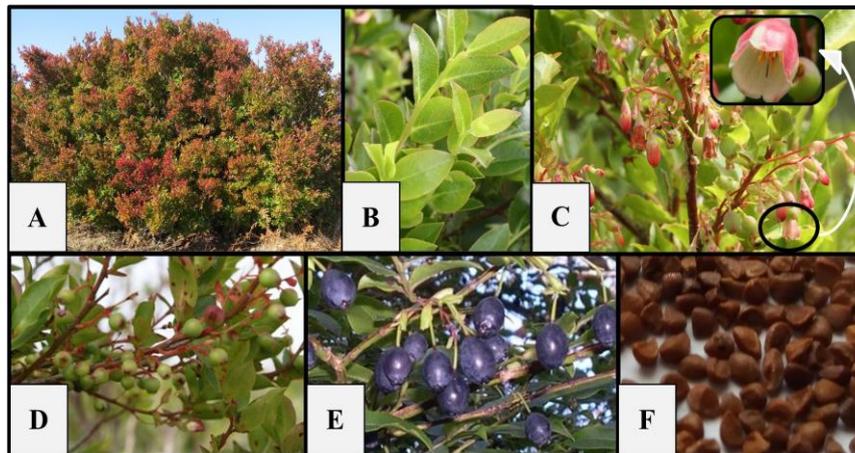
A exploração da *L. novocanariensis* em regime de talhadia não só leva a uma diversificação dos produtos lenhosos da RAM, como constitui uma potencial estratégia para a substituição da atual floresta exótica, sobretudo a vegetação desordenada e de caráter invasor, com vantagens ao nível da biodiversidade e da qualidade cénica da paisagem.

### 1.2.2. *Vaccinium padifolium* Sm [5]

A uveira-da-serra é uma planta endémica da ilha da Madeira comum, que ocorre na Laurissilva e em locais expostos, entre os 800 a 1.700 metros, constituindo, frequentemente, grandes maciços estremos, como são exemplo certas encostas do Paul da Serra.

É uma espécie dicotiledónea que pertence à família Ericaceae [3, 7], arbustiva que pode atingir o porte de arboreta, até 6 metros de altura, perenifólio, ramos jovens avermelhados e pubescentes, folhas oblongas e elípticas, com 2,5 a 7 x 2 a 5 centímetros, serrilhadas, muitas vezes avermelhadas, pubescentes no pecíolo e na nervura média da página inferior [7]. As flores estão dispostas em rácimos axilares, globoso-campanulada, branca ou branco-esverdeada, com frequência manchada de vermelho [3]. O fruto quase ovoide, 12 x 10 milímetros, apresenta-se preto-azulado quando maduro [7].

As plantas florescem de maio a agosto e os frutos amadurecem entre finais de agosto a outubro [7]. Na Figura 3 estão identificadas algumas das fases fenológicas da espécie.



**Figura 3:** Exemplos adultos de *Vaccinium padifolium* e identificação de algumas fases do ciclo biológico da espécie: A – Núcleo de arbustos na fase adulta, B – Ramificação nova, C – Floração, D – Frutos em formação, E – Frutos maduros, F – Sementes (dimensão média: 1,53mmX1,08mm).

O *V. padifolium* forma com o urzal de altitude núcleos de vegetação característicos, pincelando de sombreados e avermelhados pequenas encostas sobranceiras ao planalto do Paul da Serra, avivando o ar serrano e dando cor e vida à natureza. As distintas tonalidades na paisagem devem-se sobretudo à maior ou menor exposição solar a que os exemplares da espécie estão sujeitos (Figura 4).



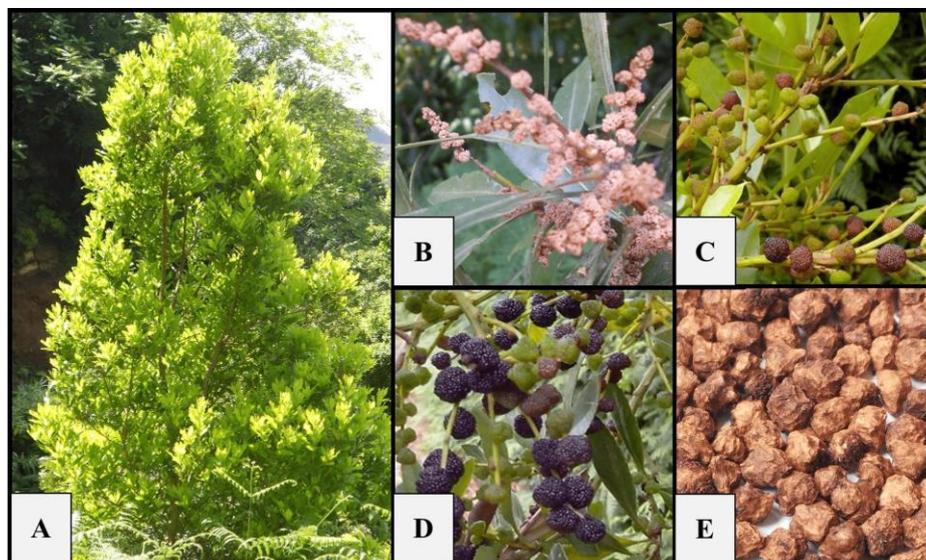
**Figura 4:** Planalto do Paul da Serra (A), onde se observa o sublime impacto da coloração avermelhada do denso povoamento de *Vaccinium padifolium*. Exemplos de plântulas com menor (B1) ou maior (B2) exposição solar.

A espécie constitui um tipo de coberto florestal que cumpre funções de produção e, essencialmente, funções de defesa e valorização dos recursos hídricos, proteção do solo contra a erosão e de diversificação da paisagem [3].

### 1.2.3. *Myrica faya* Aiton [5]

A faia-das-ilhas é uma espécie que ocorre naturalmente no arquipélago da Madeira, Açores e Canárias [8, 14], podendo ocorrer igualmente na costa sudoeste de Portugal Continental [14]. No entanto, segundo Press & Short [8], é incerto se estas populações da última localização são nativas ou naturalizadas. A planta, conhecida como faia, possui o estatuto de “bastante abundante” [12] na Laurissilva, frequente em altitudes mais baixas da costa norte e apenas “muito ocasional” [8] no sul da ilha. A espécie distribui-se desde a beira-mar até 1.000 metros de altitude [8].

Espécie dicotiledónea [15] pertencente à família Myricaceae, [16] arbusto ou pequena árvore, dioica, até 8 m. Ramos jovens patentes, com pequenas glândulas acastanhadas. Folhas brevemente pecioladas, 4-10 x 1,3-3 centímetros, oblanceoladas, agudas a obtusas, atenuadas, coriáceas e glabras, discretamente pontilhadas de glândulas, margens inteiras ou serradas e irregulares em direção ao ápice [8]. Flores pequenas, amarelo-esverdeadas, dispostas em amentilhos [17]. Fruto de 4-7,5 milímetros de diâmetro, granuloso, papiloso, levemente carnudo, vermelho a negro, cintilante [8]. A espécie floresce de março a abril [16] e os frutos amadurecem de junho a agosto [14]. Na Figura 5 estão identificadas algumas das fases fenológicas da espécie.



**Figura 5:** Exemplar da *Myrica faya* e identificação de algumas fases do ciclo biológico da espécie: A – Árvore, B – Flor, C – Ramificação com frutos em diferentes estados de formação, D - Frutos maduros, E – Sementes (dimensão média: 4,61mmX3,72mmX3,37mm).

A *M. faya* tem grande importância silvícola, uma vez que pode possuir peculiaridades ecológicas e morfológicas que potenciam a colonização de locais degradados e inóspitos, onde a carência de nutrientes, como o azoto, limita o crescimento vegetativo de outras espécies [17].

A faia estabelece associações com fungos micorrízicos, bem como simbioses com bactérias fixadoras de azoto. Na espécie é possível encontrar nódulos radiculares muito ramificados que variam de tamanho (entre 0,1 e 10 centímetros de diâmetro), que resultam da associação simbiótica entre a azotobactéria (*Frankia*) e a raiz, possibilitando a fixação de azoto atmosférico, o que permite a colonização da maioria dos habitats mesmo em condições extremas de substrato. O azoto captado é cerca de 4 vezes superior ao normal, ficando disponível não só para a *M. faya* mas para todas as espécies que surjam no local [17, 18].

A *M. faya* apresenta-se como uma espécie melhoradora do solo, e com capacidade e potencial de adaptação a locais inóspitos e pobres em nutrientes. Pode ser utilizada como pioneira ou de transição, e posteriormente substituída por outras nativas próprias desses locais.

#### **1.2.4. *Teline maderensis* Webb & Berthel [5]**

Planta endémica rara, da ilha da Madeira, que vive na Laurissilva e em escarpas rochosas, até às altitudes mais elevadas. Espécie dicotiledónea pertencente à família Fabaceae (Leguminosae) [3, 7], arbusto arborescente, ramoso, perenifólio, robusto, até 5 metros, muito raramente com 6 metros [3], com indumento de pelos esbranquiçados a castanho-viloso. Folhas trifoliadas com folíolos de 5-25 x 2.5-11 milímetros, obovados a oblanceolados ou elípticos, obtusos a arredondados, muitas vezes mucronados, verde – acinzentados. Inflorescência terminal, 1,5-7 centímetros, com 3 a 20 flores; corola amarela, de 9-16 milímetros; lábio inferior do cálice geralmente com 3 dentes distintos [8]. O fruto (vagem) achatado, geralmente sinuoso nas margens, de 20-40 x 5-8 milímetros [7].

A planta floresce de abril a outubro [7] e os frutos (vagem) amadurecem entre agosto e setembro. Na Figura 6 estão identificadas algumas das fases fenológicas da espécie.

Tratando-se de um endemismo da ilha da Madeira, a planta reveste-se como uma mais-valia a implementação de medidas conducentes à sua utilização como espécie ornamental [3], em alternativa de outras plantas exóticas, que cumprem o mesmo papel por terem um carácter atrativo, vistoso e interessante do ponto de vista paisagístico.



**Figura 6:** Exemplos adultos de *Teline maderensis* e identificação de algumas fases do ciclo biológico da espécie: A –Vários arbustos na vereda do Caldeirão Verde - Santana, B – Aspeto geral da floração, C – Singularidade da flor, D – Fruto (vagem), E – Sementes (dimensão média: 2,95mmX2,22mmX1,06mm).

## 2. Sementes

As sementes são o principal meio de reprodução sexuada da maioria das plantas [19]. A sua formação resulta da união entre os gametas masculino (pólen) e feminino (óvulos). Cada gameta contribui com informação genética de um dos progenitores, o que após a fecundação, conferem à semente o potencial genético necessário ao desenvolvimento da geração seguinte, e controla o crescimento e o comportamento da planta durante o seu ciclo biológico [11].

As sementes são as responsáveis pela dispersão do embrião e pelo sucesso reprodutivo da espécie, e podem apresentar-se em diferentes condições fisiológicas, que determinam o seu vigor e capacidade germinativa, desenvolvendo estratégias de adaptação, em que os estados de dormência, permitem a sua sobrevivência prolongada em condições desfavoráveis [20].

O processo de desenvolvimento da semente, desde a fertilização do óvulo até atingir à maturidade fisiológica, pode ser subdividido em quatro fases distintas: as fases I e II compreendem a divisão e expansão celular; a acumulação das substâncias de reserva ocorre na fase III, resultando num aumento da massa seca da semente e, no final desta fase, intensifica-se a perda de humidade da semente (fase IV) [21]

Após a fertilização, ocorre um período de formação da estrutura da semente como resultado da divisão, expansão e diferenciação celular (histodiferenciação), no qual se formam as primeiras etapas da estrutura da semente, e se podem visualizar as futuras partes do embrião. Posteriormente, ocorre um aumento significativo do tamanho da semente, formando as células embrionárias que recebem a informação da planta-mãe. Durante este período, o teor de

humidade mantém-se constante e elevado. A diminuição significativa da humidade das sementes acontece no final da maturação, quando se verificam mudanças na organização da estrutura das membranas celulares, bem como aumentos na síntese de enzimas em preparação para a germinação. As sementes recalcitrantes geralmente não apresentam o período de transição entre a maturação e a germinação [21].

A qualidade das sementes é avaliada pela rapidez (vigor) e taxa de germinação [22]. A viabilidade avalia-se pela quantidade de sementes vivas num determinado lote, que, em condições apropriadas, tem capacidade de germinação. A viabilidade expressa-se pela taxa de germinação, em percentagem de sementes que produzem plântulas num lote. Outras características adicionais de viabilidade são a germinação finalizada, o vigor de crescimento e o desenvolvimento normal das plântulas [23]. O vigor pode ser compreendido como a soma de vários atributos que determinam o potencial germinativo e a emergência uniforme das plântulas em diversos lotes de sementes numa ampla gama de ambientes [24]. Segundo o ISTA [6], o vigor não pode ser visto como uma propriedade unitária mensurável, mas como um caráter, com várias características associadas à semente, que descrevem quantitativa e qualitativamente o desempenho de um lote de sementes, nomeadamente, a taxa e uniformidade da germinação, capacidade de emergência e o crescimento das plântulas, em condições ambientais normais ou desfavoráveis e o desempenho de sementes, especialmente a manutenção da sua faculdade germinativa, após o armazenamento.

### **2.1. Sementes ortodoxas e recalcitrantes**

A conservação das sementes é um processo que deverá ser executado logo após a recolha e processamento das amostras, de forma a manter o poder germinativo dos diferentes lotes até à sua futura utilização. A conservação das sementes, com a manutenção da sua viabilidade, implica mantê-las em condições controladas, sobretudo de temperatura e humidade, de forma a reduzir os processos metabólicos. Consoante o tipo de sementes, estas poderão ser conservadas em locais, com condições e ambientes controlados, que dependem do grau de exigência em humidade e temperatura. O período de conservação poderá ir de alguns meses a vários anos. A sensibilidade à água é um fator que condiciona todo o processo de manuseamento das sementes. De acordo, com a necessidade e teor de água, as sementes dividem-se em dois grandes grupos: sementes ortodoxas e sementes recalcitrantes [11].

As sementes ortodoxas conseguem suportar perdas de humidade acentuadas, mantendo a sua viabilidade [11]. A longevidade das sementes aumenta com a diminuição do teor de humidade e temperatura e, dependendo das espécies, as sementes sobrevivem a teores de

humidade entre 2 a 6%. Acima destes valores observa-se uma relação negativa entre o teor de humidade da semente e a sua longevidade. Relativamente ao efeito da temperatura, dependendo da espécie, pelo menos entre -20 e 90 °C, existe igualmente uma relação negativa entre este fator e a longevidade das sementes, considerando o teor de humidade constante [25].

As sementes recalcitrantes sofrem pouca ou nenhuma desidratação na maturação, permanecem sensíveis à dessecação durante o seu desenvolvimento e após a disseminação, perdendo, a viabilidade e o poder germinativo, quando os teores de água são inferiores a 30%. Estas sementes são igualmente intolerantes ao armazenamento a temperaturas negativas, uma vez que a formação dos cristais de gelo rompem as membranas celulares e provocam lesões por congelação [26, 27].

As sementes recalcitrantes apresentam uma vida notavelmente curta. A viabilidade de certas espécies de famílias como Dipterocarpaceae e Lauraceae dura apenas alguns dias ou meses [26]. De acordo com Piotto & Di Noi [28], as sementes do *Laurus. nobilis* (loureiro comum dos países da bacia do mediterrâneo) apresentam um comportamento recalcitrante e a dissecação abaixo dos 15% resulta na perda total da viabilidade. Na dispersão das sementes da espécie, o teor de humidade é de cerca de 37 a 40% do seu peso. Na literatura não foram encontrados dados que permitam comparar a influência do teor de humidade na alteração da viabilidade com o tempo para as sementes do *L. novocanariensis*. No entanto, segundo Jocama & Viveros [14], é possível conservar as sementes à temperatura ambiente, durante um ano. Na ausência de bibliografia relativa às propriedades recalcitrantes da espécie em estudo, utilizou-se a *L. nobilis* como referência teórica para os ensaios realizados.

A base fisiológica do comportamento recalcitrante não é completamente compreendida, existindo três tipos possíveis de danos que podem ocorrer nas sementes, levando à perda de viabilidade: danos mecânicos, danos metabólicos e desnaturação macromolecular [26].

Após a separação da planta progenitora, as sementes desidratam, o que pode causar danos estruturais mecânicos nos vacúolos, no citoesqueleto e nas membranas celulares, resultando na perda de viabilidade [26].

No que diz respeito aos danos induzidos pelo metabolismo, após a separação da planta progenitora, os embriões têm uma atividade metabólica e uma taxa de respiração elevadas. À medida que as sementes desidratam, o metabolismo aquoso permanece, mas fica desequilibrado, levando a um funcionamento instável. Isso resulta na produção descontrolada de radicais livres e de espécies reativas de oxigénio. Esses subprodutos do metabolismo são tóxicos e causam danos nas membranas celulares, proteínas e DNA, levando à perda de

viabilidade. Danos fisiológicos relacionados com as membranas ou acumulação de subprodutos da degradação enzimática podem ser a causa subjacente da morte das sementes [26].

As sementes recalcitrantes, não passam pelo processo natural de secagem durante o amadurecimento, antes da dispersão, e os organelos celulares mantêm um estado altamente especializado. No entanto, após a desidratação, esses organelos ficam permanentemente danificados, contrariamente ao que sucede nas sementes ortodoxas. Esses danos afetam negativamente a estrutura macromolecular das proteínas, o funcionamento celular e o metabolismo, o que diminui o potencial de viabilidade das sementes. Os embriões também sofrem alterações, como o aumento do tamanho das células, uma extensa formação de vacúolos e disfunção nas mitocôndrias. Essas alterações evidenciam os danos causados nas células devido à desidratação excessiva das sementes [26].

## **2.2. Dormência em sementes**

A dormência é definida como uma incapacidade da semente para germinar em condições ambientais e de germinação favoráveis [29]. A dormência está relacionada com uma fase de repouso, durante a qual o metabolismo celular da semente e o crescimento do embrião estão suspensos [30].

As espécies desenvolveram, durante a evolução, mecanismos que garantem a sua sobrevivência. Nas espécies de reprodução sexuada a sua continuidade depende da produção de sementes, que após a maturação e posterior dispersão, germinam num local e tempo mais favorável ao crescimento das plântulas. Algumas plantas produzem um número significativo de sementes, de modo que, mesmo que apenas uma pequena fração germine, garantem a sobrevivência da espécie. Noutros casos, a germinação é inibida por mecanismos intrínsecos, quando as condições ambientais são desfavoráveis, que induzem a dormência das sementes. Esta dormência é posteriormente superada com ajuda, de processos bioquímicos e fisiológicos, geralmente desencadeados pela mudança das condições ambientais [19].

A dormência das sementes faz parte de uma estratégia das plantas, que visa retardar a germinação para um período após a dispersão. Este mecanismo assegura que a germinação não ocorra em condições desfavoráveis que dificultam ou impedem a atividade metabólica, eclodindo apenas quando as condições do meio coincidirem com as necessidades ecológicas e fisiológicas da espécie [31].

As espécies lenhosas apresentam grande diversidade de processos de dormência. As sementes de algumas espécies podem permanecer no solo, durante anos sem perder a

capacidade germinativa, enquanto outras apenas conseguem atrasar o processo de germinação, durante algumas semanas. Este último fenômeno é muitas das vezes descrito como germinação retardada, não representando uma verdadeira dormência. As classificações utilizadas para sistematizar as dormências variam, de acordo com os investigadores, pois não existe um consenso sobre a temática [19]. Segundo Ellis et al [31], a maioria dos fisiologistas concorda com a existência de três tipos principais de dormência: inata, imposta e induzida.

A dormência inata, também conhecida por dormência primária, natural ou endógena é imposta ainda quando o embrião se encontra ligado ao progenitor, cessando o seu crescimento. Esta pode ser distinguida em dormência tegumentar e dormência embrionária [31].

A tegumentar ou externa apresenta três modos de ação distintos: no modo mais comum, os revestimentos das sementes são impermeáveis à entrada de água ou oxigênio, como é o caso das sementes da família leguminosae. O segundo modo de ação atribuído ao tegumento das sementes é a resistência mecânica ao intumescimento do embrião, durante o processo de absorção de água, atrasando a embebição e emergência da radícula. O terceiro modo de ação está associado à presença de inibidores da germinação nos revestimentos das sementes, como a presença de substâncias fenólicas que impedem a germinação das sementes em condições desfavoráveis, mas que poderão ser benéficos ao atuarem como inibidores de crescimento de microrganismos patogénicos.

A dormência embrionária é um requisito do próprio embrião. A causa mais provável desta última dormência é a presença de inibidores de germinação no eixo embrionário ou nos tecidos de armazenamento das sementes, sendo o ácido abscísico (ABA) o inibidor mais comum nas espécies lenhosas. A germinação implica a degradação metabólica desses inibidores ou que o seu efeito seja superado por substâncias promotoras da germinação. Outro fator associado a este género de dormência é a imaturidade fisiológica do embrião, que resulta da presença de um sistema enzimático ou outro fator bioquímico não funcional, que requer a posterior maturação fisiológica completa do embrião [19].

A dormência imposta ou dormência ambiental manifesta-se na ausência de germinação em sementes viáveis devido à existência de constrangimentos ambientais. Este tipo de dormência ocorre em sementes que se encontram no solo, ou seja, na ausência de luz e temperatura reduzida à superfície, mas facilmente desaparece quando essas condições ideais são proporcionadas [31].

A dormência induzida, também conhecida por dormência secundária, ocorre após as sementes terem perdido a dormência inata. Este tipo de dormência ocorre em sementes, que

estão providas de água, mas expostas a outras condições desfavoráveis, como temperaturas elevadas ou baixo teor de oxigénio. Nestas condições as sementes não conseguem germinar e a dormência permanece por períodos consideráveis, mesmo quando transferidas posteriormente para ambientes, com as condições adequadas à germinação. A persistência da dormência, após a remoção do ambiente inibitório distingue a dormência induzida da dormência imposta [31].

### **2.3. Pré-tratamentos germinativos**

A dormência é uma grande vantagem quando o objetivo passa pelo armazenamento e conservação das sementes, mas torna-se uma desvantagem quando se pretende uma rápida germinação. À exceção das chamadas espécies de casca dura, anos de pesquisa revelaram pouco sobre os mecanismos da dormência nas sementes e como esta poderá ser superada [19]. No entanto, vários pré-tratamentos e técnicas podem ser equacionadas para estimular a germinação das sementes [23]. Na seleção dos pré-tratamentos a utilizar dever-se-á ter em consideração a possibilidade de ocorrer dois tipos distintos de dormência: tegumentar e endógena (embrionária) [30]. A tegumentar pode ser ultrapassada com pré-tratamentos como embebição e hidratação em água, filamento aquecido, estratificação ácida e escarificação mecânica. A dormência endógena pode ser quebrada com pré-tratamentos por estratificação quente e frios ou a combinação de ambos, tratamentos químicos e tratamentos combinados.

#### **2.3.1. Pré-tratamentos em sementes com dormência tegumentar**

Na dormência tegumentar, o pré-tratamento da semente é efetuado, com o objetivo de romper o tegumento ou outras estruturas que a cobrem, removendo as barreiras, que impedem a entrada de água, as trocas gasosas, o intumescimento do embrião e a emergência da radícula. Os métodos utilizados para superar este género de dormência são coletivamente conhecidos como tratamento de escarificação [19]. Estes asseguram uma elevada percentagem de germinação [32], contudo danificam frequentemente as sementes, pelo que deverão ser usados de forma criteriosa, evitando uma abordagem generalizada para todas as espécies. [31].

Em algumas espécies, as sementes apresentam um involucreto duro, o qual não é completamente impermeável à água. Nesta condição particular, a hidratação das sementes em água à temperatura ambiente, durante 24 a 48 horas, poderá ser suficiente para desencadear a germinação [19, 30].

Num processo similar ao anterior, as sementes poderão ser colocadas em água quente, deixando a arrefecer gradualmente. A água amacia e fragmenta os tegumentos, facilitando a

hidratação. As espécies de leguminosas podem ser tratadas, com água quente facilitando a hidratação e a germinação [19]. As sementes poderão ainda ser hidratadas em água muito quente ou em ebulição, durante alguns minutos, no entanto, este é um método muito agressivo e arriscado [23].

A técnica de escarificação com filamento aquecido poderá ser usada para permitir o contacto da semente com o exterior e possibilitar o processo germinativo, requerendo para o efeito um queimador elétrico para abrir pequenos orifícios no involucre da semente. Este método permite que as sementes sejam conservadas ou devolvidas novamente ao armazenamento, ao contrário de outras técnicas de escarificação [19].

A escarificação ácida consiste na digestão ácida dos tegumentos da semente, com recurso ao ácido sulfúrico concentrado ou outros ácidos fortes, como o ácido clorídrico ou nítrico. Este método é eficaz para várias espécies como o *Teline maderensis*. A duração deste tratamento químico poderá variar, entre os 10 minutos e 6 horas, dependendo da temperatura, do tipo de semente e do lote. Antes do início dos ensaios de germinação as sementes devem ser cuidadosamente lavadas com água corrente para remover na totalidade qualquer ácido e impurezas que permaneçam nas sementes tratadas [19, 23, 30].

O tratamento mecânico tem por objetivo modificar os invólucros seminais duros, tornando-os permeáveis à água ou às trocas gasosas. Diferentes métodos poderão ser usados conforme a quantidade e tipo de semente a escarificar, nomeadamente, com recurso a lâminas, bisturis, facas, limas, tesouras ou lixas de papel. A escarificação de grandes lotes de sementes é realizada com recurso a escarificadores mecânicos, que consistem desde pequenos misturadores de areia ou cascalho de diferentes dimensões, até máquinas que projetam as sementes contra uma superfície abrasiva para provocar a abertura ou danificar os tegumentos [19, 23]. Estes tratamentos deverão ser efetuados com precaução para evitar danificar o embrião e, caso o tratamento seja manual, o local de intervenção mais adequado deverá ser nas pontas dos cotilédones e tão longe quanto possível da base da radícula [30].

### **2.3.2. Pré-tratamentos em sementes com dormência endógena**

Os tratamentos pré-germinação efetuados para superar a dormência interna ou endógena têm por fundamento a alteração fisiológica do embrião, que se encontra em estado latente. Os tratamentos com maior sucesso são aqueles que simulam as condições naturais, no período crucial do ciclo reprodutivo das plantas [19].

Os ensaios, com estratificação a frio simulam as condições naturais de inverno, e são frequentemente usados para quebrar a dormência das sementes de muitas espécies

temperadas, particularmente as que germinam, no habitat natural, durante a primavera. Neste tipo de tratamento as sementes são incubadas em substratos húmidos a baixas temperaturas, que oscilam entre 0° e 10°C [33], durante 1 a 6 meses [19]. O período ótimo de estratificação varia, de acordo com as espécies e entre os lotes da mesma espécie. O armazenamento de determinadas sementes poderá provocar um aumento do período de dormência, exigindo uma estratificação mais longa, ao contrário de sementes da mesma espécie provenientes de lotes mais recentes [19]. A estratificação a frio não é muito eficaz para provocar a quebra da dormência nalgumas espécies a não ser que esta seja precedida da estratificação húmida e quente, temperatura superior a 15°C, durante várias semanas. Este período de incubação é essencial para promover o crescimento dos embriões e desencadear outros processos fisiológicos [33].

Diversas alterações ocorrem na semente, durante o processo de estratificação [33]. A refrigeração transforma as substâncias de reserva nas suas formas solúveis, provocando a ativação dos sistemas enzimáticos e a alteração no equilíbrio entre inibidor/promotor da germinação [19]. Este equilíbrio está relacionado, com os teores de ABA e giberelina. Os teores inicialmente elevados de ABA nos tecidos do embrião atuam como inibidor da germinação. Pelo contrário, o aumento dos teores de giberelinas promove o desenvolvimento embrionário [33].

A estratificação pode ser usada com o propósito de obter uma germinação e emergência uniforme. As baixas temperaturas usadas inibem a germinação de sementes que já não estão dormentes, enquanto outras passam pelos processos endógenos de alteração fisiológica. Quando as sementes são colocadas a germinar em condições favoráveis, obtém-se uma germinação e emergência uniforme [19].

Relativamente aos tratamentos químicos, diversos estudos de germinação demonstraram que muitas espécies germinam mais rapidamente, após o tratamento com vários agentes químicos exógenos, como o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). A aplicação de agentes químicos varia consoante o tipo de sementes em estudo e apresenta grande eficácia em laboratório, com pequenas amostras [19]. Nos tratamentos citados, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> funciona como agente oxidante em espécies com embriões que exibem dormência reduzida, a sua ação estimula a respiração celular, acelerando a germinação [34]. O GA<sub>3</sub> estimula a síntese de enzimas hidrolíticas responsáveis pela digestão das substâncias de reserva, como  $\alpha$ -amílase. Esta difunde-se no endosperma, libertando os açúcares necessários ao crescimento embrionário [35]. O GA<sub>3</sub> está igualmente envolvido na síntese de enzimas como a endo- $\beta$ -manase, que enfraquecem os tegumentos [36].

Já os tratamentos combinados são utilizados quando as sementes apresentam dormências complexas, cujas características implicam que a sua remoção seja conseguida pela ação de dois tipos de tratamento em simultâneo para obter uma boa germinação [19]. Nesse sentido, vários dos pré-tratamentos referidos anteriormente poderão ser combinados quando existem problemas de latência complexa do embrião ou para superar os efeitos do revestimento impermeável das sementes associado aos embriões latentes [23]. Nestes tratamentos as sementes deverão ser submetidas inicialmente ao tratamento para superar a dormência tegumentar e só posteriormente para a dormência embrionária [19].

### **3. Germinação**

#### **3.1. Fatores**

A concretização do processo germinativo requer a mobilização de um sistema de regulação complexo que é influenciado não só pelos fatores intrínsecos, mas também ambientais (bióticos e abióticos).

##### **3.1.1. Fatores abióticos**

Os fatores abióticos que mais influenciam a germinação são a humidade, temperatura, luz e a disponibilidade de oxigénio [19].

Na primeira fase da germinação, a embebição ocorre em sementes vivas e sementes sem viabilidade. A embebição é um processo físico de movimento de massas, caracterizado pela transferência de humidade do solo que, apresenta um elevado potencial na semente desidratada, com baixo teor em água. Este deslocamento leva à libertação dos gases acumulados nas sementes. O tempo em que ocorre a segunda fase está relacionado com o grau de dormência ou germinação retardada das sementes, podendo estar ausente ou distendida no tempo em sementes muito latentes. A última fase ocorre quando o metabolismo se torna ativo, levando a uma maior absorção de água [19]. Para que a germinação ocorra, deverá existir uma quantidade mínima de humidade na semente e potencial hídrico do solo. Em meios com baixo teor de humidade a germinação poderá prosseguir, embora tais condições podem não ser adequadas para garantir o sucesso da germinação. Por outro lado, o excesso de água inviabiliza a germinação, principalmente devido a uma restrição na disponibilidade de oxigénio e promoção do metabolismo anaeróbico [30].

A temperatura influencia a germinação, porque pode alterar o metabolismo e a atividade enzimática nas sementes e, conseqüentemente, influenciar todo o comportamento germinativo

da semente [37]. Este fator climático altera a taxa de absorção de água e a difusão dos nutrientes e gases e a velocidade da germinação. Quando a temperatura é baixa, e a taxa de germinação é reduzida e, sempre que se verifica um aumento da temperatura (até certos limites), a velocidade de germinação incrementa. Uma vez alcançado o limite térmico máximo (temperatura máxima), o aumento adicional da temperatura poderá provocar a inibição e/ou impedir a germinação [30]. As temperaturas elevadas levam a uma redução da atividade enzimática de diversas enzimas diminuindo a eficiência metabólica, caso se verifique uma temperatura inadequadamente alta, as proteínas celulares sofrem desnaturação, desencadeando a morte da semente. As diferentes espécies ostentam distintas temperaturas ótimas para a germinação [30]. As sementes em algumas espécies tem de ser submetidas a uma estratificação a baixas temperaturas ou, pelo contrário, a temperaturas elevadas para superar a inibição germinativa [19].

A luz é outro fator importante na germinação de sementes, principalmente aquelas que apresentam sensibilidade à luminosidade. Para algumas espécies a luz é crucial e pode promover claramente a germinação. Pelo contrário, existem outras espécies, cuja germinação é inibida pela luz, devendo ser posta a germinar no escuro. Uma vez germinadas poderá ser facultada luz às plântulas, para promover o seu crescimento [30, 37]. Para as espécies insensíveis à luz, a sua presença e intensidade não tem influência na germinação [37].

O oxigénio é o aceitador primário de eletrões na respiração celular essencial para fornecer a energia durante a germinação da semente. O défice de oxigénio não representa à partida um impedimento à germinação, há exceção das situações, em que as sementes são colocadas a grandes profundidades ou submersas em água. Nos ensaios é necessário ter em consideração a quantidade de água que é disponibilizada às sementes, uma vez que o excesso poderá formar uma camada espessa em torno da semente, inibindo a entrada de oxigénio e, conseqüentemente, limitando a germinação [19]. Durante a germinação, tal como acontece com a absorção da água, também ocorre a alteração do padrão de absorção de oxigénio. Inicialmente ocorre um curto período de rápida captação, que é alternado posteriormente por um período de absorção muito lenta, culminando num terceiro período de absorção rápida. A medição da permeabilidade das sementes de algumas espécies demonstrou que os tegumentos são muito mais permeáveis à água do que ao oxigénio. Esta diferença em parte poderá dever-se ao consumo de oxigénio pelo próprio tegumento das sementes durante as reações oxidativas. A grande quantidade de compostos fenólicos depositados nos tegumentos sofrem oxidação, sendo responsáveis pelo consumo de uma considerável quantidade de oxigénio [19].

As sementes apresentam uma longevidade limitada. O envelhecimento depende de vários fatores, e aumenta rapidamente se as sementes forem submetidas a condições extremas, nomeadamente, temperaturas elevadas e humidades excessivas, que levam ao aparecimento de plântulas anormais e sementes mortas em testes de germinação [30].

### 3.1.2. Fatores bióticos

A atividade dos microrganismos provocada pela disponibilidade de água, durante a germinação das sementes provoca perdas significativas por putrefação e o decréscimo das taxas de germinação. A humidade pode provocar a disseminação de microrganismos, afetando posteriormente a normal germinação ou mesmo causando o perecimento das sementes. Por outro lado, a humidade quando alternada com períodos de seca pode causar a degradação das estruturas embrionárias, levando à quebra das plúmulas e ao desmembramento dos cotilédones. No processo de conservação é necessário manter as sementes com teores de humidade reduzidos, devendo estas ser submetidas a um processo de secagem artificial, de modo a evitar a degradação provocada pelos microrganismos, insetos e ácaros [30].

O amadurecimento de sementes de diversas espécies, como as do género *Teline*, não acontece de forma homogénea, podendo ocorrer diferenças mesmo entre as sementes da mesma planta. Após a colheita, essas diferenças de maturidade associadas a elevados teores de humidade no mesmo lote estimula o crescimento de microrganismos, durante o armazenamento, cuja atividade aumenta com a temperatura, provocando danos mesmo em sementes maduras, que posteriormente se refletem na germinação [30].

### 3.2. Espécies reativas de oxigénio

As espécies reativas de oxigénio (ROS) foram identificadas recentemente como estando envolvidas na germinação de sementes. Sue et al [38] referem estudos publicados recentemente, em que a produção de ROS, superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), radical hidróxilo ( $OH^{\cdot}$ ) e oxigénio singlete ( $^1O_2$ ) aparecem envolvidas no processo germinativo. Inicialmente consideradas como tendo uma ação prejudicial nas sementes, o papel positivo das ROS começa a ser aceite, embora a sua participação na regulação da germinação permaneça largamente desconhecida. O complexo enzimático da membrana plasmática NADPH-oxidase é uma fonte principal de ROS, produzindo radicais superóxido. A aplicação de um inibidor da NADPH-oxidase conduz à emergência retardada da radícula, indicando deste modo uma participação do complexo na germinação das sementes. Algumas evidências indicam que as ROS geradas

nas sementes podem atuar como um sinal no alívio da dormência, desencadeando o início da germinação.

### 3.3. Processo germinativo

Por definição, a germinação integra todos os acontecimentos que envolvem a semente, que se iniciam, com a sua embebição e hidratação (captação de água) e terminam com a emissão e alongamento do eixo embrionário, permitindo a emergência subsequente das plântulas [39]. Segundo Baskin [19], a germinação é a retoma do crescimento ativo do embrião que resulta na sua emissão e na formação das estruturas essenciais ao desenvolvimento da planta, a partir da semente.

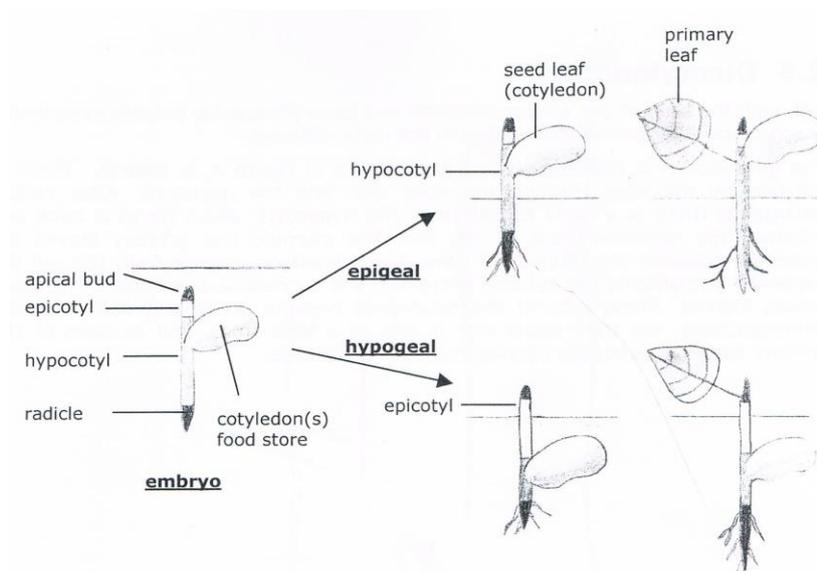
A germinação das sementes é uma fase crucial do desenvolvimento das plantas, determinante para a sua produtividade. Durante o processo germinativo, as alterações fisiológicas e bioquímicas, seguida das modificações ao nível morfológico, estão fortemente relacionadas com a taxa de sobrevivência e o crescimento vegetativo das plântulas que, conseqüentemente, afetam a sua qualidade e rendimento [40].

A maturação permite às sementes adquirirem todos os componentes necessários para retomar a síntese proteica, com exceção dos polissomas. Estes são formados poucas horas após a rehidratação das sementes a partir do recrutamento de ribossomas, utilizando mRNAs de reserva. A maioria dos mRNAs codifica proteínas essenciais para a normal realização do metabolismo celular, ou seja, manutenção do crescimento (processo que não é exclusivo da germinação). Há medida que a germinação prossegue, novas proteínas vão sendo progressivamente sintetizadas, incluindo reguladores celulares, tais como, cinases, H<sup>+</sup> ATPases e proteínas 14-3-3 [41].

O processo de germinação é constituído por uma cadeia de processos metabólicos intensos, envolvendo alterações estruturais subcelulares, o aumento da respiração celular e da atividade enzimática, mobilização das substâncias e nutrientes armazenados nos tecidos de reserva, aumento da *pool* de nucleótidos fosfatados, incluindo a adenosina trifosfato e ácidos nucleicos, divisão celular, crescimento e diferenciação dos tecidos [30]. Em termos práticos, torna-se difícil estabelecer o início e o fim de cada processo, uma vez que os eventos moleculares e celulares ocorrem numa estrutura complexa e multicelular, e a ativação dos mesmos é gradual [42].

O crescimento inicial das plântulas segue dois padrões distintos, classificados como, epigeia e hipogeia (Figura 7). Na epigeia, o hipocótilo alarga e alonga, elevando os cotilédones acima do solo [23]. Em algumas espécies essas estruturas seminais expandem, ficam verdes e

funcionam como folhas [30]. Na hipogeia o desenvolvimento e emergência do hipocótilo não é acompanhado pela elevação dos cotilédones, permanecendo estes no solo [23].



**Figura 7:** Representação esquematizada dos dois tipos de padrão de crescimento das plântulas: epigeia e hipogeia (Figura 3, Secção 2 - germinação 2-5) [30].

### 3.3.1. Marcadores enzimáticos do metabolismo celular

As enzimas são agentes fundamentais na realização do metabolismo celular, mas permanecem inativas, após a formação, maturação e desidratação das sementes. Após a embebição, as sementes retomam rapidamente a atividade metabólica. Durante a primeira fase de embebição as vias glicolítica e da pentose-fosfato oxidativa são ativadas e as enzimas do ciclo de Krebs estimuladas, participando ativamente na mobilização das substâncias de reserva e produção de energia. Os tecidos das sementes desidratadas contêm mitocôndrias pouco diferenciadas, no entanto, estas incluem enzimas do ciclo de Krebs e oxidases terminais suficientes para produzir quantidades adequadas de ATP para sustentar o metabolismo nas primeiras horas da embebição [41].

A embebição da semente desencadeia também a ativação ou síntese de enzimas hidrolíticas responsáveis pela hidrólise das substâncias de reserva e de outros materiais de armazenamento em formas mais simples e disponíveis para absorção pelo embrião. Da mesma forma, o consumo de um nível elevado de oxigênio pode induzir a ativação/hidratação de enzimas mitocondriais, envolvidas no ciclo de Krebs e na cadeia de transporte de elétrons [40].

A malato desidrogenase é uma enzima cujo substrato preferencial é o oxaloacetato. A enzima, através do ciclo do ácido tricarboxílico, catalisa a conversão do malato em oxaloacetato, etapa essencial na produção de energia durante a respiração celular [43, 44]. Além

disso desempenha um papel crucial em muitas vias metabólicas, incluindo, não só o ciclo do ácido tricarboxílico, mas também do glioxilato, síntese de aminoácidos, gliconeogénese e na facilitação da troca de metabolitos entre o citoplasma e organelos subcelulares [43]. Durante a germinação de sementes, as reservas armazenadas são degradadas e mobilizadas para alimentar processos metabólicos, suportados pelo processo respiratório. A malato desidrogenase mitocondrial desempenha um papel crucial nesta fase, catalisando a oxidação reversível do malato para oxaloacetato, fornecendo ATP e substratos essenciais para os processos metabólicos [44].

As peroxidases são uma família de isoenzimas e, estruturalmente, podem ser descritas como glicoproteínas monoméricas contendo heme. A atividade da enzima desempenha um papel fundamental na germinação de sementes e no crescimento inicial do eixo embrionário. A enzima catalisa a oxidorredução entre o  $H_2O_2$  e diversos redutores, incluindo o  $O_2^{\cdot-}$ . Esse processo poderá originar a formação de iões  $OH^{\cdot}$ , um dos agentes básicos responsáveis pela extensão celular através do enfraquecimento da parede celular, facilitando o crescimento do eixo embrionário. O  $H_2O_2$ , geralmente considerado tóxico, para as sementes funciona como um fator da promoção da germinação [45, 46].

### **3.4. Alterações da composição bioquímica das sementes**

Na germinação desencadeiam-se processos metabólicos e fisiológicos responsáveis pelo crescimento do embrião. Estes processos são dominados pela mobilização e conversão das substâncias de reserva em formas solúveis, com a sua transferência para o eixo embrionário [19]. Na germinação dá-se uma reversão drástica de processos, ou seja, as células que sintetizaram as biomoléculas de reserva, durante o desenvolvimento da semente, iniciam repentinamente a sua hidrólise, com a ativação de diversas enzimas, reduzindo o peso seco dos tecidos de reserva [47].

A intensidade da mobilização das substâncias de reserva nos órgãos de reserva aumenta após o fim da germinação, de forma a apoiar o crescimento da plântula, até que esta se torne fotossinteticamente ativa (autotrófica). À medida que as substâncias de reserva de peso molecular elevado são mobilizadas, vão sendo convertidas em metabolitos de baixo peso molecular, facilmente transportadas para as regiões de crescimento, onde são utilizadas na produção de energia e no anabolismo [41].

A germinação e o crescimento inicial das plântulas são sustentados pelos metabolitos resultantes da hidrólise e conversão das substâncias de reserva: hidratos de carbono, proteínas ou lípidos [41]. Embora os três tipos de reservas ocorram na maioria das sementes, a

concentração relativa de cada uma varia consideravelmente nas diferentes espécies [48] e dentro da mesma espécie, uma vez que os fatores ambientais poderão influenciar consideravelmente a composição bioquímica da semente. Os hidratos de carbono, sob a forma de amido, são armazenados em grânulos no endosperma, mega-gametófito e/ou nos cotilédones, dependendo da espécie. Os lípidos depositam-se nas sementes nos leucoplastos ou lipoproteínas, sob a forma de gorduras e óleos (corpos gordos), dependendo da proporção de ácidos gordos saturados ou insaturados. A maioria das proteínas são armazenadas nos corpos proteicos e organelos, com 1 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Além do armazenamento das proteínas, os corpos proteicos poderão ainda incluir nutrientes minerais. Algumas proteínas poderão estar armazenadas nos núcleos, mitocôndrias, proplastídeos e no citoplasma celular [47].

### 3.4.1. Hidratos de carbono

O amido é o hidrato de carbono de reserva mais comum nas sementes [41]. Nas fases iniciais da germinação o amido é convertido em açúcares solúveis, sob a ação das amilases e a atividade das fosforilases aumenta exponencialmente. Os açúcares solúveis são transportados do endosperma para o embrião de forma a induzir o seu crescimento.

A amilose e a amilopectina dos grãos de amido de espécies como o trigo ou o milho são primeiro hidrolisados pela ação da  $\alpha$ -amilase que rompe aleatoriamente as ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) entre os resíduos de glicose. A degradação do amido é auxiliada pela  $\beta$ -amilase que separa sucessivos dissacarídeos de maltose a partir da terminação não redutora das cadeias. Em algumas dicotiledóneas a degradação do amido envolve a fosforólise (adição de grupos fosfato) em detrimento da amilólise, introduzindo uma fração de fosfato na ligação  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) entre o penúltimo e último monossacarídeo de glicose na extremidade não redutora da cadeia polisacarídica, onde a enzima amido fosforilase substitui a  $\alpha$ -amilase como enzima principal da degradação do amido [41].

Na determinação do teor dos açúcares, os hidratos de carbono são hidrolisados em açúcares simples e posteriormente desidratados, produzindo compostos hidroximetil furfurais. Estes compostos formam com a antrona um produto de cor verde, com um máximo de absorção aos 630 nm. Na quantificação do amido aplica-se a mesma metodologia, no entanto, as amostras são primeiramente tratadas com álcool para remover os açúcares mais simples [49].

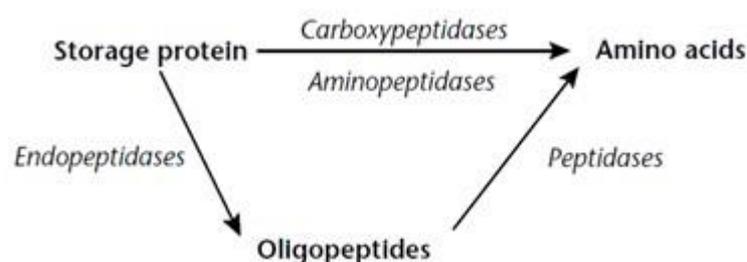
### 3.4.2. Proteínas

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nos sistemas biológicos, sendo essenciais na realização dos processos bioquímicos que definem a vida, desempenhando diferentes funções estruturais e funcionais, destacando-se na catálise enzimática, bioregulação, defesa e proteção, suporte e movimento [50].

Segundo as classificações mais recentes, as proteínas da semente podem ser classificadas em: proteínas de reserva, proteínas estruturais e proteínas funcionais. As primeiras proteínas não têm atividade enzimática, e servem principalmente como fonte de aminoácidos, azoto e enxofre, essenciais para o processo de germinação e desenvolvimento da planta. As proteínas estruturais são responsáveis pela estrutura da semente. As proteínas funcionais são diversificadas e incluem, entre outras, as lectinas, enzimas e inibidores enzimáticos [51].

As proteínas armazenadas nas sementes diferem de espécie para espécie e a sua concentração varia consoante a origem e estado de maturação da semente. No *Pinus contorta* (pinheiro-da-praia), as proteínas cristaloides insolúveis são as principais proteínas de reserva armazenadas nas sementes maduras, localizadas principalmente no mega-gametófito. Durante a germinação estas proteínas são hidrolisadas em aminoácidos transportados para o eixo embrionário em desenvolvimento. As sementes de *Abies alba* (abeto prateado) em repouso apresentam no embrião o dobro da concentração proteica em relação ao mega-gametófito. As proteínas solúveis e insolúveis presentes no embrião desta espécie suportam o metabolismo, antes da mobilização das proteínas armazenadas no mega-gametófito [47].

Na mobilização das proteínas, participam diversas hidrólases, da subclasse das peptídases. As endopeptidases clivam as ligações peptídicas das proteínas de reserva, dando origem a oligopéptidos menores, que são por sua vez hidrolisados por peptidases para produzir aminoácidos. As aminopeptidases e carboxipeptidases clivam os aminoácidos terminais da cadeia das proteínas ou oligopéptidos, a partir da extremidade amina ou carboxilo livre, respetivamente (Figura 8) [41].



**Figura 8:** Representação esquematizada da hidrólise das proteínas de reserva realizada por peptidases ou protéases (Figura 1, pág. 4) [41].

Na maioria das dicotiledóneas, as proteínas de reserva estão armazenadas em corpos proteicos dentro dos cotilédones. Durante a germinação, as enzimas da subclasse das proteases (proteases A) clivam as proteínas de reserva, dando origem a péptidos solúveis de cadeia mais curta, que podem ser hidrolisados, até darem origem a aminoácidos livres. Endopeptidases (proteases do tipo B) e carboxipeptidases são então capazes de hidrolisar as proteínas de reserva parcialmente degradadas para produzir pequenos oligopéptidos ou aminoácidos. Este tipo de reações ocorre no interior dos corpos proteicos e, após serem libertados para o citoplasma, os oligopéptidos sofrem nova degradação por ação de aminopeptidases e peptidases originando aminoácidos livres [41].

Diversos métodos são utilizados na determinação do conteúdo de proteínas nas amostras, incluindo o método de Biureto, Lowry, Pierce BCA (baseado no ácido bicinconínico), Bradford, ninidrina ou turbidimetria. Estes métodos são baseados em propriedades específicas de determinadas proteínas, aminoácidos ou cadeias peptídicas. O doseamento da proteína envolve a extração, isolamento, e em muitos casos a purificação parcial ou total da fração proteica. Os métodos de Kjeldahl e de Combustão de Dumas, ambos baseados na deteção e quantificação do azoto contido na amostra, são os mais usados em análises da composição bioquímica ou nutricional de rotina [52].

### **3.4.3. Lípidos**

Os triacilglicéridos (TAGs) são os principais lípidos de reserva presentes nas sementes [41]. Na conversão das reservas de gordura nas sementes, estas são primeiro hidrolisadas em glicerol e ácidos gordos pela ação de lipases. Alguns dos ácidos gordos hidrolisados são utilizados na síntese de fosfolípidos e glicolípidos necessários para a formação das estruturas e membranas celulares. Contudo, a maior parte dos ácidos gordos obtidos são convertidos em acetil-coenzima A e utilizados na produção de energia ou na síntese de açúcares [47].

Nas sementes oleaginosas de plantas lenhosas as reservas lipídicas são hidrolisadas e transformadas em hidratos de carbono solúveis, principalmente glicose, e utilizados como fonte de energia para o crescimento do embrião durante a germinação [19]. No entanto, em algumas espécies, ocorre pouca ou mesmo nenhuma conversão dos lípidos em açúcares, como no exemplo das sementes das palmeiras-de-óleo (plantas produtoras de óleo de palma), em que a maioria dos lípidos são consumidos na respiração celular, durante a germinação. Nas sementes das árvores de *Pseudotsuga menziesii* (conífera nativa da América do Norte) os lípidos são a principal substância de reserva, constituindo, respetivamente, 48 e 55% do peso seco do gametófito e do embrião. Na fase inicial da germinação, os lípidos do gametófito diminuem

grandemente e são mobilizados para o desenvolvimento embrionário (nesta fase, o peso seco do embrião aumenta 600% e o mega-gametófito diminui 70%) [47].

Segundo Bewley [41], no catabolismo dos TAGs das sementes participam três organelos celulares: corpos de óleo ou adipócitos que armazenam os TAG, onde se dá o início da hidrólise dos TAGs (lipólise), dando origem aos ácidos gordos livres e glicerol; os glioxissomas, onde os ácidos gordos são oxidados e ocorre a síntese do succinato, através do ciclo do glioxilato; e as mitocôndrias, onde são sintetizados o malato ou oxaloacetato, a partir da conversão do succinato, e que são, posteriormente, transformados em glicose no citosol para produzir sacarose [41].

Na extração de gorduras em amostras biológicas, é necessário ter atenção que os lípidos neutros dissolvem-se bem em solventes orgânicos apolares, e os lípidos complexos, particularmente os fosfolípidos, só se dissolvem em solventes relativamente polares. Neste sentido, a extração dos lípidos dos tecidos deverá ser realizada, com recurso a uma mistura de solventes orgânicos, suficientemente polar para remover as gorduras agregadas nas membranas celulares e componentes histológicos, mas suficientemente apolares para dissolverem e extraírem os lípidos neutros [53, 54]. Folch et al [55] desenvolveram um sistema de clorofórmio:metanol:água (método de Folch), que permite alcançar estes objetivos. Várias modificações deste método de extração continuam a ser utilizadas para extrair e determinar por gravimetria o teor de lípidos. Outras metodologias menos exaustivas foram desenvolvidas, entre as quais o método de Bligh e Dyer [56], que se tornou um dos mais recomendados para determinar os lípidos totais em amostras biológicas [54].

#### **3.4.4. Minerais**

As sementes, para além das substâncias de reserva, contêm um grande número de outros constituintes, entre outros: minerais, compostos fosforados, ácidos nucleicos, alcaloides, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, vitaminas e hormonas reguladoras de crescimento (auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico e etileno) [47, 57].

As sementes apresentam um grande número de elementos minerais considerados essenciais [57]. O fósforo, potássio, magnésio e cálcio representam macronutrientes, enquanto o manganês, ferro e zinco, entre outros, micronutrientes. A mobilização das reservas da semente, durante a germinação, fornece os nutrientes minerais necessários para o desenvolvimento da plântula. Embora sejam ainda pouco conhecidos os mecanismos associados à mobilização dos minerais nas sementes, vários trabalhos têm demonstrado a importância da composição mineral das sementes no processo de germinação. Exemplo são os

fluxos de cálcio, um elemento importante das vias de transdução de sinal, que desencadeiam os processos metabólicos relacionados, com a germinação. Estudos recentes no trigo (*Triticum aestivum*) demonstraram que as reservas de zinco são críticas para o crescimento vigoroso em solos, com déficit deste mineral, e que reservas adequadas de manganês reduzem a incidência de ataques provocados por fungos da espécie *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* que danifica todo o sistema radicular da planta [58].

Durante a maturação das sementes, o fósforo inorgânico e outros nutrientes minerais são armazenados sob a forma de fitatos [57]. Estes compostos orgânicos armazenam quantidades de fósforo, que representam entre 50 a 80% do total de fósforo presente nas sementes, e depositam-se nos corpos proteicos [59]. Os fitatos são sais de ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato) que, ao se ligarem ao potássio, magnésio e cálcio, dão origem à fitina. Esta, embora presente em quantidades relativamente pequenas quando comparada com as principais substâncias de reserva (lípidos, proteínas e hidratos de carbono), constitui uma importante fonte de fosfatos nas sementes. A fitina pode ser igualmente uma fonte de ferro, manganês, cobre, e embora em menor quantidade, de sódio [57, 58, 60].

O teor dos minerais totais pode ser quantificado de acordo com a Norma Portuguesa 518/1986, através de incineração das amostras a 550°C, ficando estas reduzidas a cinza, que representam a componente inorgânica ou mineral da amostra.

#### **4. Substratos**

O termo substrato é aplicado a todo o material sólido, natural ou sintético, mineral ou orgânico, colocado num volume fisicamente limitado. O substrato é usado em estado puro ou misturado, como suporte para a fixação das plantas e constitui o ambiente ideal para o desenvolvimento das raízes. Os substratos podem ser quimicamente ativos, como as turfas e a matéria orgânica, ou inertes, como a perlite, lã de rocha e vermiculite, intervindo ou não diretamente no processo de nutrição das plantas [23, 61].

Neste tipo de ensaios é importante que os substratos estejam disponíveis e que o custo associado seja acessível. Este requisito, associado a uma maior consciência social relacionada com o uso dos recursos não renováveis, tem levado à crescente utilização de misturas de materiais autóctones alternativos considerados mais sustentáveis. Estes produtos são cada vez mais incluídos na dinâmica da produção agroflorestral, resultando em subprodutos biodegradáveis ou recicláveis [61]. Tendo em atenção estes considerandos, neste trabalho foram testados substratos simples ou compostos na germinação das espécies em estudo,

nomeadamente, turfas, e produtos alternativos, como o solo vegetal proveniente do interior de povoamentos florestais e adubos orgânicos.

Na produção das plantas pela via seminal ou através da repicagem de novas plântulas dentro de um recipiente, o desenvolvimento das suas raízes é limitado pelo espaço disponível, ao contrário do que acontece em áreas abertas. Esta situação faz com que as necessidades relativamente à capacidade de retenção de água, arejamento e disponibilidade de nutrientes no substrato, sejam maiores do que as que teriam de ser observadas nos cultivos em campo aberto, pelo que a escolha do tipo de material a utilizar torna-se ainda de maior importância nesse contexto [11].

#### 4.1. Textura

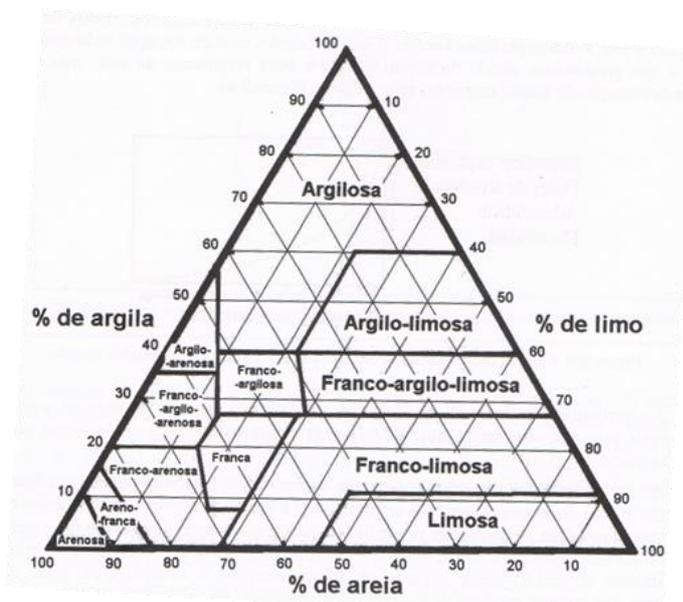
A maior parte do material sólido, exceto os solos orgânicos, é constituído por substâncias minerais de diferente dimensão e composição. Os materiais, com dimensão superior a 2 mm, são elementos grosseiros. Estas partículas apresentam uma fraca reatividade e a sua presença é responsável pela redução da quantidade de água e nutrientes disponível no solo. A presença de uma elevada quantidade de elementos grosseiros diminui a fertilidade do solo. No entanto, a utilização destes materiais não deve ser desaconselhada, dado que este tipo de partículas contribui para a formação de poros de grandes dimensões, benéficos para a drenagem e crescimento radicular [62].

As partículas de solo, com dimensão inferior a 2 mm, são designadas por terra fina. Esta é a principal responsável pelas propriedades químicas do solo, particularmente a capacidade tampão e de retenção de nutrientes. Assim sendo, a fertilidade dos solos é avaliada neste tipo de fração. A textura é determinada pela proporção entre partículas de diferente dimensão de terra fina. Segundo a União Internacional de Ciências do Solo (UICS), as partículas são divididas em três níveis: areia (partículas com 0,02 a 2,0 mm), Limo (partículas com 0,002 a 0,02 mm) e Argila (partículas que apresentam dimensões inferiores a 0,002 mm) [62].

As areias deixam espaços volumosos entre as partículas devido às suas dimensões, proporcionando a rápida drenagem interna e um bom arejamento, mas têm uma capacidade de retenção de água e nutrientes muito baixa. As argilas apresentam carga, normalmente negativa, sendo capazes de atrair nutrientes e moléculas de água, pelo que determinam em grande medida as propriedades químicas do solo. Por fim as partículas de limo são uma espécie de terra fina intermédia [62].

De acordo com Varennes [62], a textura pode ser classificada em 12 classes distintas. O solo apresenta uma textura grosseira se predominar a fração da areia (e são solos arenosos,

areno-francos ou franco-arenosos), fina se prevalecerem as argilas (solos argilosos, franco-argiloso-limosos, franco-argilosos, argiloso-arenosos ou argilo-limosos) ou mediana se predominar o limo (solos limosos, francos, franco-limosos e franco-argilo-arenosos). Na Figura 9 são apresentadas as diferentes classes de solo, de acordo, com a textura.



**Figura 9:** Diagrama representando as classes de textura dos solos, segundo os teores de areia, limo e argila (Figura 2.5, pág. 24) [62].

Os solos de textura mediana são considerados os mais adequados à produção, visto exibirem uma capacidade de retenção de água e nutrientes superior aos solos de textura grosseira, melhor arejamento e maior facilidade de mobilização do que os de textura fina [62]. No entanto, Correia et al [23] cita que o melhor substrato é o que apresenta uma textura grosseira média, uma vez que retém a água, que fica “facilmente disponível” e assegura um arejamento adequado.

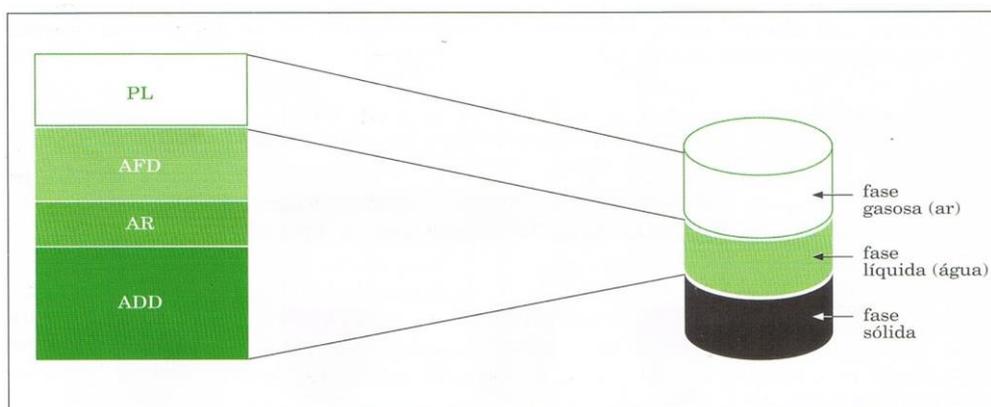
## 4.2. Propriedades físicas

As propriedades físicas do substrato estão relacionadas, com o tipo de materiais, sendo de difícil modificação uma vez estabelecido o cultivo [23]. Estas propriedades são determinadas pela estrutura interna das partículas, sua granulometria e tipo de acondicionamento [61]. Os principais elementos físicos que influenciam a germinação e crescimento das plântulas estão relacionados com as condições hídricas e arejamento dos substratos. Várias propriedades físicas podem influenciar a germinação de sementes, entre as mais importantes incluem-se a granulometria (supracitada na textura), porosidade total, densidade aparente e real, retenção de água e arejamento [11, 23].

A porosidade depende em parte da textura, mas sobretudo da estrutura do solo, ou seja, do modo como as partículas estão dispostas no espaço, normalmente formando agregados [62]. A porosidade total (Pt) de um substrato é a percentagem do seu volume que não se encontra ocupada pela fase sólida, estando ocupada pela água ou pelo ar. Uma elevada Pt corresponde a uma retenção elevada de água e um bom arejamento [11]. Correia et al [23] cita que o Pt ótimo do substrato situa-se acima dos 85%.

A densidade ou massa volúmica aparente é definida como a relação entre a massa seca e o volume ocupado pela matéria sólida, incluindo o espaço poroso entre partículas [23, 62]. A densidade real é a densidade média das partículas do substrato sem incluir o espaço poroso, isto é, a relação entre o peso e o volume ocupado pelas partículas do substrato [23].

A absorção de água pelas sementes e plantas depende de vários fatores, nomeadamente, das características das próprias plântulas, da atividade do sistema radicular e das suas características morfológicas; das condições climáticas que vão determinar as exigências de água; e das propriedades do próprio substrato, responsável pela maior ou menor disponibilidade de água. Se os poros do substrato apresentarem dimensões muito reduzidas, a água poderá ficar retida nesse substrato, não sendo absorvida. Nesse sentido, a retenção de água deverá ser considerada como uma condição essencial ao sucesso ou fracasso da utilização de um determinado material como substrato. Assim sendo, é essencial recorrer a diversos parâmetros para determinar a quantidade de água retida, que terá um valor entre o limite máximo, correspondente à capacidade máxima de retenção do substrato, e o limite mínimo, relacionado com a fração mínima de água retida pelo substrato. Na Figura 10, os parâmetros representados são fundamentais para melhor compreender a água retida no substrato [11].



**Figura 10:** Variação da capacidade de retenção da água, seus limites (superior e inferior) e parâmetros associados: PL - porosidade livre ou volume de ar; AFD - água facilmente disponível; AR - água de reserva; ADD - água dificilmente disponível, (Figura 9, pág. 90) [11].

A AFD corresponde à água que pode ser facilmente absorvida pela plântula. A AR corresponde à água presente no substrato menos disponível, mas que ainda poderá ser absorvida em situações de *stress*. A água disponível é a quantidade de água que pode ser absorvida, e corresponde ao somatório da AFD e AR. A PL corresponde ao volume total dos poros que se encontra preenchido por ar e que, deste modo, contribui para as trocas gasosas do substrato com as plântulas, ou seja, corresponde à diferença entre a porosidade total e o volume de água retido no substrato [11, 61].

### 4.3. Propriedades químicas

As propriedades químicas do substrato influenciam a assimilação dos nutrientes pelas plantas [14]. Estas são responsáveis pela transferência de minerais entre a fase sólida e a solução aquosa do substrato, o que é conseguido através de reações de: dissolução e hidrólise dos constituintes minerais (química), intercâmbio de iões (físico-química) e reações de biodegradação da matéria orgânica (bioquímica). Os materiais orgânicos contribuem maioritariamente para a química dos substratos devido à formação e presença de substâncias húmicas, o produto final mais importante da decomposição da matéria orgânica [63]. De acordo com a literatura consultada, poderão ser consideradas como as características químicas mais revelantes para a utilização de um substrato a capacidade de troca catiónica, o teor de nutrientes minerais e o pH do substrato [11, 14, 23, 61, 63].

Determinados materiais utilizados na composição de substratos apresentam na sua composição partículas coloidais heterogéneas de natureza orgânica e/ou mineral (dimensão inferior a 0,002 mm), onde predominam as cargas elétricas negativas na superfície. Estas partículas coloidais têm a capacidade de adsorver catiões na superfície, a partir da fase líquida do substrato. Os catiões adsorvidos podem participar nas trocas iónicas, com raiz. Por este motivo, os catiões que estão sujeitos a este fenómeno de adsorção são designados por catiões de troca, e ao conjunto dos componentes do substrato que se encontram envolvidos nos mecanismos de adsorção dá-se o nome de complexo de troca. A totalidade dos nutrientes (catiões) do complexo de troca constituem um depósito importante, uma vez que vão sendo libertados à medida que são absorvidos pelas plantas [11]. A totalidade dos catiões que podem ser adsorvidos por unidade de peso ou de volume de um substrato é definida como a capacidade de troca catiónica (CTC) [23, 63]. Estes catiões ficam retidos, não sofrendo lixiviação pelas águas, permanecendo disponíveis para as plântulas. Os materiais utilizados como substratos apresentam distintos valores de CTC. Os valores ótimos estão estreitamente dependentes da fertilização, isto é, se existir uma aplicação frequente de fertilizantes, a capacidade de absorção

dos cátions não constitui qualquer vantagem, sendo recomendada a utilização de substratos inertes, com uma CTC muito baixa ou nula. Pelo contrário, se a fertilização for reduzida ou nula, é conveniente a utilização de substratos que apresentam uma CTC moderada ou elevada [63]. Neste sentido, é recomendado o uso de substratos, com elevada CTC, uma vez que a perda dos cátions por lixiviação é menor, permitindo a redução da quantidade de fertilizante a aplicar e da contaminação das águas subterrâneas. Consequentemente, o uso de substratos com CTC elevada torna-se mais económica e vantajosa do ponto de vista ambiental [11, 63].

Uma importante propriedade dos substratos é a sua reação iónica, traduzida no pH. Os substratos podem exibir uma reação ácida, neutra ou alcalina, de acordo com as proporções relativas em que se encontram os constituintes que, pela sua natureza, influenciam as propriedades físicas, químicas e biológicas. Estas propriedades vão determinar a atividade dos microrganismos, a estabilidade dos agregados e a disponibilidade dos nutrientes [11, 62]. As plântulas podem desenvolver-se num amplo intervalo de pH, sem perturbações fisiológicas aparentes, desde que os valores pH não afetem a biodisponibilidade e assimilação dos nutrientes. No entanto, o desenvolvimento e crescimento das plântulas é afetado negativamente em condições extremas pela acidez ou alcalinidade [63].

#### **4.4. Disponibilidade de nutrientes**

O desenvolvimento das plantas depende da disponibilidade de nutrientes, isto é, das substâncias necessárias ao seu desenvolvimento inicial e consequente produção. A variação dos nutrientes pode afetar positiva ou negativamente os processos fisiológicos das plantas, a regulação do crescimento, o fluxo de energia ou a síntese de compostos orgânicos [11].

A maioria dos substratos minerais usados na germinação e desenvolvimento das plantas não se decompõem, nem química, nem biologicamente. Pelo contrário, os substratos orgânicos diferem marcadamente entre si no conteúdo de nutrientes assimiláveis. Alguns apresentam um nível reduzido de nutrientes, enquanto outros, como os compostos, exibem níveis elevados, dependendo da origem do composto e do processo de compostagem. Independentemente do tipo de substrato poderão ser adicionados nutrientes como fertilizante de base ou como fertilizante em todo o ciclo reprodutivo das plantas [63]. Neste trabalho não foi adicionado qualquer tipo de fertilizante aos substratos testados, uma vez que o objetivo passava fundamentalmente por estudar o potencial da sua utilização na germinação e emergência das plântulas até à formação das primeiras folhas, sem alteração das variáveis associadas aos substratos.

Os nutrientes necessários podem ser classificados de acordo com o seu comportamento bioquímico e as funções desempenhadas (critério fisiológico). Os elementos necessários ao desenvolvimento das plantas têm que satisfazer três critérios fundamentais: na sua ausência, as plantas não conseguem completar o seu ciclo biológico; desempenha funções específicas na planta, não podendo ser substituído por outro; faz parte de uma molécula orgânica, ou é necessário em alguma etapa do metabolismo [62].

As plantas, a partir da atmosfera, absorvem grande parte do carbono e do oxigénio e a partir da água o hidrogénio. Os nutrientes que se encontram no solo sob a forma de minerais insolúveis não estão disponíveis para as plantas. Apenas os elementos presentes na solução aquosa do solo poderão ser absorvidos. À medida que os elementos são retirados da solução, estes são repostos a partir de formas absorvidas pelos diferentes materiais que compõem o solo, ou por decomposição da matéria orgânica, assegurando deste modo o fornecimento contínuo de nutrientes à raiz [62].

#### **4.5. Componentes utilizados na formulação dos substratos**

A escolha dos materiais para a formulação de um substrato depende das necessidades específicas das plantas, considerando fatores como a retenção de água, arejamento do solo, disponibilidade de nutrientes. A combinação adequada desses materiais é fundamental para criar um substrato que proporcione um ambiente ideal para o desenvolvimento saudável das plantas.

As turfas são materiais orgânicos de origem natural, formadas a partir da decomposição de musgos e plantas superiores submetidas a um processo de carbonização lenta, em condições anaeróbicas. Vários tipos de turfas distinguem-se pela sua formação, origem, obtenção e estado de decomposição, sendo classificadas em turfeiras baixas, solígenas ou eutróficas, e turfeiras altas, ombrógenas ou oligotróficas [23].

As turfeiras baixas são de origem herbácea, fortemente decompostas e negras. As suas propriedades físicas e químicas torna-as pouco vantajosas na utilização como substratos para as plantas, uma vez que apresentam baixa capacidade de retenção de água disponível, elevada contração ou alta salinidade. No entanto, estas turfas poderão ser usadas com êxito se forem submetidas a tratamentos ou misturadas com outros materiais [23, 63]. As turfeiras altas são compostas principalmente por materiais de espécies pouco exigentes, como os esfagnos, musgo do género *Sphagnum*, que representam cerca de 90% da biomassa das turfeiras. Estas são pobres em nutrientes e formam-se em regiões frias, com precipitações e humidade relativa elevadas, como o Canadá, Finlândia, Irlanda, Polónia ou Rússia. A turfa pode ser distinguida

com base na decomposição dos materiais vegetais: uma camada superficial, com coloração castanho-clara, tem excelentes propriedades físico-químicas, incluindo alta porosidade, retenção de água, arejamento e capacidade de troca catiônica; uma camada mais profunda, fortemente decomposta e de cor negra, tem menor qualidade. O congelamento natural melhora as suas propriedades, tornando-as adequadas como substratos [23, 63].

Os principais fertilizantes orgânicos incluem os estrumes, chorumes, biossólidos (lamas e tratamento de esgotos) e os compostos. Estes são uma boa fonte de macro e micronutrientes, em especial os estrumes e chorumes. A aplicação dos estrumes contribui para uma menor adsorção do fósforo à matriz do solo, ficando uma maior percentagem disponível na solução. Este fertilizante melhora as propriedades físicas do solo, dotando-o de húmus, pelo que a sua utilização em mistura com outros materiais na formulação de substratos é fundamental [63].

A matéria orgânica do solo é constituída por uma grande variedade de elementos e substâncias, tecidos mortos em vários estados de decomposição, mas ainda de origem reconhecível, e uma mistura complexa de material orgânico, já decomposto e totalmente modificado ou sintetizados de novo, o húmus, considerado o produto final da decomposição, e que representa cerca de 60-80% da matéria orgânica total dos solos [62, 64]. A matéria orgânica, especialmente as substâncias húmicas, desempenham um papel importante na fertilidade dos solos, uma vez que contêm grupos funcionais carregados negativamente, que atraem cátions em proporções variáveis em função da afinidade destes, com os centros de absorção e da sua concentração na solução, criando, desta forma, um centro de disponibilidade de nutrientes essenciais [63]. Valores extremos de pH (alcalino ou ácido) reduzem a produção de matéria orgânica no solo. Esta diminuição afeta a formação das substâncias húmicas, uma vez que as condições para o crescimento dos microrganismos do solo são pobres (os fungos são menos sensíveis do que as bactérias em condições de solo ácido), resultando em baixos níveis de oxidação biológica dos materiais orgânicos [64]. Várias análises efetuadas em solos de coníferas mostraram uma acentuada acidificação, embora a acidez varie amplamente com a espécie e as condições iniciais do solo. Neste âmbito, locais com espécies coníferas exóticas podem produzir uma acidificação significativa do solo [65].

A perlite, um silicato de alumínio natural e composição variável, é quimicamente constituída por sílica ( $\text{SiO}_2$ ), óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e pequenas quantidades de vários óxidos metálicos (sódio, potássio, ferro, cálcio e magnésio), também é utilizada na composição dos substratos para ensaios de germinação [63, 66]. A perlite melhora as características físicas dos substratos, aumentando a sua capacidade de drenagem e arejamento. Em misturas pode ser utilizada nas proporções de 10 a 30%, dependendo do tipo de substrato [14, 63]. A perlite na

superfície dos substratos protege as sementes do vento e da luz direta, durante o processo germinativo inicial, mantendo ao mesmo tempo a humidade no solo.

#### 4.6. Características recomendáveis num substrato

O crescimento radicular é condicionado pelas características dos substratos e pelo tipo de material que é utilizado nos meios de cultura [23]. O substrato adequado é aquele que apresenta bom arejamento, com uma ventilação adequada, que garanta o fornecimento contínuo de oxigénio e impeça a acumulação de teores tóxicos de dióxido de carbono [62]. O substrato deve ainda apresentar uma boa drenagem, ter reduzida salinidade, possuir um poder tampão elevado de forma a manter o pH, e possuir uma boa capacidade de retenção de água para garantir a nutrição adequada da planta. Adicionalmente, deve apresentar-se isento de microrganismos nocivos [11]. Os substratos deverão apresentar as características resumidas na Tabela 1 para obter bons resultados durante a germinação, enraizamento e crescimento das plantas.

**Tabela 1:** Características recomendáveis num substrato [63].

<b>Propriedades físicas</b>	Tamanho das partículas que permita uma elevada capacidade de retenção de água e um bom arejamento
	Baixa densidade aparente
	Elevada porosidade total
	Estrutura estável que impeça a contração ou inchamento do substrato
<b>Propriedades físico-químicas e químicas</b>	Baixa apreciável da capacidade de troca catiónica, dependendo se a fertirrigação, é aplicada permanente ou intermitente
	Suficiente nível de nutrientes assimiláveis
	Salinidade reduzida
	pH ligeiramente ácido e moderada capacidade tampão
	Velocidade de decomposição da matéria orgânica mínima
<b>Outras propriedades</b>	Livre de sementes de infestantes, substâncias fitotóxicas, nemátodos e outros agentes patogénicos
	Reprodutibilidade e disponibilidade
	Baixo custo
	Fácil de preparar e manusear
	Fácil de desinfetar e boa solidez aquando da desinfecção
	Resistência a mudanças físicas, químicas e ambientais extremas

As características apresentadas, como referido anteriormente, variam em função da finalidade do substrato. De acordo com Saéz [61], se os materiais são destinados à germinação de sementes, deverão ser de fácil manuseamento, com o mínimo de perturbação para as raízes,

de textura fina e elevada retenção de água (de forma a manter um grau de humidade constante), baixa capacidade de nutrição e baixa salinidade.

Os substratos mais utilizados no desenvolvimento de sementeiras são preparados a partir de misturas de dois ou três diferentes materiais, e, por vezes, são incorporados outros componentes, tais como fertilizantes [23].

## 5. Objetivos

Este trabalho teve o propósito de estudar a germinação de 4 espécies nativas lenhosas da ilha da Madeira: *Teline maderensis*, *Laurus novocanariensis*, *Vaccinium padifolium* e *Myrica faya*, com potencial silvícola e interesse económico, caracterizando alguns dos seus parâmetros bioquímicos e fenológicos, em relação aos quais o estado do conhecimento é limitado.

A análise da bibliografia demonstra uma lacuna de conhecimentos relacionados com a bioquímica e fisiologia de germinação destas espécies, condicionando a obtenção de sementes com padrões de qualidade e viabilidade, que permitam o sucesso das sementeiras. Pelo que este estudo visa contribuir para a melhor compreensão destes processos.

Assim, pretendemos determinar se são os fatores externos, ecológicos (condições edafoclimáticas), internos e/ou condições fisiológicas que condicionam o sucesso da germinação e a disponibilidade das novas plântulas.

Para responder a esta questão, o estudo apresenta os seguintes objetivos:

- 1- Caracterizar as sementes das espécies em causa e compreender como estas respondem às condições de humidade;
- 2- Realizar ensaios para avaliar a influência das condições edafoclimáticas em diferentes locais;
- 3- Testar as condições de germinação em estufa e em diferentes substratos de forma a identificar as condições ideais de germinação em ambientes controlados;
- 4- Compreender a eficácia dos pré-tratamentos na superação de dormências associadas;
- 5- Avaliar a composição bioquímica das sementes e o papel de dois marcadores do metabolismo na germinação, através da análise da sua alteração ou atividade, durante o processo germinativo;
- 6- Reunir os conhecimentos adquiridos sobre cada espécie, a fim de facultar um guia a todos os interessados na biologia, propagação e conservação destas espécies.

## 6. Material e métodos

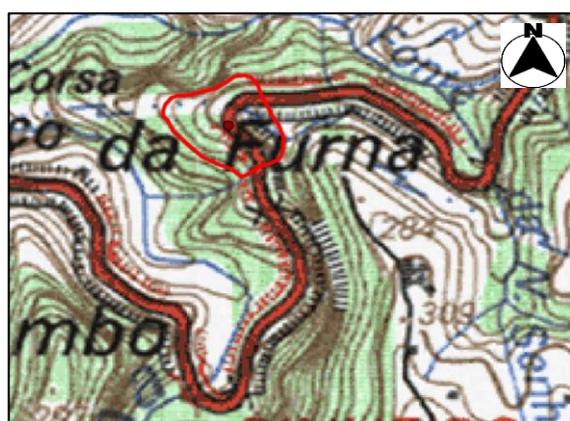
Neste trabalho foram utilizadas sementes das 4 espécies lenhosas estudadas. Os frutos com as sementes foram colhidos em distintos locais da Madeira consoante as espécies, e em dois estados de maturação (Lote 1 e Lote 2). O Lote 2 corresponde ao estado de maturação mais avançado. Consequência do comportamento recalcitrante do *L. novocanariensis*, efetuou-se uma colheita adicional no ano subsequente (Lote 3), com a finalidade de testar e comparar o comportamento dos três lotes durante o processo germinativo da espécie nos ensaios bioquímicos. Na Tabela 2 estão identificados os locais de colheita dos frutos e sementes.

**Tabela 2:** Origem do material reprodutivo utilizado no estudo.

Espécie	Lote	Códigos	Data da colheita	Local de recolha	Freguesia / Concelho
<i>Myrica faya</i>	1	L1Myr	13/08/2014	Cabeço do Sr. Ramos	Santana / Santana
	2	L2Myr	29/08/2014		
<i>Vaccinium padifolium</i>	1	L1Vap	26/09/2014	Silveirinha	Ponta do Pargo / Calheta
	2	L2Vap	13/10/2014		
<i>Teline maderensis</i>	1	L1Tem	22/08/2014	Queimadas	Santana / Santana
	2	L2Tem	08/09/2014		
<i>Laurus novocanariensis</i>	1	L1Lrn	29/09/2014	São Jorge	São Jorge / Santana
	2	L2Lrn	08/10/2014		
	3	L3Lrn	05/10/2015		

L1 – Lote 1; L2 – Lote 2; L3 – Lote 3; *Myr* representa a espécie *M. faya*; *Vap* – *V. padifolium*; *Tem* – *T. maderensis*; *Lrn* – *L. novocanariensis*.

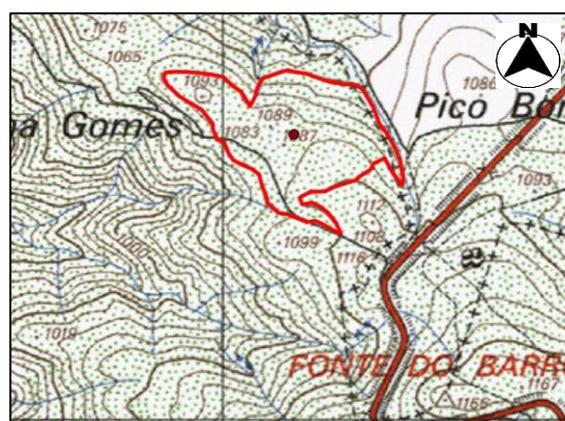
Nos mapas 1 a 4 (Figura 11) estão identificadas as áreas de recolha do material reprodutivo.



Mapa 1 : Localização da área de recolha de *Myrica faya*

Levantamento dos limites efetuado com recurso a GPS

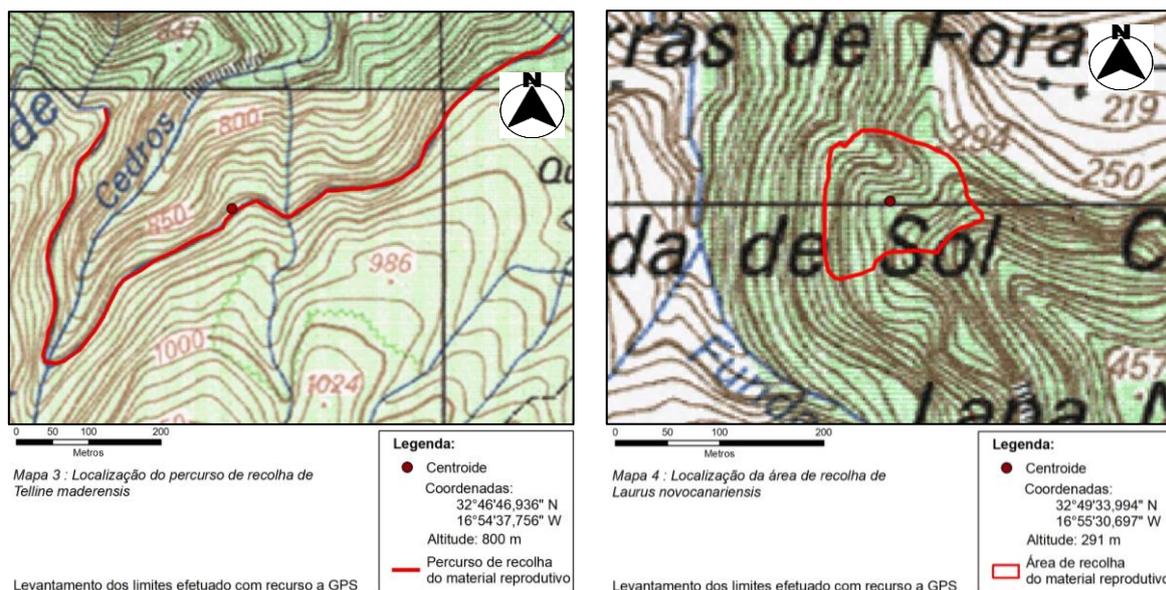
**Legenda:**  
 ● Centroide  
 Coordenadas:  
 32°48'53,317" N  
 16°53'26,22" W  
 Altitude: 205 m  
 □ Área de recolha do material reprodutivo



Mapa 2 : Localização da área de recolha de *Vaccinium padifolium*

Levantamento dos limites efetuado com recurso a GPS

**Legenda:**  
 ● Centroide  
 Coordenadas:  
 32°48'33,456" N  
 17°11'14,065" W  
 Altitude: 1.088 m  
 □ Área de recolha do material reprodutivo



**Figura 11:** Identificação e enquadramento cartográfico dos locais de colheita dos frutos das 4 espécies (Mapas 1 a 4).

### 6.1. Processamento e conservação das sementes

Após a colheita, os frutos das espécies *Myr*, *Vap* e *Lrn* foram imersos em água para modificar e remover o pericarpo, com recurso a maceração manual. As sementes de *Tem* foram retiradas da vagem e lavadas com água corrente. Após a remoção da totalidade das impurezas, as sementes foram colocadas em água para proceder à triagem entre as sementes sãs (afundam) e as inviáveis (flutuam) [11, 14].

Dos lotes da *Vap* foram retiradas amostras de frutos antes do processamento e conservados numa câmara a 5 °C ( $\pm 2$ ), de forma a evitar a sua deterioração. As sementes apenas são separadas da polpa e lavadas antes dos testes de germinação realizados em câmaras fitoclimáticas [67].

Após a secagem ao ar livre, as sementes da *Myr*, *Tem* e *Vap* foram etiquetadas e conservadas na coleção ativa do Banco de Sementes do Jardim Botânico da Madeira, numa câmara Aralab Fitoterm 1400 (precisão  $\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\pm 1\%$  Hr) a 15% de humidade e 15°C de temperatura, sendo retiradas gradualmente apenas as consideradas indispensáveis aos ensaios de germinação. As sementes de *Lrn* são recalcitrantes [28], e foram conservadas em sacos de papel, à temperatura e humidade ambiente. Um lote de sementes foi colocado, na câmara Aralab Fitoterm 1400 para testar a sua tolerância à dessecação.

## **6.2. Caracterização dos lotes**

### **6.2.1. Número de sementes por kg e peso de 1000 sementes**

O número de sementes por quilograma foi determinado, procedendo-se à contagem direta do número existente por subamostra dos lotes de cada espécie. Para o efeito, 10 subamostras de cada lote em estudo foram pesadas numa balança de precisão Kern MRS 120-3 (0,001g) e determinou-se o número médio de sementes. Para os replicandos de *Vap* pesou-se 1 g de sementes, para a *Tem* 2,5 g, *Myr* 50 g e *Lrn* 100 g. A contagem foi efetuada com contador de sementes Pfeuffer. O peso dos lotes foi utilizado para extrapolar o número de sementes por quilograma [11].

O peso de 1000 sementes foi adaptado de Ribeiro et al [11], selecionando-se 10 subamostras de 100 sementes de cada lote, que foram pesados na balança de precisão Kern MRS 120-3 (0,001g), determinando-se posteriormente o peso total de 1000 sementes por espécie. Os resultados foram expressos em gramas.

### **6.2.2. Morfologia das sementes**

Os parâmetros morfométricos das sementes foram determinados numa amostra de 100 sementes por espécie, medindo-se o comprimento, largura e espessura com recurso a um paquímetro digital Mitutoyo Absolute Digimatic Caliper ( $\pm 0,02$  mm). Nas sementes de *Vap*, devido às suas reduzidas dimensões, mediu-se apenas a largura e o comprimento. O comprimento foi medido nas extremidades e a largura e espessura na parte mediana de cada semente.

### **6.2.3. Embebição das sementes**

Para avaliar a embebição das sementes em função do tempo, aplicou-se a metodologia usada no Banco de Germoplasma do ISOPlexis. Cada lote para germinação foi colocado em atmosfera saturada, sendo efetuadas 3 pesagens, durante o processo de embebição. Três replicandos, com 25 sementes para a *Myr* e *Lrn*, 30 sementes de *Tem* e 100 sementes de *Vap* foram utilizados. As sementes colocadas em caixas de Petri foram acondicionadas em caixas herméticas, com uma atmosfera saturada de água, à temperatura ambiente, permanecendo fechadas, durante o período de embebição. O incremento do peso das sementes foi efetuado às 0h, 24h, 48h e 72h, com o auxílio da balança de precisão Kern MRS 120-3 (0,001g).

A percentagem de água absorvida pelas sementes em cada período foi calculada em relação ao peso inicial, através da fórmula:

$$\text{teor de água (\%)} = \frac{(\text{Pf}-\text{Pi})}{\text{Pi}} \times 100,$$

onde: Pf corresponde ao peso final das sementes; Pi ao peso inicial das sementes.

### 6.3. Germinação das sementes

A quantidade de sementes usada por espécie, nos testes foi ajustada ao número disponível de sementes. Após a desinfecção das sementes, estas foram submetidas aos pré-tratamentos germinativos, de acordo com o pré-definido para cada espécie. Na *Vap* foram selecionadas as sementes com maiores dimensões ( $\geq 1$  mm) para os testes, de forma a evitar a utilização de embriões rudimentares ou material com pouco vigor germinativo e quantidades reduzidas de substâncias de reserva [67]. O mesmo procedimento foi adotado para as sementes de *Tem* ( $\geq 2$  mm). Cada ensaio de germinação utilizou três repetições por lote. A quantidade de sementes usada para a *Myr* e *Lrn* utilizou-se 50 sementes por repetição, totalizando 1800 sementes por espécie. Nos ensaios da *Tem* colocou-se a germinar 100 sementes por repetição, perfazendo um total de 3600 sementes. Uma vez que as sementes de *Vap* apresentam as dimensões extremamente reduzidas, nos ensaios foram postas a germinar 1 g de sementes por repetição. O peso indicado na espécie não apresenta o mesmo número de sementes por amostra, pelo que cada repetição, em média, contém 1365 sementes (média das 36 repetições utilizadas), totalizando 49131 sementes. A contagem das sementes de menores dimensões (*Tem* e *Vap*) foi realizada com auxílio de um contador Pfeuffer. No total de sementes por cada espécie referida, inclui a contabilização das três repetições, o local estudado (campo/estufa), os lotes e cada substrato testado.

#### 6.3.1. Desinfecção do material vegetal

As sementes foram submetidas a desinfecção, que variou de acordo com a espécie e dos pré-tratamentos efetuados. A esterilização das sementes de *Vap* foi adaptada de Pereira [67], incluindo a imersão em água contendo 1% de fungicida (Benlate®) durante 30 minutos, seguido de lavagens sucessivas, e imersão em lixívia comercial (NaClO) a 10%, contendo uma gota de detergente para atuar como surfatante, durante 10 minutos, lavando-se posteriormente com água destilada autoclavada. Na literatura não foi possível identificar qual a desinfecção mais apropriada para o *Lrn*, pelo que adotamos o método adaptado, proposto por Pereira [67].

As sementes de *Tem* foram submetidas a uma escarificação com água quente e lavadas posteriormente com água ultrapura autoclavada. As sementes sujeitas à digestão com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foram submersas previamente em etanol a 70%, durante 30 minutos,

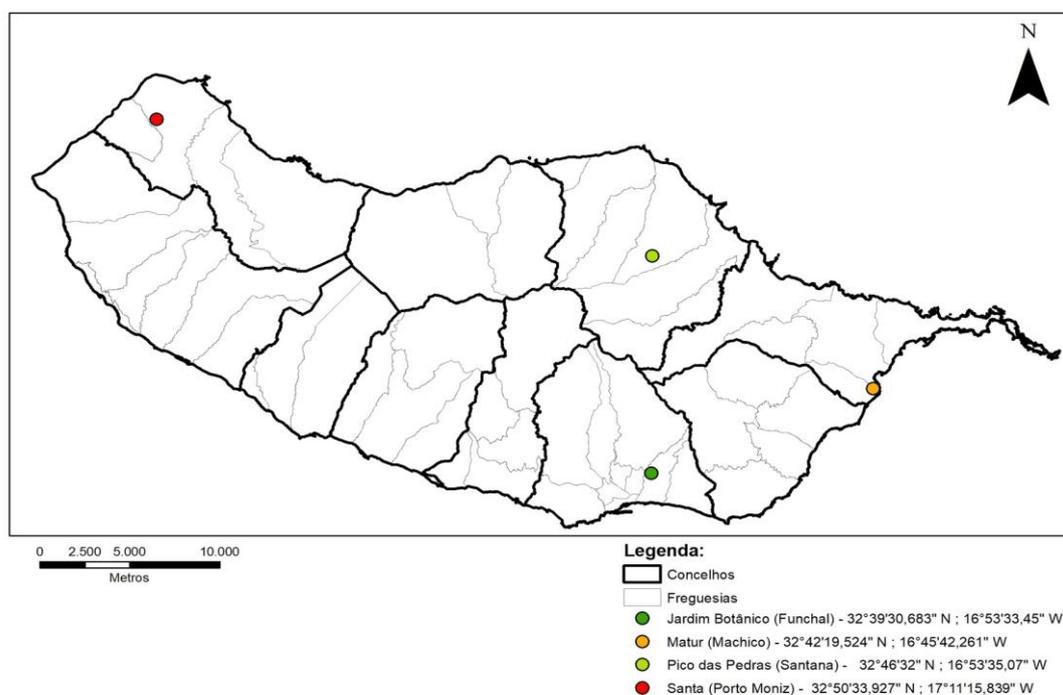
posteriormente transferidas para uma solução de NaClO a 2%, durante 15 minutos e lavadas, com água ultrapura autoclavada para remover na totalidade o ácido ou outras impurezas [23].

A desinfecção das sementes de *Myr* foi adaptada de Huguet et al. [68], foram submetidas a uma estratificação a frio, foram imersas em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, durante 30 minutos, lavadas com água corrente e posteriormente em água ultrapura autoclavada. As sementes foram esterilizadas, durante 15 minutos, em 30% (v/v) de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), com sucessivas lavagens em água ultrapura autoclavada. Nos restantes pré-tratamentos, procedeu-se do mesmo modo, com exceção da imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 6.3.2. Testes de germinação em campo/estufa

Na primeira parte do estudo efetuou-se dois tipos de testes de germinação (em campo e em estufa), com 3 substratos distintos. Os testes em campo decorreram em três locais distintos que apresentam condições climáticas diferenciadas: Santa (Porto Moniz), Pico das Pedras (Santana) e Matur (Machico). Os ensaios em estufa foram realizados no Jardim Botânico da Madeira - Eng.º Rui Vieira. Os locais onde foram efetuados os testes de germinação estão identificados na Figura 12.

Os ensaios foram concluídos, quando deixou de se registar qualquer germinação, por um período de três semanas, sendo a contagem das sementes germinadas realizada quando as plântulas atingiram o estado de duas folhas primárias.



**Figura 12:** Localização dos 4 locais onde decorreram os ensaios germinativos.

### 6.3.2.1. Substratos testados

Em campo foram testados os substratos naturais provenientes das áreas onde os frutos foram recolhidos, ou seja, os solos do local (SL) das quatro espécies estudadas. Em estufa foram experimentados três substratos distintos por espécie: mistura de solo agrícola e adubo orgânico proveniente de cavaliças nas proporções 50:50 (SAT); mistura composta por 2/3 de turfa e 1/3 de perlite (STP), e solos de local (SL). Na *Vap* o substrato SAT foi substituído por materiais recolhidos no interior de um povoamento de *Cryptomeria japonica* (SCrj), dado que a espécie necessita de solos ácidos, bem drenados e ricos em matéria orgânica [19].

Todos os substratos foram submetidos a uma desinfecção térmica colocados a uma temperatura de 65°C, durante 10 minutos, numa estufa Memmert [11].

### 6.3.2.2. Colheita dos substratos

Os solos utilizados nos testes de germinação foram recolhidos, segundo as normas estabelecidas no Laboratório de Qualidade Agrícola da Divisão de Análises de Solos e Plantas (LQA-DASP). Nos locais de recolha foram delineadas várias parcelas e efetuada uma limpeza superficial das mesmas, sendo aleatoriamente colhidas subamostras idênticas, a uma profundidade até 20 cm. Posteriormente as amostras foram misturadas e retiradas as partículas de maiores dimensões, obtendo-se deste modo uma amostra representativa dos solos dos locais selecionados.

Na recolha da matéria orgânica do interior do povoamento de *C. japonica* foi efetuada previamente uma raspagem do material superficial, de modo a evitar colher substâncias húmicas fracas [64].

A análise mineral e as propriedades físicas dos substratos foram determinadas no LQA-DASP.

### 6.3.2.3. Condições de germinação

Nas sementeiras em campo e estufa, foi aplicada a metodologia usada nos viveiros florestais do Instituto das Florestas e Conservação da Natureza (IFCN, IP-RAM). As sementes de *Myr* e *Lrn*, de maiores dimensões, foram semeadas individualmente em tabuleiros alveolares de polipropileno com 50 alvéolos (32 x 46 x 20 cm) a uma profundidade de 2 a 4 cm. As sementes de *Vap* e *Tem* foram colocadas na superfície dos substratos em caixas de poliestireno (40 x 60 x 18 cm), sendo posteriormente cobertas com uma pequena fração do substrato utilizado. Nas sementeiras de *Tem* dividiu-se as caixas em duas metades, de modo a realizar duas repetições em simultâneo.

Dado que as sementes de *Vap* apresentam uma dimensão reduzida, nos ensaios em campo e em estufa, foi necessário efetuar uma secagem à temperatura ambiente, durante 24 horas, após a desinfeção, de forma de evitar a aglutinação total das sementes e permitir a sua separação nas sementeiras.

A tabela 3 sintetiza os ensaios realizados em campo e estufa. A fim de testar o comportamento recalcitrante da *Lrn*, realizou-se um ensaio distinto dos anteriores (não identificado na Tabela 3), em estufa. Utilizando a metodologia descrita anteriormente para a espécie, testou-se a germinação de um lote conservado, durante 4 meses, na câmara a 15% de humidade e 15°C de temperatura.

**Tabela 3:** Ensaios de germinação realizados em campo e em estufa, identificando as espécies, os locais de sementeira, os lotes utilizados, quantidade de sementes por repetição e o total por espécie, tipo de substrato e de suporte utilizados.

Locais	Lotes e espécies	Nº sementes p/repetição	Nº total de sementes	Substrato	Tipo de suporte
<b>Santana (Pico das Pedras)</b>	<i>L1Myr</i> e <i>L2Myr</i>	50	300	<i>SLMyr</i> ,	Tabuleiros alveolares
	<i>L1Lrn</i> e <i>L2Lrn</i>	50	300	<i>SLLrn</i> ,	
	<i>L1Tem</i> e <i>L2Tem</i>	100	600	<i>SLTem</i> ,	Caixas poliestireno
	<i>L1Vap</i> e <i>L2Vap</i>	1365	8136	<i>SLVap</i>	
<b>Porto Moniz (Santa)</b>	<i>L1Myr</i> e <i>L2Myr</i>	50	300	<i>SLMyr</i> ,	Tabuleiros alveolares
	<i>L1Lrn</i> e <i>L2Lrn</i>	50	300	<i>SLLrn</i> ,	Caixas poliestireno
	<i>L1Tem</i> e <i>L2Tem</i>	100	600	<i>SLTem</i> ,	
	<i>L1Vap</i> e <i>L2Vap</i>	1365	8172	<i>SLVap</i>	
<b>Machico (Matur)</b>	<i>L1Myr</i> e <i>L2Myr</i>	50	300	<i>SLMyr</i> ,	Tabuleiros alveolares
	<i>L1Lrn</i> e <i>L2Lrn</i>	50	300	<i>SLLrn</i> ,	Caixas poliestireno
	<i>L1Tem</i> e <i>L2Tem</i>	100	600	<i>SLTem</i> ,	
	<i>L1Vap</i> e <i>L2Vap</i>	1366	8182	<i>SLVap</i>	
<b>Estufa</b>	<i>L1Myr</i> e <i>L2Myr</i>	50	300	<i>SLMyr</i> ,	Tabuleiros alveolares
	<i>L1Lrn</i> e <i>L2Lrn</i>	50	300	<i>SLLrn</i> ,	
	<i>L1Tem</i> e <i>L2Tem</i>	100	600	<i>SLTem</i> ,	Caixas poliestireno
	<i>L1Vap</i> e <i>L2Vap</i>	1365	8220	<i>SLVap</i>	
	<i>L1Myr</i> e <i>L2Myr</i>	50	300	STP	Tabuleiros alveolares
	<i>L1Lrn</i> e <i>L2Lrn</i>	50	300		
	<i>L1Teme</i> <i>L2Tem</i>	100	600	Caixas poliestireno	
	<i>L1Vap</i> e <i>L2Vap</i>	1365	8210		
	<i>L1Myr</i> e <i>L2Myr</i>	50	300	SAT	Tabuleiros alveolares
	<i>L1Lrn</i> e <i>L2Lrn</i>	50	300		
	<i>L1Tem</i> e <i>L2Tem</i>	100	600	Caixas poliestireno	
	<i>L1Vap</i> e <i>L2Vap</i>	1365	8211		<i>SCRj</i>

*SLMyr*, *SLLrn*, *SLTem* e *SLVap* correspondem aos solos do local (recolhidos *in situ* dos locais das 4 espécies estudadas).

Na totalidade dos ensaios foram utilizados 72 tabuleiros alveolares e 54 caixas de poliestireno para a implementação das 144 repetições. Destas, 72 foram testadas em campo e

72 em estufa. Em campo, os ensaios foram instalados ao ar livre e em estufa colocados em bancadas de germinação.

#### 6.3.2.4. Recolha de dados climáticos

As leituras das variáveis climáticas foram efetuadas com data logger testo 174H instalados junto aos suportes, onde decorreram os testes de germinação. Os valores obtidos foram transferidos para um PC com a ajuda de um software Testo ComSoft. Os equipamentos foram programados para efetuar leituras de temperatura (°C) e humidade relativa (% Hr) a intervalos de 60 min, e durante todo período dos ensaios ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$  e  $\pm 3\%$  Hr).

O tempo térmico foi calculado, através da fórmula,

$$TT = (((T_{\text{med}} - T_b)/(T_i - T_b)) * ((T_c - T)/(T_c - T_i))) * 24h)_n$$

onde: TT – Tempo térmico;  $T_{\text{med}}$  – Temperatura média;  $T_b$  – Temperatura base da espécie;  $T_i$  – Temperatura ideal de crescimento;  $T_c$  – Temperatura crítica; T – Valor da temperatura registada diariamente (12 horas); n – Número de dias do ensaio.

#### 6.3.3. Testes de germinação em laboratório

No laboratório foram realizados três ensaios por espécie. As sementes foram postas a germinar em câmaras fitoclimáticas, com controlo automático de temperatura e luminosidade. Todo o trabalho desenvolvido e o material manipulado no decurso dos ensaios de germinação foram realizado em condições de assepsia. Após os pré-tratamentos realizados, as sementes foram transferidas para uma câmara de fluxo laminar vertical Steril Guard III Advanced, The Backer Company, onde foram desinfetadas. O material laboratorial foi autoclavado num Uniclave 88 a  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos, exceto as caixas de Petri, as quais foram esterilizadas numa estufa Memmert BE500, à temperatura  $160^\circ\text{C}$ , durante 4 horas, de forma a evitar danificar os discos de papel de filtro Whatman nº1 ( $11\ \mu\text{m}$ ). As placas em poliestireno usadas nos ensaios da *Myr* foram desinfetadas, com etanol a 96%.

##### 6.3.3.1. Pré-tratamentos

Os pré-tratamentos das sementes de *Lrn* foram adaptados de Hartmann et al [69], e incluíram a escarificação mecânica com recurso a um bisturi; escarificação mecânica, seguida de estratificação a frio numa câmara refrigerada, durante 4 semanas, à temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Assim, foram realizados três ensaios de germinação: sementes sem escarificação (controlo); com escarificação; e com escarificação e estratificação (variantes experimentais).

As sementes de *Tem* foram submetidas a dois pré-tratamentos para romper os tegumentos [23]: escaldão em água à temperatura de ebulição, ou seja, mergulhou-se as sementes, durante 60 segundos, a 100°C; no segundo tratamento mergulhou-se as sementes em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (96%), durante 30 minutos. Assim sendo, foram realizados três ensaios de germinação: sementes sem pré-tratamento (controlo); tratamento térmico e tratamento ácido (variantes experimentais).

No pré-tratamento das sementes de *Myr* adotou-se a metodologia de Huguet et al [68]. Num dos ensaios as sementes foram previamente estratificadas, à temperatura de 4°C, durante 4 semanas e, posteriormente, imersas em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, durante 30 minutos, escarificadas manualmente com um bisturi, esterilizadas e finalmente colocadas numa solução, contendo GA<sub>3</sub> a 500 ppm (0,05%), durante 24 horas. No segundo pré-tratamento as sementes foram unicamente colocadas numa solução, contendo GA<sub>3</sub> a 500 ppm, durante 24 horas. Foram realizados três ensaios germinativos: sementes sem pré-tratamento (controlo); imersão numa solução com GA<sub>3</sub>; imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, escarificação e solução com GA<sub>3</sub> (variantes experimentais).

Os ensaios realizados com a espécie *Vap* foram adaptados de Pereira [67]. As sementes que se encontravam conservadas foram retiradas e colocadas previamente em água destilada, durante 24 horas, à temperatura ambiente, posteriormente desinfetadas e colocadas em germinação. As sementes que se encontravam nos frutos em refrigeração, após o processamento, foram colocadas a germinar. Assim, foram realizados três ensaios: sementes colhidas e postas a germinar (controlo); sementes conservadas e colocadas em água destilada, e sementes retiradas dos frutos (variantes experimentais).

### 6.3.3.2. Condições dos ensaios germinação

Para a germinação das espécies *Myr*, *Lrn* e *Tem*, os regimes térmicos e fotoperíodo foram adaptados de Piotto e Noi [28] e Huguet et al [68], adotando-se o fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro) e um regime térmico de 22°C/18°C, respetivamente. Nos testes de germinação utilizou-se uma câmara fitoclimática ARALAB D 1200, com controlo automático de temperatura ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) e luminosidade a partir de 3 lâmpadas fluorescentes por prateleira, com intensidade de 11250 Lux.

Para superar a dormência associada às sementes de *Vap*, utilizou-se uma câmara fitoclimática Memmert ICP 600, com a modalidade de temperatura e fotoperíodo alternada: 20°C (8h, luz) e 10°C (16h, escuro) [67]. A câmara apresenta uma precisão de  $\pm 1^\circ\text{C}$  e iluminação com 6 lâmpadas fluorescentes (intensidade luminosa 15000 Lux).

Uma vez que as sementes de *Vap* são inferiores a 2 mm, foram colocadas em placas de Petri transparentes (Ø12 cm) sobre discos de papel de filtro Whatman nº1. As dimensões das sementes de *Tem* permitiram ainda utilizar a metodologia da espécie anterior, mas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro. As sementes da *Myr* apresentam um diâmetro no intervalo compreendido entre 2 mm e 1 cm. Os ensaios de germinação foram instalados em placas de poliestireno de 30x17 cm entre camadas de papel. No entanto, dois dos ensaios (sementes em atmosfera saturada e sementes submetidas à estratificação) foram colocados em placas de Petri de Ø12 cm, sobre discos de papel de filtro Whatman nº1, de acordo com a metodologia usada por Huguete et al [68]. As sementes de *Lrn* foram colocadas a germinar em caixas de plástico de 26 x 32 cm, com um substrato composto exclusivamente por areia, método apropriado para sementes de maiores dimensões (diâmetro superior a 1cm).

A quantidade de sementes utilizada nos ensaios foi ajustada à dimensão das mesmas. Deste modo, para a *Myr* e *Lrn* foram colocadas a germinar 25 sementes, 30 sementes para a *Tem* e 100 sementes de *Vap* por repetição. Os substratos foram mantidos humedecidos, com água ultrapura autoclavada, durante todo o ensaio. A Tabela 4 sintetiza os pré-tratamentos de todos os ensaios realizados em condições laboratoriais.

**Tabela 4:** Ensaios de germinação realizados em laboratório, identificando para cada espécie os pré-tratamentos usados e respetiva duração, a temperatura de germinação e fotoperíodo, os lotes utilizados, número de sementes total e por repetição, e tipo de substrato.

Lote / Espécie	Nº sementes p/repetição	Nº total de sementes	Tipo de pré-tratamento	Duração	Temperatura de germinação	Fotoperíodo	Substrato
L1Myr L2Myr	25	150	GA <sub>3</sub>	24 horas	22°C/18°C	16h/8h (luz/escuro)	BP
	25	150	Estratificação (4°C) / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / GA <sub>3</sub>	4 semanas / 30 minutos / 24 horas			TP
	25	150	Atmosfera saturada	72 horas			TP
L1Lrn L2Lrn	25	150	Escarificação	—	22°C/18°C	16h/8h (luz/escuro)	S
	25	150	Escarificação / Estratificação a frio	— / 4 semanas			
	25	150	Atmosfera saturada	72 horas			
L1Tem L2Tem	30	180	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 minutos	22°C/18°C	16h/8h (luz/escuro)	TP
	30	180	H <sub>2</sub> O (100°C)	60 segundos			
	30	180	Atmosfera saturada	72 horas			
L1Vap L2Vap	100	600	Sementeira normal	—	20°C/10°C	8h/16h (luz/escuro)	TP
	100	600	Frutos em refrigeração	8 semanas (lote 1) / 5 semanas (lote 2)			
	100	600	Atmosfera saturada	72 horas			

BP – *Between-paper*, TP – *Top-of-paper*, S – *Sand*

## 6.4. Composição bioquímica das sementes

A composição bioquímica das sementes foi analisada com a determinação da matéria orgânica, cinzas (minerais totais), proteína total, hidratos de carbono (amido e açúcares) e lípidos. Para avaliar o estado metabólico das sementes, determinou-se o pH e a acidez titulável. Os parâmetros referidos foram determinados para as sementes das 4 espécies lenhosas em estudo, em diferentes estados de maturação, antes e durante a germinação.

Após análise dos pré-tratamentos (obtidos nos primeiros ensaios), foram novamente colocadas a germinar sementes para determinar a variação dos parâmetros bioquímicos, durante a germinação. Os ensaios com pré-tratamento, GA<sub>3</sub> a 500 ppm (duração de 13 semanas) para a *Myr*, a sementeira normal para a *Vap* (12 semanas), o ensaio com pré-tratamento ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para a *Tem* (21 dias) e escarificação para a *Lrn* (10 semanas) foram utilizados para esse efeito.

A análise da composição da semente, em relação aos parâmetros amido, açúcares, lípidos, pH e acidez foi realizada em triplicado. Os parâmetros cinzas e proteínas foram determinados em duplicado.

### 6.4.1. Preparação das farinhas

As sementes das amostras (tempo zero e meio tempo de germinação) foram trituradas, com auxílio de um moinho para obter farinha de granulação fina, isenta de qualquer tipo de grânulos para análise bioquímica. Posteriormente a farinha foi acondicionada em tubos de córex fechados e mantidos no escuro, à temperatura ambiente. As amostras, submetidas a germinação, foram previamente colocadas numa câmara, com 15% de humidade, durante 48 horas. Nas amostras que apresentavam menor disponibilidade de sementes, foram preparadas 15 g de farinha, quantidade considerada suficiente para determinar os parâmetros bioquímicos.

### 6.4.2. Matéria seca

A matéria seca (MS) foi determinada, utilizando uma balança analítica Kern (MRS 120-3), através de desidratação de 0,100 g de peso fresco de cada amostra a uma temperatura entre 100 e 105°C, até obter o peso constante do resíduo seco (peso da farinha nas amostras desidratadas) [70].

### 6.4.3. Cinzas

As cinzas foram determinadas por incineração de 1 g de amostra em cadinhos de porcelana de 30mL, previamente calcinados a 550°C. Os cadinhos com as amostras foram colocados num forno Mufla Vulcan (3-550), à temperatura de  $550 \pm 10^\circ\text{C}$ , durante 5 horas para incineração total da amostra. Os cadinhos após a incineração foram colocados num exsiccador, até atingirem a temperatura ambiente. Posteriormente quantificou-se gravimetricamente o teor das cinzas, numa balança analítica, Precisa XR 205SM-DR. Os resultados foram expressos em g/100 g MS [71].

### 6.4.4. Teor de açúcares solúveis

O teor de açúcar determinou-se, de acordo com McCready et al [72], com as adaptações propostas por Bailey [73]. A extração dos açúcares solúveis foi realizada, a partir de 100 mg de farinha, com etanol a 80%. A quantificação dos açúcares realizou-se pela reação dos extratos, com uma solução de antrona a 0,02%, em 70% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . As amostras obtidas foram colocadas, em banho-maria a 100°C, durante 7 minutos, de forma a provocar a quebra das ligações glicosídicas e a desidratação dos monómeros obtidos. A antrona reage com os múltiplos compostos orgânicos produzidos (derivados furfurais), desenvolvendo uma coloração azul-esverdeada. Após o arrefecimento da mistura à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura das amostras nos 620 nm, espectrofotómetro UV/Vis (2401 PC, Shimadzu), (software UVProbe 2.0). A quantificação dos açúcares solúveis foi calculada, com auxílio de uma reta de calibração de glicose, sendo estes expressos em g/100g MS do lote.

### 6.4.5. Amido

O teor de amido foi quantificado pelo método de Hodge e Hofreiter [74], extraindo primeiramente os açúcares solúveis, a partir de 15 mg de amostra em etanol a 80%. Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao resíduo 5 ml de HCl a 1,1%, tendo este sido aquecido, em banho-maria a 100°C, durante 30 minutos. Na presença do ácido e do calor, o amido é hidrolisado em açúcares mais simples (monossacarídeos de glucose), e estes, por sua vez, são desidratados, originando tal como os açúcares solúveis, compostos orgânicos (hidroximetilfurfural). A 1 mL de cada solução de extração adicionou-se 5 mL de antrona previamente preparada, em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 72%, na proporção de 1:5. A mistura reacional foi colocada novamente em banho-maria, durante 11 min, à temperatura de 100°C. A solução adquire uma coloração esverdeada por reação da antrona, com os derivados dos furfurais. Após o arrefecimento rápido em gelo, as amostras foram lidas nos 630 nm, no espectrofotómetro

UV/Vis (2401 PC, Shimadzu, software UVProbe). O amido foi quantificado, com auxílio de uma reta de calibração, e expresso em g/100, g MS do lote.

Nas amostras de *Vap* houve necessidade de efetuar duas centrifugações (6.000 rpm/10 minutos cada) antes de descartar os açúcares solúveis, uma vez que permaneciam nos sobrenadantes depósitos de farinha, após a primeira centrifugação.

#### **6.4.6. Proteína total**

O teor proteico foi determinado pelo método Kjeldahl AOAC 945.18-B [75], através da digestão de 1 g de amostra a 420°C num digestor Velp Scientifica DK 8S Heating Digester, durante 60 minutos. Na mistura reacional utilizou-se sulfato de potássio anidro ( $K_2SO_4$ ) como regulador de ebulição, o selénio como catalisador (Se) e  $H_2SO_4$  concentrado (96%) como responsável pela digestão.

A destilação e titulação foram realizadas, com auxílio do equipamento Velp Scientifica UDK 152. Na fase de destilação à mistura resultante da digestão ácida foi adicionado NaOH em excesso, convertendo o  $NH_4^+$  em  $NH_3$ , seguido pela ebulição do gás e condensação deste numa solução recetora contendo ácido bórico e os indicadores verde de bromocresol e vermelho de metilo. No processo de titulação foi utilizada uma solução de HCl a 0,2 N para quantificar o amoníaco existente na solução recetora [76]. A proteína presente nas soluções foi quantificada em g/100g MS.

#### **6.4.7. Lípidos**

Os lípidos totais foram determinados pelo método gravimétrico adaptado de Bligh e Dyer [56], através da formação de um sistema bifásico resultante da adição dos solventes metano/clorofórmio/água, nas proporções 2:1:1. A extração dos lípidos foi obtida a partir de 200 mg de amostra. A fase lipídica (clorofórmio+lípidos) foi separada da restante solução e colocada em tubos de ensaio, à temperatura de 35°C, durante 48 horas para evaporação total do clorofórmio. Os lípidos totais presentes nas amostras foram expressos em g/100g MS.

#### **6.4.8. Minerais**

O teor de minerais das sementes foi determinado pelo laboratório de Qualidade Agrícola, Divisão de Análises de Solos e Plantas.

#### **6.4.9. pH**

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, norma AOAC 943.02 [77], a partir de 0,5 g de farinha. Após dissolver a amostra em H<sub>2</sub>O e estabelecer o equilíbrio entre a fase aquosa e sólida da mistura, determinou-se o pH, usando um equipamento pH 320 WTW 82362 Weilheim, previamente calibrado com as soluções 4,00 e 7,02.

#### **6.4.10. Acidez**

A acidez titulável foi determinada pelo método AACC 02-31.01 [78], a partir de 1 g de farinha. Após diluição das amostras em 10 mL de H<sub>2</sub>O, a suspensão foi deixada a repousar, durante 1 hora. A 8,8 mL de alíquota da suspensão adicionou-se H<sub>2</sub>O na proporção 1:1 e 1 gota do indicador de fenolftaleína a 1%. Posteriormente as amostras foram tituladas até determinar o ponto de neutralização, utilizando NaOH a 0,1N. A acidez titulável foi expressa em % (v/p) de ácido láctico presente nas amostras.

### **6.5. Metabolismo das sementes**

A função metabólica nas fases iniciais de germinação foi analisada através da quantificação da atividade catalítica e espectro enzimático de MDH (EC 1.1.1.37) e peroxidase (EC 1.11.1.7) nas sementes. Para determinar a atividade catalítica e a concentração proteica a meio da germinação, foram novamente postas a germinar sementes, cujos tempos germinativos e pré-tratamentos realizados são idênticos aos descritos no capítulo 6.4 “Composição bioquímica das sementes”. A atividade catalítica e a concentração proteica foram efetuadas em triplicado para ambas as enzimas analisadas.

#### **6.5.1. Atividade catalítica**

##### **6.5.1.1. Malato desidrogenase**

Na determinação da atividade catalítica da MDH adotou-se o protocolo utilizado por Pinheiro de Carvalho et al [79]. Uma grama de semente foi macerada numa solução com 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,05% triton X-100, na proporção 1:4 (p/v), respetivamente. O extrato obtido foi centrifugado a 6.000 rpm, durante 10 minutos à temperatura de 4°C para obter o sobrenadante. Na determinação da atividade catalítica preparou-se previamente uma mistura reagente, com: 2,4 mL de uma solução contendo 0,1 M de Tris-HCl, pH 7,5; 300 µL de 1,5 mM de NADH em 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 300 µL de 20 mM de oxaloacetato em 0,1 M de Tris-HCl, pH 7,5.

A atividade foi medida, nos 340 nm, no espectrofotômetro UV/Vis (2401 PC, Shimadzu, software UVProbe 2.0), com a adição de 10 µL do sobrenadante à mistura reagente, incluindo o branco (preparado previamente, com 2,7 mL da solução com 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 em 300 µL da solução com 1,5 mM de NADH em 0,1M de Tris-HCl, pH 7,5). A atividade da enzima foi quantificada em UC/g peso fresco.

A atividade catalítica da MDH nas amostras foi calculada, através da fórmula,

$$UC_{mdh} = ((K \times DO_{340}) / (V_{ext} \times T)) \times V_{total}$$

onde:  $UC_{mdh}$  - Unidades catalíticas; K (0,482) - Coeficiente de extinção molar de NADH;  $DO_{340}$  corresponde à variação média da densidade ótica das amostras nos 340nm (0 - 3 minutos);  $V_{ext}$  - Volume do extrato introduzido na cuvete; T - Tempo de determinação da atividade em minutos;  $V_{total}$  - Volume total da amostra (sobrenadante).

### 6.5.1.2. Peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada pelo método adaptado de Wharton [80] e Zemlyanukhin [81], a partir de 100 mg de sementes. A enzima foi extraída macerando 100 mg de semente, com a adição de solução tampão acetato (0,2 M de acetato a pH 5,4) na proporção de 1:8 (p/v), perfazendo o volume final do extrato até 2,5 mL por cada 100 mg de amostra com solução tampão. Após centrifugação (3.000 rpm, durante 10 minutos) o sobrenadante foi utilizado na preparação da mistura reagente em partes iguais (0,75 ml) de tampão acetato, solução de benzidina (60 ml de solução constituída por 10,08 mL de ácido acético glacial, 44,16 mg de benzidina e 1,308 g de acetato de sódio) e extrato vegetal. Colocou-se as cuvetes no espectrofotômetro UV/Vis (2401 PC, Shimadzu - software UVProbe 2.0), adicionou-se  $H_2O_2$  e procedeu-se de imediato à leitura da atividade, nos 460 nm. A atividade da enzima foi quantificada em UC/g peso fresco e calculada através da fórmula,

$$UC = ((V_{Abs} \times K) / (V_{ext} \times T)) \times V_t$$

onde: UC - Unidades catalíticas;  $V_{Abs}$  - Variação da absorvância aos 640 nm (0 a 2 ou 3 minutos); K (0,136) - Coeficiente de extinção molar da peroxidase;  $V_{ext}$  - Volume do extrato introduzido na cuvete; T - Tempo em minutos em que foi determinada a variação da absorvância;  $V_t$  - Volume total final do extrato.

### 6.5.2. Concentração proteica

Após a determinação da atividade catalítica das enzimas em estudo, os extratos foram armazenados, a  $-20^\circ C$ , para posterior doseamento da proteína e análise eletroforética.

Na quantificação da proteína adotou-se o método de Bradford [82]. Preparou-se para o efeito o reagente de Bradford através da adição do corante concentrado em H<sub>2</sub>O nas proporções de 1:4. Adicionou-se a 100 µL de amostra 5 mL do corante e deixou-se repousar durante alguns minutos. Posteriormente as amostras lidas nos 595 nm, no espectrofotómetro UV/Vis (2401 PC, Shimadzu, software UVProbe 2.0). A quantificação da proteína, foi realizada utilizando uma reta de calibração de albumina de soro bovino (BSA).

### **6.5.3. Separação eletroforética**

A separação eletroforética das isoenzimas da MDH e peroxidase foi realizada em gel de poliacríamida (NATIVE-PAGE), a 6.5%, de acordo com Hames [83], utilizando o sistema de eletroforese vertical Mini-Protean Tetra Cell (BioRad, USA). A separação eletroforética foi realizada na presença de um tampão constituído por 0.05 M Tris e 0.38 M glicina, pH 8.3, a 30 mA, 120 V, durante 1 hora e 45 minutos.

### **6.5.4. Revelação**

A revelação específica da MDH nas amostras foi adaptada de Manchenko [84] e Wendel [85], na presença de uma solução de revelação, constituída por 200 mL de tampão 50 mM tris a pH 8,5, 200 mg de ácido málico (malato), 10 mg de NAD<sup>+</sup>, 5 mg de metossulfato de fenazina (PMS) e 10 mg de tetrazólio nitro-azul (NBT) dissolvido em 2 ml de etilenoglicol. Metossulfato de fenazina (PMS) e tetrazólio nitro-azul (NBT) foram mantidos no escuro e misturados, com a solução de revelação, antes da incubação dos géis, no escuro, a 37°C até obter bandas visíveis, com o cuidado de evitar a revelação não específica. Após a revelação, fixaram-se os géis em ácido acético a 10%.

Na revelação da peroxidase, adaptou-se o procedimento de Wendel [85]. A solução de revelação incluía em 200 mL de tampão de acetato sódio, pH 5,0, 200 mg de CaCl<sub>2</sub>, a qual se adicionou 100 mg de 3-amino-9-etil-carbazole dissolvido em 8 mL de N, N-dimetilformamida. A solução de revelação foi mantida no escuro. Após a mistura adicionou-se 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% e os géis de eletroforese foram colocados em incubação, à temperatura ambiente e no escuro, durante aproximadamente 60 minutos, evitando a revelação não específica. Os géis foram posteriormente lavados e colocados em glicerol (50%).

## **6.6. Análise de dados e tratamento estatístico**

Todos os ensaios de germinação foram monitorizados semanalmente, realizando-se a sua contagem final, após o aparecimento das duas folhas primárias nas plântulas. Dos testes

de germinação, foram removidas as plântulas com desenvolvimento anormal, sementes infetadas por fungos e eliminados focos de infecção, de forma a evitar a propagação das contaminações. Para efeito estatístico, foram contabilizadas as plântulas normais (apenas as que demonstraram uma capacidade de desenvolvimento sustentado em condições adequadas).[22].

A evolução das percentagens médias de germinação acumuladas em função do tempo é apresentada neste trabalho sob a forma de gráficos ou curvas de germinação. Esta representação permite avaliar a capacidade germinativa das espécies em estudo.

A análise estatística dos resultados foi efetuada usando o programa IBM SPSS Statistics (Statistical Package for the Social Science), versão 23 para Windows, O teste *Oneway* Anova e Tukey HSD foi utilizado na análise de variância das médias ( $p \leq 0,05$ ). A existência de correlações significativas entre os parâmetros foi testada utilizando o coeficiente de Pearson ( $p \leq 0,05$ ).

## 7. Resultados e Discussão

Este estudo é, de acordo com nossos melhores conhecimentos, o primeiro que aborda a fenologia e bioquímica de germinação das 4 espécies lenhosas, pelo que não estão disponíveis informações bibliográficas que permitam realizar uma comparação dos resultados obtidos nos diversos parâmetros avaliados com outros trabalhos.

Os frutos com as sementes utilizadas nos distintos ensaios apenas foram colhidos em populações *in situ*, em exemplares adultos e antes do início da sua dispersão, evitando sempre os indivíduos isolados, pouco vigorosos, muito novos e que aparentavam possuir características morfológicas de baixa qualidade [11].

Todos os dados gerados no presente trabalho foram analisados, recorrendo a análise estatística, desde a avaliação das condições de germinação, a relação do sucesso germinativo com as condições ambientais e o desenvolvimento da semente, caracterização dos aspetos chave da bioquímica e determinação dos parâmetros da germinação. A análise estatística dos resultados encontra-se caracterizada no capítulo 7.5, espécie por espécie. São apresentados, em síntese, os dados estatísticos que melhor interpretam os resultados obtidos. As tabelas relativas às correlações de Pearson, teste *one-way* ANOVA e teste de Tukey HSD foram disponibilizadas integralmente em anexo.

### 7.1. Caracterização dos lotes

Na determinação do número de sementes por quilograma, verifica-se que a espécie *Myr* é a que apresenta maior variação entre as repetições analisadas, com desvio padrão de 6,88 para o L1 e 8,63 para o L2. Relativamente ao peso de 1.000 sementes, é a *Lrn* que exhibe os valores superiores para ambos os lotes (L1 - 1,13 e L2 - 1,05), embora menos significativos. As sementes de *Vap* destacam-se por serem consideravelmente mais leves do que as restantes espécies, e as de *Lrn* as mais pesadas. Na Tabela 5 são identificados os valores médios do número de sementes por quilograma e o peso de 1.000 sementes para as espécies estudadas e respetivos lotes.

**Tabela 5:** Valores médios do número de sementes/kg e do peso de 1.000 sementes dos diferentes lotes  $\pm$  desvio padrão.

Lote e Espécie	N.º sementes / Kg	Peso 1.000 sementes (gr.)
<b>L1Myr</b>	37.049 $\pm$ 6,88	27,34 $\pm$ 0,18
<b>L2Myr</b>	37.050 $\pm$ 8,63	27,20 $\pm$ 0,05
<b>L1Vap</b>	1.353.588 $\pm$ 5,99	0,73 $\pm$ 0,01
<b>L2Vap</b>	1.350.793 $\pm$ 6,74	0,75 $\pm$ 0,00
<b>L1Tem</b>	110.592 $\pm$ 2,66	9,11 $\pm$ 0,09
<b>L2Tem</b>	111.628 $\pm$ 2,91	9,06 $\pm$ 0,04
<b>L1Lrn</b>	1.236 $\pm$ 2,22	815,96 $\pm$ 1,13
<b>L2Lrn</b>	1.235 $\pm$ 2,92	816,41 $\pm$ 1,05

Relativamente à análise morfométrica (comprimento, largura e espessura) das sementes (Tabela 6), verifica-se que não existem diferenças significativas entre as médias obtidas para os lotes de cada espécie, com exceção da *Lrn*, que apresenta dimensões ligeiramente dissimilantes entre os lotes. À semelhança do que acontece nos parâmetros anteriores, as sementes da *Lrn* apresentam as maiores dimensões e a espécie *Vap* as menores.

**Tabela 6:** Dimensão média das sementes (comprimento, largura e espessura)  $\pm$  desvio padrão, mínimos e máximos dos diferentes lotes das 4 espécies estudadas.

Lote e espécie	Dimensões (mm)	Média	Máximo	Mínimo	Espécie	Dimensões (mm)	Média	Máximo	Mínimo
<b>L1Myr</b>	Comprimento	4,61 $\pm$ 0,77	6,96	3,50	<b>L1Tem</b>	Comprimento	2,97 $\pm$ 0,35	3,60	2,36
	Largura	3,72 $\pm$ 0,40	4,37	2,93		Largura	2,26 $\pm$ 0,38	2,90	1,48
	Espessura	3,36 $\pm$ 0,46	4,10	2,49		Espessura	1,07 $\pm$ 0,12	1,28	0,83
<b>L2Myr</b>	Comprimento	4,60 $\pm$ 0,74	6,94	3,54	<b>L2Tem</b>	Comprimento	2,93 $\pm$ 0,39	3,90	2,19
	Largura	3,71 $\pm$ 0,41	4,50	2,88		Largura	2,18 $\pm$ 0,44	3,30	1,18
	Espessura	3,38 $\pm$ 0,49	4,33	2,54		Espessura	1,05 $\pm$ 0,14	1,32	0,74
<b>L1Vap</b>	Comprimento	1,52 $\pm$ 0,24	1,99	1,12	<b>L1Lrn</b>	Comprimento	13,98 $\pm$ 1,95	16,61	9,10
	Largura	1,06 $\pm$ 0,17	1,63	0,79		Largura	9,71 $\pm$ 1,55	11,38	4,17
	Espessura	-	-	-		Espessura	9,87 $\pm$ 1,53	11,60	4,54
<b>L2Vap</b>	Comprimento	1,54 $\pm$ 0,23	2,02	1,11	<b>L2Lrn</b>	Comprimento	13,99 $\pm$ 1,91	16,72	9,14
	Largura	1,09 $\pm$ 0,18	1,73	0,79		Largura	9,67 $\pm$ 1,52	11,86	4,19
	Espessura	-	-	-		Espessura	9,86 $\pm$ 1,49	11,67	4,82

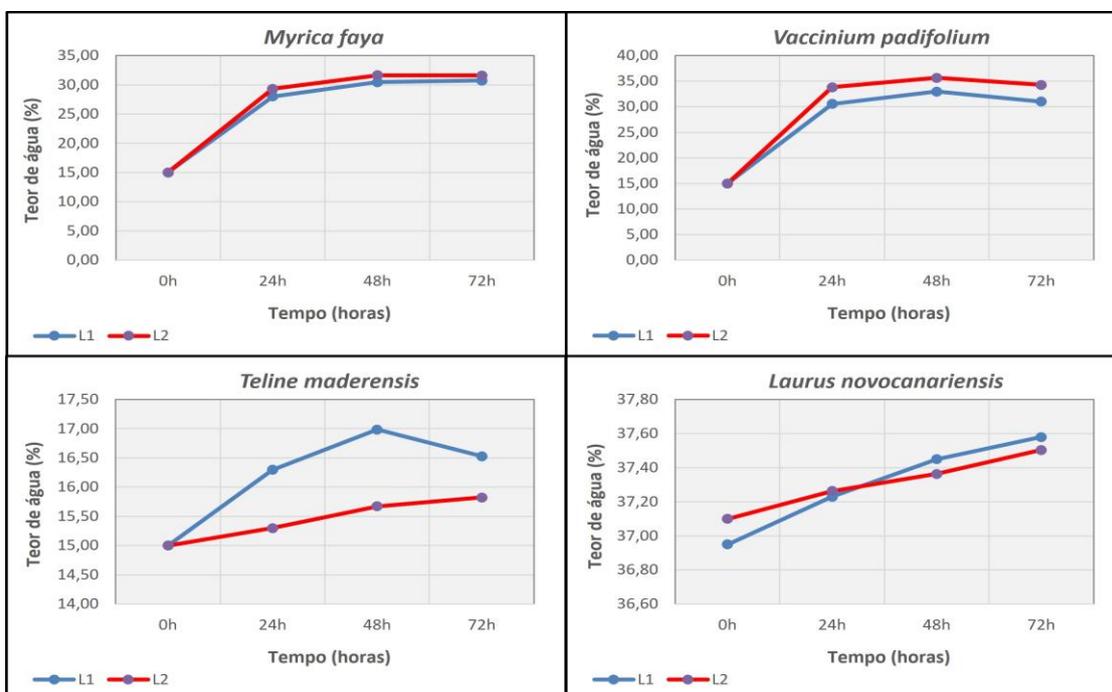
Pretendeu-se com a caracterização dos lotes de sementes, compreender e comparar os diferentes parâmetros estudados, tendo em conta os distintos estados de maturação e o sucesso germinativo correspondente.

## 7.2. Processo de embebição

Nas condições ideais, o padrão típico de embebição das sementes apresenta três fases: uma rápida absorção inicial, um período relativamente curto em que a absorção é extremamente

lenta e, por último, um intervalo de rápida absorção imediatamente antes da iniciação do processo germinativo. A primeira fase ocorre em todas as sementes e é caracterizado por um processo físico de movimento da humidade de um local com alto potencial hídrico para a semente desidratada que apresenta baixo potencial. A segunda fase está relacionada com o grau de dormência das sementes ou germinação retardada. A terceira fase ocorre quando o metabolismo se torna muito ativo, e os tegumentos das sementes se rompem, levando a uma maior absorção de oxigénio [19, 60].

Através das curvas de embebição (Figura 13), verifica-se que as sementes das 4 espécies em estudo apresentam padrões distintos, não acompanhando o modelo típico de embebição. Segundo Bewley e Black [60] a alteração ao modelo trifásico de embebição poderá dever-se a diversos fatores, incluindo a permeabilidade do tegumento, tamanho das sementes, disponibilidade de oxigénio e das condições ambientais durante a hidratação, como a temperatura, teor de humidade ou a composição do substrato. Partes distintas de uma semente poderão também passar pelas fases de embebição a diferentes taxas. Por exemplo, um embrião, localizado perto da superfície de uma semente de maiores dimensões, poderá começar a alongar-se (fase III de embebição) antes do tecido de armazenamento associado ter completado a fase I.



**Figura 13:** Evolução da absorção de água nas sementes dos distintos lotes das 4 espécies ao longo de 72 horas em embebição.

Durante as primeiras horas não se verificou qualquer restrição à absorção de água para as sementes de *Myr* e *Vap* a partir dos 15% de teor inicial. Após as 24 horas, observa-se uma estabilização, verificando-se até uma ligeira perda de humidade das 48 para as 72 horas na espécie *Vap* em ambos os lotes. Para a *Tem*, o período de absorção de água é progressivo, mas lento, observando-se uma pequena diminuição após as 48 horas no L1. Segundo Bewley e Black [60] a perda de humidade nas sementes poderá ser atribuída à influência de substâncias osmoticamente ativas de baixo peso molecular resultantes da hidrólise pós-germinativa das reservas de armazenamento durante o processo de absorção de água. Se os endospermas e cotilédones não se expandirem adequadamente, a fase III de absorção fica comprometida, levando a uma eventual diminuição do conteúdo de água nas sementes.

Na *Lrn* constata-se igualmente uma embebição moderada e crescente a partir dos 36,95% (L1) e 37,10% (L2) de teor inicial. No entanto, as sementes foram conservadas à humidade ambiente, consequência do comportamento recalcitrante da espécie, pelo que não é comparável a fase de absorção de água desta espécie com as restantes.

O processo de embebição nas sementes é crítico para o sucesso da germinação. Se a absorção de água for demasiado lenta, a germinação é reduzida porque as sementes podem deteriorar-se inviabilizando o início do metabolismo. Se, por outro lado, a absorção de água for demasiado rápida, as sementes poderão sofrer danos nos tecidos internos por imbibição excessiva [60].

### **7.3. Ensaio de germinação**

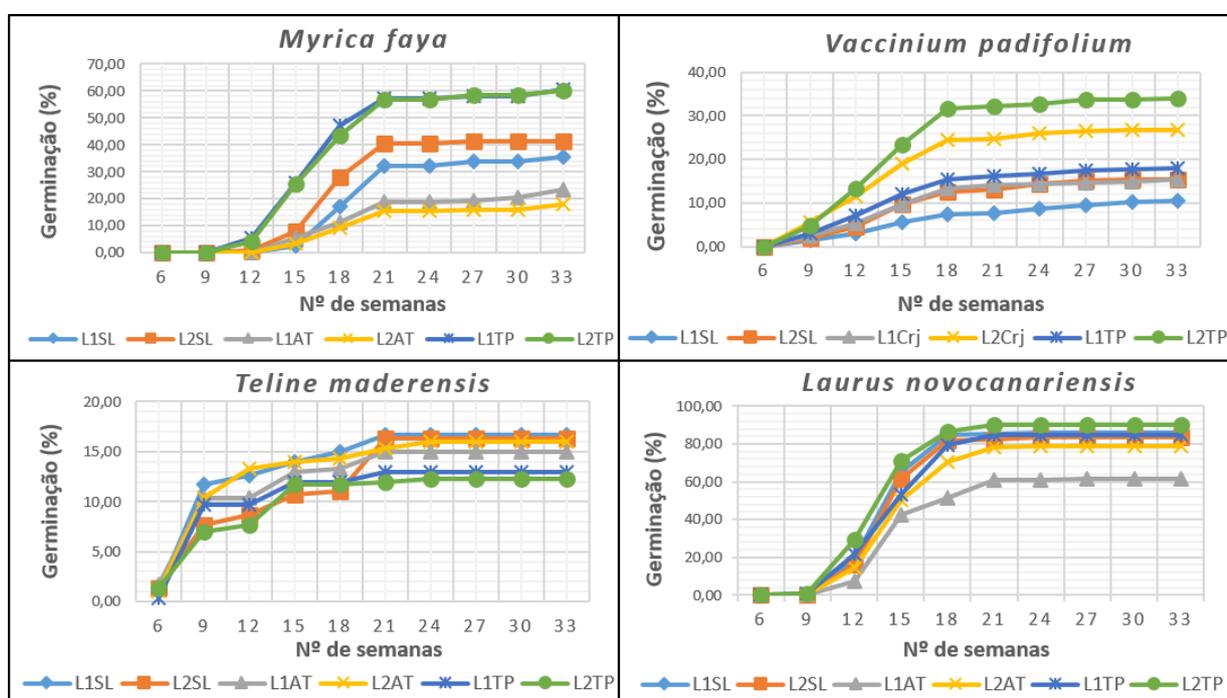
Os ensaios de germinação decorreram em 4 locais com altitudes distintas: Portas da Vila - Santa, Porto Moniz, na vertente norte, a uma cota média de 688 metros de altitude; Pico das Pedras, Santana, a uma altitude superior à anterior (912 metros), igualmente na costa norte da Madeira; Sítio da Queimada de Baixo - Matur, Água de Pena, Machico, na vertente sul e a uma cota baixa (100 metros); Jardim Botânico da Madeira - Eng.º Rui Vieira, Santa Maria Maior, Funchal a uma cota de 295 metros. Neste último local, os ensaios foram realizados em estufa e em diferentes tipos substratos.

A contagem de sementes germinadas e das plântulas recém-formadas após o aparecimento das duas folhas primárias realizou-se semanalmente. Este procedimento permite avaliar o vigor do material de propagação, ou seja, o desenvolvimento integral das sementes, desde a retoma do crescimento do embrião e a emergência da radícula rompendo o tegumento até ao normal crescimento das plântulas [22].

### 7.3.1. Ensaio em estufa

O processo germinativo em estufa foi relativamente lento. Na Figura 14 está representada a evolução da percentagem de germinação obtida em estufa (por espécie, lote e substrato testado). Os estrumes utilizados neste trabalho foram recolhidos em cavalariças e, após o processo de compostagem, entraram na formação do substrato SAT.

A *Tem* foi a espécie que iniciou o processo germinativo mais rapidamente em todos os substratos e a *Myr* a mais lenta. Para a *Vap*, a germinação estendeu-se ao longo de 33 semanas em todos os substratos; a *Myr* terminou a germinação entre 27 semanas (SL) e as 32 semanas (SAT e STP); a *Tem* necessitou de 21 semanas para o SL e 24 no substrato STP; e a *Lrn* concluiu a germinação entre as 23 (L2SL e L2AT) e as 25 semanas (L1AT).



**Figura 14:** Evolução germinativa por espécie em estufa, lote e substrato testado. L1SL e L2SL – Lotes 1 e 2, respetivamente, testados nos substratos recolhidos *in situ* nos locais das 4 espécies em estudo (*Myr*, *Vap*, *Tem* e *Lrn*); L1AT e L2AT – lotes 1 e 2 colocados no substrato SAT; L1TP e L2TP – lotes 1 e 2 testados no substrato STP; L1Crj e L2Crj – lotes 1 e 2 postos a germinar no substrato SCrj.

A *Lrn* foi a espécie que apresentou a melhor percentagem de germinação em todos os substratos (variou entre os 61,33% e os 90%, para L1AT e L2TP, respetivamente). No que respeita aos resultados da germinação por espécie, lote e substratos testados, são perceptíveis as diferenças observadas, quer ao longo do tempo, quer no sucesso alcançado (Figura 14 e Tabela 8). A *Myr* obteve a melhor taxa de germinação no L1TP (60,67%); para a *Vap*, foi o L2TP (33,86%) que alcançou o melhor resultado; na *Tem* foi o L1SL que mais se destacou

(16,67%); e finalmente na *Lrn*, foi o L2TP que obteve a melhor taxa (90%). O L2 da *Vap* apresentou a melhor taxa de germinação em todos os substratos testados, indicando que o estado de maturação influencia o processo germinativo da espécie.

Todos os substratos utilizados foram submetidos a uma desinfecção térmica para destruir a presença de possíveis nemátodos, fungos e larvas de insetos [11]. Na Tabela 7 estão identificadas as características químicas e físicas mais relevantes dos substratos utilizados nos ensaios de germinação.

**Tabela 7:** Síntese das características mais relevantes dos substratos. Os valores não apresentados devem-se a limitações do equipamento de laboratório (valores determinados no Laboratório de Qualidade Agrícola da Camacha - Divisão de Análises de Solos e Plantas).

Ref.	pH (H <sub>2</sub> O)	Assimilável (ppm)		Bases de troca (meq/100g)				CTC (meq/100g)	MO (%)	Micronutrientes (ppm)				Classificação textural
		P	K	Ca	Mg	K	Na			Cu	Zn	Mn	Fe	
<i>SCrj</i>	4,5	119	216	32,9	19,9	0,7	1,5	89,9	*	1	6	36	220	*
SAT	5,9	490	3600	16,4	11,5	12,4	2,3	51,9	12,93	0,6	2	15	55	Franco-Limoso
STP	5,4	783	648	90,1	24,3	3,3	0,7	88,1	*	2,2	7,5	15	290	*
<i>SLMyr</i>	5,6	23	564	17,7	24,3	1,7	1,5	72,4	11,21	4	6,5	195	285	Franco-argilo-limoso
<i>SLVap</i>	4,7	23	288	4,4	3,6	0,7	0,2	56,8	17,24	3,5	4,5	100	260	Franco-argilo-limoso
<i>SLTem</i>	5,2	46	324	7,5	7,1	0,8	0,8	46,8	13,79	2	3	55	340	Franco
<i>SLLrn</i>	5,9	110	432	20,4	16,6	1,2	1,7	56,9	10,34	2,5	4	95	220	Franco-argiloso

P – Fósforo, K – Potássio, N – Azoto, Ca – Cálcio, Mg – Magnésio, Na – Sódio, CTC – Capacidade de Troca Catiônica, Cu – Cobre, Zn – Zinco, Mn – Manganês, Fe – Ferro, MO – Matéria Orgânica, CT – Classificação Textural, ppm – partes por milhão, meq/100g – miliequivalentes por 100 gramas.

Na determinação da textura poderemos concluir que os substratos não são muito diferentes quanto às proporções de areia, limo e argilas. O *SLMyr*, *SLVap* e *SLLrn* apresentam textura fina, *SAT* e *SLTem* uma textura mediana. *SCrj* e *STP* são de difícil classificação, uma vez que representam solos abundantemente orgânicos [62, 64].

Segundo Varennes [62], os solos com textura mediana ou fina (condição de todos os substratos utilizados neste trabalho), apresentam maior CTC que os arenosos. Neste estudo os substratos *SAT*, *SLVap* e *SLTem* exibem os valores mais baixos (51,9; 56,8; e 46,8 meq/100g, respetivamente), ainda assim, um valor de CTC relativamente alto, fator importante na retenção dos nutrientes na matriz do substrato. De acordo com Ribeiro et al [11], os materiais como turfas e resíduos vegetais compostados apresentam valores de CTC elevados, sendo considerados quimicamente ativos, o que corrobora os resultados obtidos nos

substratos *SCrj* e *STP* que apresentam os valores de CTC mais elevados (89,9 meq/100g e 88,1 meq/100g respetivamente).

As bases de troca apresentam valores distintos, demonstrando existir diferenças na capacidade dos substratos em reter os catiões que serão disponibilizados para as plântulas. Comparando as 4 bases, o *STP* revela ser o substrato com maior afinidade de adsorção para o Ca (90,1 meq/100g), *STP* e *SLMyr* para o Mg (24,3 meq/100g), e *SAT* o mais eficaz para o K e Na (12,4 e 2,3 meq/100g respetivamente). O *SLVap* é o substrato que exibe menor potencialidade em atrair a globalidade dos catiões de troca.

Quanto à reação do solo, todos os substratos exibem um condição ácida, uma vez que os valores de pH são inferiores a 7, embora o *SAT*, *STP*, *SLMyr*, *SLTem* e *SLLrn* sejam ligeiramente ácidos (pH entre 5 e 6) [62]. Os substratos *SCrj* e *SLVap* são os mais ácidos (4,5 e 4,7 respetivamente), o que é relevante para a germinação das sementes de *Vap*, uma vez que, segundo Baskin [19], as espécies do género requerem solos preferencialmente ácidos (pH entre 4,0 a 5,2).

Relativamente aos macronutrientes principais, o *SAT* e *STP* apresentam a maior acumulação de P (490 e 783 ppm, respetivamente) e K (648 e 3600 ppm, respetivamente). Já os substratos *SLMyr* e *SLVap* exibem a menor concentração em P (23 ppm). Quanto aos micronutrientes, o Fe apresenta as concentrações mais elevadas para todos os substratos e o Cu o mineral menos abundante.

Em termos de matéria orgânica, observa-se que os substratos variam entre os 10,34% no *SLLrn* e os 17,24% para o *SLVap*. O *SCrj* e o *STP*, não apresentados na Tabela 7 por limitações de equipamento, são solos constituídos por húmus, o que representa cerca de 60 a 80% em matéria orgânica [62, 64], relevante para a espécie *Vap*, já que, tal como sucede com o pH, as espécies do género requerem um solo ácido, húmido, bem drenado e rico em matéria orgânica [19].

A seleção de um substrato adequado dependerá de numerosos fatores, como a fase do processo de produção em que se intervém (sementes, plântulas, crescimento, entre outros), da espécie, condições climáticas, tamanho e forma dos tipos de suporte a usar, programas de irrigação ou do manuseamento dos substratos [23, 61, 63]. Exceto em condições excecionais, nenhum substrato que cumpra os requisitos mínimos pode ser considerado inadequado para os ensaios de germinação ou cultivo de plantas [63].

Nos ensaios realizados, o *STP* demonstrou ser o melhor substrato para as espécies *Myr*, *Vap* e *Lrn*; o *SL* foi o que apresentou os melhores resultados para a espécie *Tem*. Comparando o comportamento germinativo entre a taxa de germinação a metade do período germinativo

(TxG<sub>50</sub>) e a taxa obtida no final da etapa germinativa (TxG<sub>100</sub>), observa-se na Tabela 8 que as espécies *Myr* e *Lrn* apresentam uma TxG<sub>50</sub> muito limitado em todos os substratos testados (inferior a 50%), com exceção da *Myr* no STP que, embora mantendo uma percentagem igualmente reduzida, é ligeiramente superior aos restantes. Já as espécies *Vap* e *Tem* (excluindo o substrato SL para o L2*Tem*) exibem taxas germinativas muito próximas nos dois períodos referidos, indicando uma germinação mais eficiente na TxG<sub>50</sub>, embora ambas as espécies apresentem, em termos globais, sucesso germinativo muito restrito.

**Tabela 8:** Taxa de germinação a metade do período germinativo e comparação com os valores da taxa obtida no final da etapa germinativa em estufa, por espécie, lote e substrato testado.

Sítio	Tipo de substrato	Lote / espécie	Taxa de germinação (%)		Sítio	Tipo de substrato	Lote / espécie	Taxa de germinação (%)	
			TxG <sub>50</sub>	TxG <sub>100</sub>				TxG <sub>50</sub>	TxG <sub>100</sub>
Estufa (JB)	SL	L1 <i>Myr</i>	8,00	35,33	Estufa (JB)	SL	L1 <i>Tem</i>	11,67	16,67
		L2 <i>Myr</i>	7,33	41,33			L2 <i>Tem</i>	7,67	16,33
	SAT	L1 <i>Myr</i>	6,67	23,33		SAT	L1 <i>Tem</i>	10,33	15,00
		L2 <i>Myr</i>	5,33	18,00			L2 <i>Tem</i>	13,33	16,00
	STP	L1 <i>Myr</i>	32,00	60,67		STP	L1 <i>Tem</i>	9,67	13,00
		L2 <i>Myr</i>	29,33	60,00			L2 <i>Tem</i>	7,67	12,33
	SL	L1 <i>Vap</i>	7,04	10,61		SL	L1 <i>Lrn</i>	19,33	86,00
		L2 <i>Vap</i>	11,75	15,50			L2 <i>Lrn</i>	8,67	83,33
	SCrj	L1 <i>Vap</i>	11,74	15,27		SAT	L1 <i>Lrn</i>	24,00	61,33
		L2 <i>Vap</i>	23,04	26,72			L2 <i>Lrn</i>	14,67	78,67
	STP	L1 <i>Vap</i>	14,28	17,90		STP	L1 <i>Lrn</i>	12,67	84,67
		L2 <i>Vap</i>	29,14	33,86			L2 <i>Lrn</i>	18,00	90,00

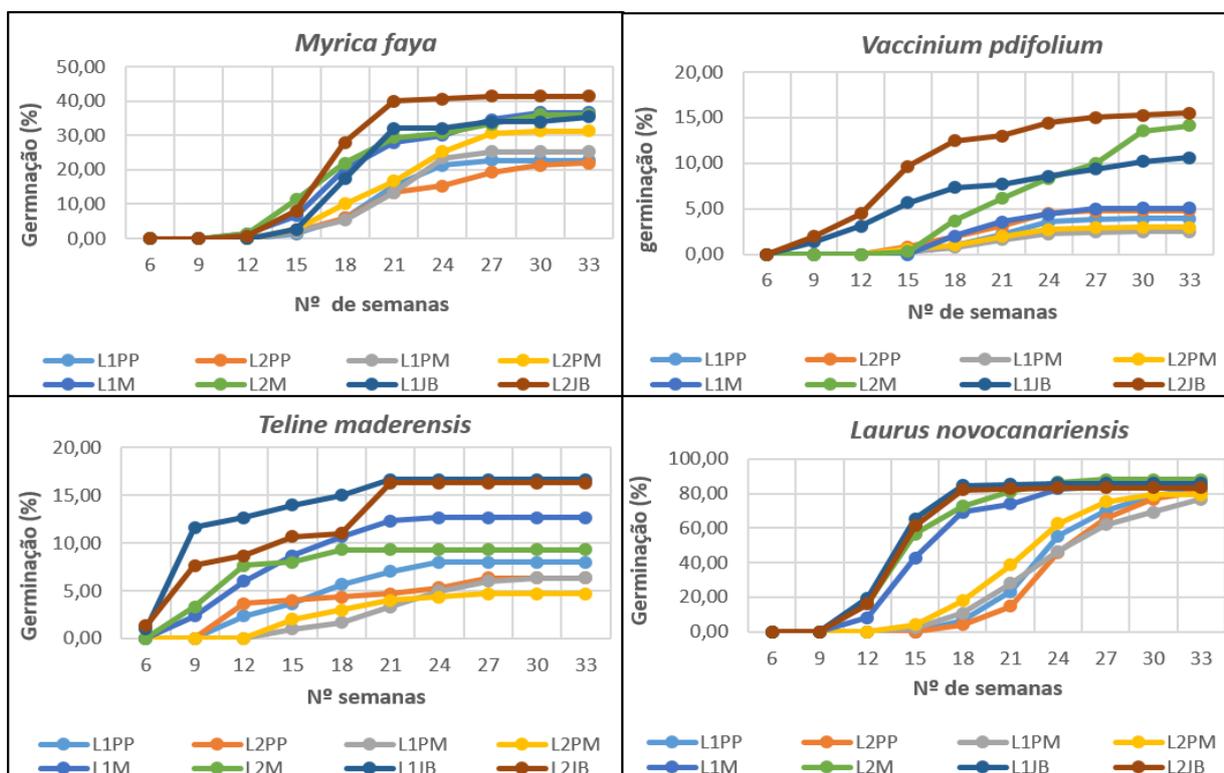
Na Figura 15 é possível identificar diferentes estados de desenvolvimento das plântulas durante os ensaios realizados com as 4 espécies.



**Figura 15:** Diferentes estádios de desenvolvimento das plântulas em estufa: A – Aspeto geral de uma bancada com os substratos testados; B – diferentes estados de desenvolvimento das plântulas de *Vap* no estado de maturação mais avançado (1 – SL*Vap*, 2 – SCrj, 3 – STP); C – *Lrn*, D – *Tem*; E – *Myr*.

### 7.3.2. Ensaios em campo

Em termos globais, a germinação em campo estendeu-se ao longo de 33 semanas. A *Myr* variou entre as 27 semanas no jardim botânico (JB), as 27 no Pico das Pedras (PP), 28 no Porto Moniz (PM) e as 29 na Matur (M); a *Vap* terminou a germinação no JB às 33 semanas, no PP às 31, PM às 28 e na M às 32; para a *Tem* foram necessárias 27 semanas para concluir o processo germinativo no PP, 21 no JB, 30 no PM e 23 na M; a *Lrn* variou entre as 32 semanas no PP, 21 no JB, 33 no PM e 26 na Matur. Na Figura 16 é possível observar as diferenças obtidas nos testes em campo, todos efetuados utilizando o SL como única variável edáfica nos ensaios germinativos.



**Figura 16:** Evolução da germinação das sementes em campo. L1PP e L2PP – Lotes 1 e 2 testados no Pico das Pedras; L1PM e L2PM – Lotes 1 e 2 testados no Porto Moniz; L1M e L2M – lotes 1 e 2 testados na Matur; L1JB e L2JB – lotes 1 e 2 testados na estufa do Jardim Botânico.

Tal como sucede anteriormente, nos ensaios em estufa para a *Vap*, o estado de maturação mais avançado apresenta os melhores resultados para todos os locais testados. Ainda na espécie referida e para o L2M, destaca-se uma germinação nula até à 15ª semana, mas que eclodiu muito rapidamente nas semanas seguintes até apresentar o segundo melhor resultado de germinação. A *Lrn* exibiu os melhores resultados para todos os ensaios realizados (variou entre 76,67% e os 88% para L1PM e L2M, respetivamente) e, em sentido

inverso, verificou-se que a *Vap* foi a espécie que apresentou uma germinação consideravelmente mais baixa que as restantes (variou entre os 2,51% e os 15,50%, para L1PM e L2JB, respetivamente). A *Tem* foi a que iniciou o processo germinativo mais rápido. O JB obteve a melhor taxa de germinação (exceto o L1Myr e L2Lrn que apresentaram maior taxa na M). O PM foi o local que apresentou a percentagem de germinação mais baixa (exceto o L2Myr que exibiu menor valor no PP).

Considerando as taxas de germinação registadas a metade do período germinativo e no final de cada etapa germinativa (Tabela 9), constata-se a existência de diferenças significativas em cada espécie, lote e local onde decorreram os ensaios. As espécies *Myr* e *Lrn* apresentam para a TxG<sub>50</sub> uma germinação significativamente reduzida relativamente à TxG<sub>100</sub> para todos os locais e lotes testados, apresentando em alguns casos uma taxa praticamente nula (0,67 para o L2Lrn) ou mesmo exibindo uma percentagem zero (caso da *Myr* no PM para ambos os lotes). A *Vap* ostentou igualmente uma TxG<sub>50</sub> extremamente reduzida ou nula em todos os locais e uma TxG<sub>100</sub> também limitada. Do mesmo modo que a anterior espécie, a *Tem* apresenta um sucesso germinativo escasso em ambas as variáveis, não se observando diferenças significativas.

**Tabela 9:** Taxa de germinação a metade do período germinativo e comparação com os valores da taxa obtida no final da etapa germinativa em campo, por espécie, lote e local testado.

Sítio	Tipo de substrato	Lote / espécie	Taxa de germinação (%)		Sítio	Tipo de substrato	Lote / espécie	Taxa de germinação (%)	
			TxG <sub>50</sub>	TxG <sub>100</sub>				TxG <sub>50</sub>	TxG <sub>100</sub>
<b>Pico das Pedras</b>	SL	L1Myr	1,33	22,67	<b>Porto Moniz</b>	SL	L1Myr	0,00	25,33
		L2Myr	3,33	22,00			L2Myr	0,00	31,33
		L1Vap	0,42	3,92			L1Vap	0,00	2,51
		L2Vap	1,18	4,81			L2Vap	0,00	2,97
		L1Tem	2,33	8,00			L1Tem	1,00	6,33
		L2Tem	4,00	6,33			L2Tem	2,00	4,67
		L1Lrn	2,00	82,67			L1Lrn	7,33	76,67
		L2Lrn	0,67	81,33			L2Lrn	4,00	79,33
<b>Matur</b>	SL	L1Myr	6,67	36,67	<b>Jardim botânico</b>	SL	L1Myr	8,00	35,33
		L2Myr	11,33	36,00			L2Myr	7,33	41,33
		L1Vap	0,00	5,07			L1Vap	7,04	10,61
		L2Vap	1,35	14,14			L2Vap	11,75	15,50
		L1Tem	6,00	12,67			L1Tem	11,67	16,67
		L2Tem	6,67	9,33			L2Tem	7,67	16,33
		L1Lrn	20,67	84,00			L1Lrn	19,33	86,00
		L2Lrn	34,67	88,00			L2Lrn	8,67	83,33

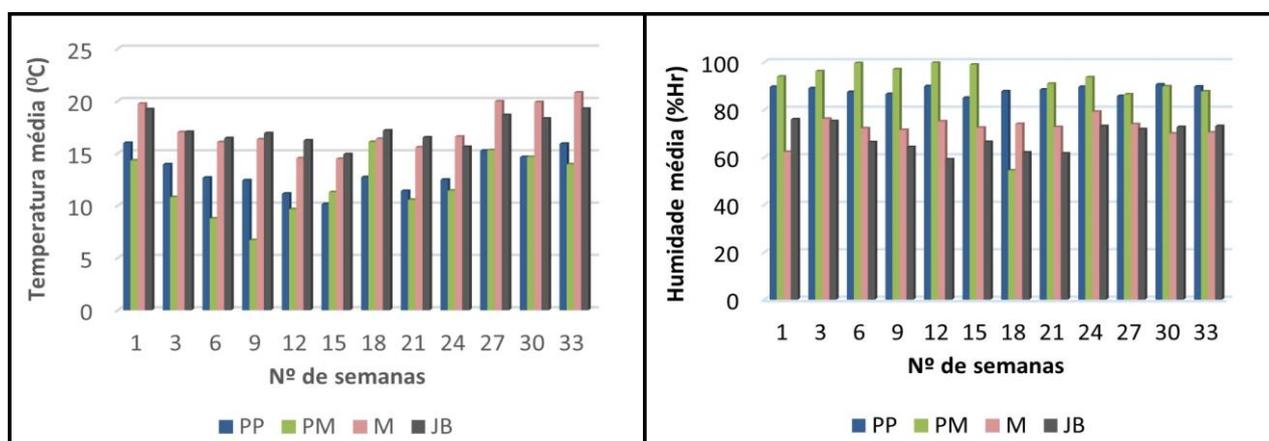
Nos 4 locais onde decorreram os ensaios, foi efetuada a recolha dos dados de temperatura e humidade atmosférica (Tabela 10), de forma a inferir de que forma essas variáveis influenciaram o processo de germinação das sementes.

**Tabela 10:** Sinopse dos valores médios de humidade e temperatura, máximos e mínimos dos locais onde decorreram os ensaios germinativos. Os valores de medição correspondem ao número total de dados (temperatura e humidade), recolhidos ao longo do tempo em que decorreram os ensaios.

Número de semanas: 33							
Valores limites: Temperatura -5,0/40,0 [°C] Humidade - 0,0/100,0 [% Hr]							
Locais	Valores de medição	Temperatura			Humidade		
		T.min. [°C]	T.máx. [°C]	T.méd. [°C]	H.min. [%Hr]	H.máx. [%Hr]	H.méd. [%Hr]
Pico das Pedras	5545	8,10	17,10	13,10	55,00	100	87,81
Porto Moniz	5508	2,10	27,30	11,93	24,10	100	91,15
Matur	5480	9,50	30,60	17,04	16,10	100	72,77
Jardim botânico	5407	9,10	35,60	17,31	10,10	98,1	66,89

Nota: T.min. – Temperatura mínima; T.máx. – Temperatura máxima; T.méd. – Temperatura média; H.min. – Humidade mínima; H.máx. – Humidade máxima; H.méd. – Humidade média

No período em que decorreram os ensaios, verificou-se a existência de grandes amplitudes para os dois parâmetros analisados. PP e PM apresentaram valores médios de temperaturas relativamente baixos e humidades altas. Na M e JB, as temperaturas exibiram valores relativamente elevados e humidades mais baixas quando comparadas com os anteriores. A variação da T.méd. e da H.méd ao longo do período em que decorreram os ensaios germinativos está representada na Figura 17.



**Figura 17:** Variação da temperatura média e da humidade média relativa do ar dos locais onde decorreram os ensaios germinativos.

Relativamente à temperatura média, verifica-se a existência de alternâncias constantes ao longo do tempo. O JB e a M destacam-se por apresentar continuamente os valores mais elevados. O PP, apesar das oscilações verificadas nas primeiras 15 semanas, exibiu uma contínua redução da temperatura, variando entre os 15,98°C na semana 1 e os 10,14°C na semana 15 e, entre esta e a semana 24, apresentou alterações constantes. Posteriormente, observa-se um gradual aumento da temperatura, variando entre os 14,09°C e os 15,90°C entre as semanas 24 e 33, respetivamente. Já o PM é o que exhibe os valores mais baixos, com exceção das semanas 2 (15,08°C), 11 (10,90°C), 18 (16,08°C), 26 (14,82), 27 (15,24°C) e 28 (15,95°C), que transpuseram as médias apresentadas no PP.

Quanto à humidade média relativa do ar, são perceptíveis as diferenças observadas nos 4 locais estudados. O PM apresenta valores extremamente elevados nas primeiras 17 semanas (próximo dos 100%) e, com exceção das semanas 18 e 19 (54,36%), verifica-se a presença de uma humidade relativa superior a 82%. O PP exhibe igualmente valores de humidade relativamente elevados ao longo das 33 semanas (variando entre 72,57% e os 93,71%). Já a M e JB apresentam números mais baixos ao longo de todo o ensaio. Na M, a humidade varia entre os 60,08% e os 80,10%, e no JB entre 56,16% e os 75,90%.

No que respeita ao tempo térmico (TT), verifica-se maior acumulação de temperatura na M e JB para as 4 espécies. O PM é o local que apresenta a menor acumulação. Os valores obtidos para o TT nos ensaios germinativos estão representados na Tabela 11.

**Tabela 11:** Valores do tempo térmico obtidos para as 4 espécies nos locais onde decorreram os ensaios germinativos

	<i>Myr</i>	<i>Vap</i>	<i>Tem</i>	<i>Lrn</i>
PP	862,23	810,15	511,83	746,87
PM	753,65	754,98	415,80	526,18
M	912,05	1015,73	1009,80	1078,82
JB	1095,19	1183,28	1188,00	1266,44

Durante o período experimental, a *Myr* foi a espécie que apresentou o TT mais reduzido na M e JB (912,05°Cd e 1095,19°Cd, respetivamente) e a *Tem* no PP e PM (511,83°Cd e 415,80°Cd, respetivamente). Já a *Vap* no PM e a *Myr* no PP exibiram os valores mais elevados (754,98°Cd e 862,23°Cd, respetivamente). A *Lrn* foi a espécie que obteve maior acumulação na M e JB (1078,82°Cd e 1266,44°Cd, respetivamente).

Em termos comparativos, observa-se que as variáveis climáticas influenciam o processo germinativo, destacando-se um sucesso maior na M e JB para todos os lotes de sementes das 4

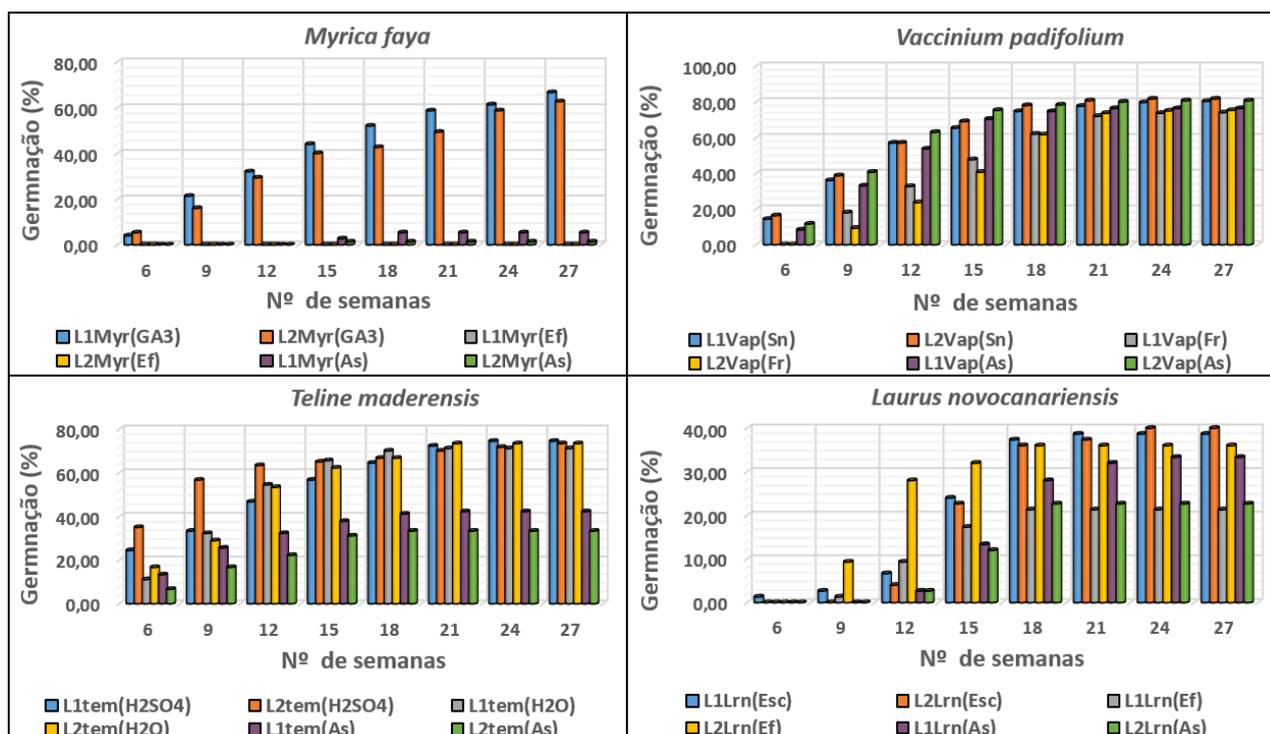
espécies. Nesses locais, a temperatura e tempo térmico apresentaram valores mais elevados, e menor humidade relativa. No PP e PM observa-se o contrário, ou seja, taxa de germinação inferior, associada a condições climáticas inversamente proporcionas às exibidas na M e JB.

### 7.3.3. Ensaio em laboratório

Para testar o comportamento germinativo das espécies em estudo, as sementes foram submetidas a germinação em distintas condições laboratoriais. Após os tratamentos pré-germinativos, as sementes foram colocadas em câmaras fitoclimáticas para quebrar a dormência ou vencer a inibição tegumentar (Capítulos 6.3.3.1) exceto a *Vap*, para a qual os ensaios foram realizados na ausência de tratamentos germinativos.

Tendo em conta o número de ensaios e a disponibilidade de espaço em termos de câmaras de germinação, bem como as diferentes exigências em termos de fotoperíodo e temperatura, para as espécies *Lrn* (20°C – 16 horas luz; 16°C – 8 horas no escuro) [28] e *Myr* (23°C – 16 horas luz; 20°C – 8 horas no escuro) [68], selecionou-se a mesma câmara. Na ausência de informação para a *Tem*, optou-se igualmente por colocar os testes germinativos na câmara referida, uma vez que a espécie apresenta uma distribuição geográfica semelhante às anteriores.

Os meios de cultura utilizados nos ensaios foram selecionados de acordo com as regras do ISTA [6] e Rao et al [22]. Na Figura 18 são apresentados os resultados obtidos ao longo do período experimental nos distintos ensaios de germinação efetuados em laboratório.



**Figura 18:** Evolução da germinação das sementes submetidas aos pré-tratamentos e colocadas em câmaras fitoclimáticas. L1Myr, L2Myr, L1Vap, L2Vap, L1Tem, L2Tem, L1Lrn e L2Lrn correspondem aos lotes 1 e 2 das distintas espécies em estudo. Pré-tratamentos germinativos efetuados às sementes: GA3 – Ácido Giberélico (500ppm); Ef – Estratificação a Frio (4 semanas), As – Atmosfera Saturada (72 horas), Sn – Sementeira Normal (sem tratamento), Fr – Frutos Colocados em Refrigeração e cujas sementes apenas foram retiradas imediatamente antes dos testes germinativos; H2SO4 – Sementes Submetidas ao Ácido Sulfúrico Concentrado (96%) por 30 minutos; H2O – Escaldão em Água a 100°C durante 60 segundos; Esc – Escarificação Mecânica.

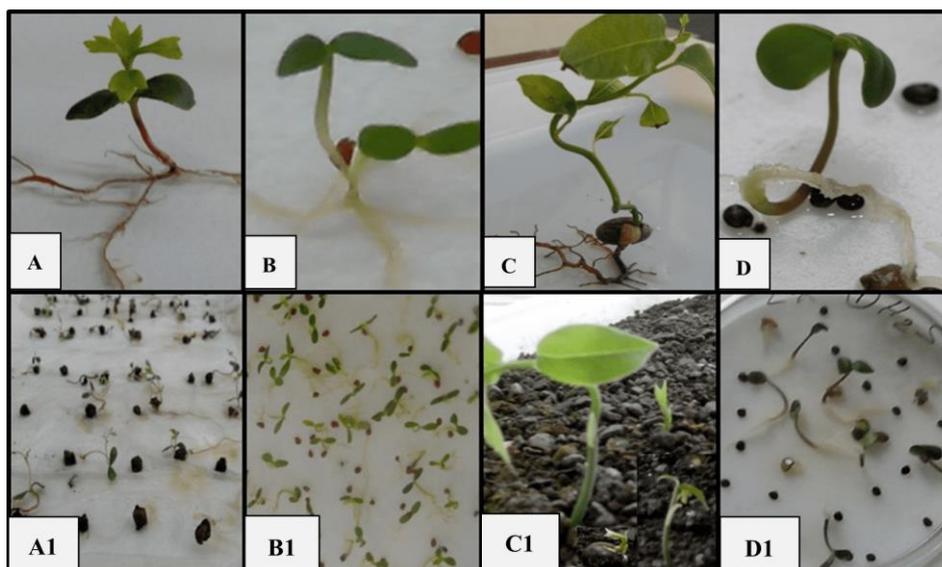
Em termos gerais, a germinação apresentou uma duração máxima de 26 semanas (*Myr* em GA<sub>3</sub>), tendo-se iniciado na 2ª semana para as sementes da espécie *Tem* que foram submetidas ao pré-tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A espécie *Vap* iniciou o processo germinativo à 5ª semana (para a Sn e As); *Myr* e *Lrn* iniciaram na 6ª semana para as sementes submetidas ao pré-tratamento GA<sub>3</sub> e Esc, respetivamente. Já o término da germinação para as espécies *Vap* e *Tem* ocorreu na 25ª semana, para as sementes armazenadas nos frutos em refrigeração e sujeitas ao H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respetivamente; a *Lrn* concluiu o processo germinativo na 24ª semana para as sementes submetidas a Esc.

Apesar dos cuidados adotados e das desinfecções efetuadas para evitar possíveis contaminações, observou-se ao longo do tempo na *Myr* e *Tem* o aparecimento de fungos nas sementes, decorrentes, essencialmente, da manipulação constante das mesmas para contagens, abertura dos suportes para retirada das sementes germinadas e manutenção da humidade. Para a espécie *Myr*, os tratamentos Ef e As apresentaram um insucesso generalizado, decorrente das contaminações das placas de Petri. Para a *Tem* verificou-se igualmente uma contaminação inicial num dos replicandos para as sementes submetidas a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que se alastrou rapidamente a toda a placa, levando à perda total das sementes (Figura 19).



**Figura 19:** Placa de Petri com plântulas e sementes de *Tem* (tratadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) integralmente contaminadas.

Na globalidade dos ensaios efetuados a espécie *Vap* obteve os melhores resultados, seguida da *Tem*. A *Lrn* foi a que apresentou a taxa de germinação mais reduzida (apenas exibiu nas sementes do L2 submetidas à Esc valores ligeiramente superiores ao L2 da *Tem* (As)). Na Figura 20 observam-se plântulas em desenvolvimento nos suportes de germinação colocados nas câmaras fitoclimáticas.



**Figura 20:** Pormenor das plântulas nos suportes de germinação colocados nas câmaras fitoclimáticas: A e A1 – *Myr*; B e B1 – *Vap*; C e C1 *Lrn*; D e D1 – *Tem*.

O melhor sucesso germinativo na *Myr* foi obtido com o pré-tratamento  $GA_3$  (66,67% e 62,67% para L1 e L2, respetivamente). Na *Tem* a germinação mais eficiente foi obtida com  $H_2SO_4$  (74,44% e 73,33%, para L1 e L2, respetivamente) e  $H_2O$  no L2 (73,33%).

Para a *Lrn*, a Esc apresentou a melhor taxa de germinação (38,67% e 40,00% para L1 e L2, respetivamente). De forma a quebrar a dormência complexa associada, foi realizado um tratamento inicial para superar a dormência tegumentar (escarificação mecânica), seguida de uma estratificação a frio para alteração fisiológica do embrião que poderá apresentar um estado latente [19, 23, 69]. No entanto, observou-se que a *Lrn* não necessita de pré-tratamentos para eliminar dormências associadas, uma vez que a espécie obteve um sucesso germinativo superior, quer em campo, quer em estufa.

A *Vap* obteve o melhor resultado nos lotes de sementes submetidos à Sn (80,33% e 81,67% para L1 e L2, respetivamente). Segundo Hartmann et al [69] a maioria das espécies do género *Vaccinium* não necessita de qualquer tratamento pré-germinativo, comprovado pelas elevadas taxas de germinação obtidas nas 3 variantes experimentais (Sn, As e Fr), todas realizadas na ausência de tratamentos (variou entre os 74% e os 81,67% para L1*Vap* (Fr) e L2*Vap* (Sn), respetivamente).

Sementes de espécies do género *Myrica* requerem tratamentos pré-germinativos para obter uma boa taxa de germinação. No trabalho de Pipinis et al [86], sementes de *Myr* submetidas a um tratamento com  $GA_3$  obtiveram uma melhoria significativa, mas inferior, quando comparadas com sementes germinadas após a estratificação. No presente trabalho

não foi possível comparar os diferentes tratamentos efetuados, decorrente das contaminações nas variantes experimentais Ef e As. No entanto, constatou-se uma melhoria no sucesso germinativo das sementes submetidas ao GA<sub>3</sub>, quando comparadas com as sementes não tratadas dos demais ensaios realizados neste estudo (variou entre os 66,67% e os 62,67%, para L1 e L2, respetivamente). Para a *Tem*, os dois tratamentos efetuados para romper os tegumentos obtiveram uma taxa de germinação superior às sementes não tratadas: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 60% e 65% para L1 e L2, respetivamente; H<sub>2</sub>O (100°C), 61,11% para ambos os lotes; As 25,56% e 16,67% para L1 e L2, respetivamente.

Relativamente à evolução da germinação em função do tempo, excetuando o *Lrn*, não se observam variações significativas nos distintos tratamentos efetuados às sementes, revelando a presença de uma linearidade no processo germinativo, ou seja, não se observam picos germinativos ao longo do tempo.

Quanto ao comportamento germinativo relativo às duas variáveis, TxG<sub>50</sub> e TxG<sub>100</sub> (Tabela 12), observa-se para a generalidade dos ensaios realizados a existência de uma taxa mais elevada na primeira etapa germinativa quando comparada com os testes efetuados em campo e estufa. As espécies *Vap* e *Tem* obtiveram para a TxG<sub>50</sub> uma percentagem superior a 50% na globalidade dos ensaios. A *Lrn* foi a espécie que apresentou os resultados mais reduzidos para a TxG<sub>50</sub>.

**Tabela 12:** Taxa de germinação obtida a metade do período germinativo e comparação com os resultados obtidos no final da etapa germinativa em laboratório.

Pré. - Tratam. Germinativos	Lote / espécie	Taxa de germinação (%)		Pré. - Tratam. Germinativos	Lote / espécie	Taxa de germinação (%)	
		TxG <sub>50</sub>	TxG <sub>100</sub>			TxG <sub>50</sub>	TxG <sub>100</sub>
GA <sub>3</sub>	L1Myr	48,00	66,67	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	L1Tem	60,00	74,44
	L2Myr	40,00	62,67		L2Tem	65,00	73,33
Ef	L1Myr	0,00	0,00	H <sub>2</sub> O (100°C)	L1Tem	61,11	71,11
	L2Myr	0,00	0,00		L2Tem	61,11	73,33
As	L1Myr	0,00	5,33	As	L1Tem	25,56	42,22
	L2Myr	0,00	1,33		L2Tem	16,67	33,33
Sn	L1Vap	63,67	80,33	Esc	L1Lrn	14,67	38,67
	L2Vap	62,00	81,67		L2Lrn	4,00	40,00
Fr	L1Vap	47,67	74,00	Ef	L1Lrn	4,00	21,33
	L2Vap	40,67	75,33		L2Lrn	9,33	36,00
As	L1Vap	60,33	76,33	As	L1Lrn	2,67	33,33
	L2Vap	73,00	80,67		L2Lrn	1,33	22,67

## 7.4. Análise Bioquímica das sementes

Embora pouco conhecido o processo de mobilização das substâncias de reserva em espécies florestais durante a germinação [19], avaliou-se nas sementes das 4 espécies estudadas a variação dos teores em proteína bruta, lípidos totais, açúcares solúveis, amido, matéria orgânica, cinzas e minerais. Para o efeito, determinou-se a composição bioquímica dos parâmetros referidos nos estados de maturação distintos, antes de iniciar o período germinativo, e durante a germinação (valores obtidos a metade da etapa germinativa), de forma a avaliar a composição inicial e as alterações no seu conteúdo durante o processo germinativo. Os teores dos parâmetros analisados foram obtidos pelas técnicas analíticas convencionais de *química molhada* e encontram-se representados em peso por 100 gramas de matéria seca, ou seja, em g/100g MS ou mg/100g MS.

O metabolismo associado às sementes foi igualmente determinado nas duas fases iniciais de germinação. Os resultados da atividade catalítica da MDH e peroxidase estão quantificados em UC/g peso fresco.

### 7.4.1. Matéria orgânica e minerais

Os minerais foram determinados através do processo de incineração. Neste processo, a componente orgânica é eliminada e as cinzas obtidas representam o resíduo mineral da quase totalidade da matéria inorgânica das amostras incineradas [87]. Na Tabela 13, estão representados os valores médios e desvio padrão referentes ao teor de matéria orgânica e cinzas dos ensaios realizados a tempo zero e meio tempo de germinação nas 4 espécies em estudo.

**Tabela 13:** Valores médios do teor de cinzas e matéria orgânica das 4 espécies em estudo (g/100g MS).

Espécie	Matéria orgânica	Cinzas	Espécie	Matéria orgânica	Cinzas
L1Myr tzg	94,01 ± 0,01	1,83 ± 0,01	L1Tem tzg	90,21 ± 0,09	6,82 ± 0,06
L2Myr tzg	94,03 ± 0,02	1,87 ± 0,01	L2Tem tzg	87,59 ± 0,09	6,84 ± 0,07
L1Myr mtg	92,55 ± 0,01	1,72 ± 0,01	L1Tem mtg	84,63 ± 0,00	6,50 ± 0,00
L2Myr mtg	92,62 ± 0,09	1,79 ± 0,07	L2Tem mtg	84,28 ± 0,03	6,62 ± 0,02
L1Vap tzg	91,72 ± 0,08	3,66 ± 0,06	L1Lrn tzg	88,79 ± 0,00	2,02 ± 0,25
L2Vap tzg	90,59 ± 0,04	3,78 ± 0,03	L2Lrn tzg	89,95 ± 0,02	2,15 ± 0,06
L1Vap mtg	88,27 ± 0,06	3,39 ± 0,04	L1Lrn mtg	88,63 ± 0,02	1,83 ± 0,01
L2Vap mtg	89,48 ± 0,04	3,72 ± 0,03	L2Lrn mtg	85,28 ± 0,00	1,81 ± 0,00
			L3Lrn tzg	84,99 ± 0,04	2,64 ± 0,05
			L3Lrn mtg	83,87 ± 0,06	2,00 ± 0,03

Nota: Resultados apresentados em matéria seca (MS) sob a forma de média ± desvio padrão; tzg – tempo zero de germinação; mtg – meio tempo de germinação.

O teor de cinzas nas sementes variou entre as 4 espécies e dentro dos distintos estados de maturação. A *Tem* apresenta para todos os ensaios realizados o valor mais elevado (variou entre as 6,82g/100g MS e os 6,50 g/100g MS para L1tzg e L1mtg, respetivamente, e entre os 6,84 g/100g MS e os 6,62 g/100g MS para L2tzg e L2mtg, respetivamente). Observa-se para a totalidade dos ensaios realizados a existência de um consumo mineral durante o processo germinativo. Comparando os dois lotes (L1 e L2), verifica-se que o estado de maturação mais avançado (L2) apresenta maior teor de cinzas para a totalidade das espécies. Quanto à matéria orgânica, verificou-se para todos os lotes uma ligeira diminuição durante o processo germinativo.

As cinzas são constituídas por elementos minerais, cuja determinação, em termos médios, está representado neste estudo sob a forma de cinco macro e quatro micronutrientes. Na Tabela 14 estão representados os elementos minerais identificados nas amostras analisadas, detetados e quantificados por técnicas analíticas diferenciadas: colorimetria (azoto, fósforo), fotometria de chama (potássio) e espectrofotometria de absorção atómica (cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco e manganês).

**Tabela 14:** Composição mineral de macro e micronutrientes presentes nas cinzas das 4 espécies.

Amostras	Macronutrientes (g/100g MS)					Micronutrientes (g/100g MS)			
	Azoto	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Ferro	Cobre	Zinco	Manganês
L1Myr tzg	1,17	0,10	0,13	0,24	0,07	0,0044	0,0003	0,0008	0,0043
L2Myr tzg	1,26	0,10	0,15	0,24	0,07	0,0047	0,0007	0,0009	0,0045
L1Myr mtg	1,16	0,09	0,09	0,19	0,05	0,0034	0,0002	0,0007	0,0033
L2Myr mtg	1,24	0,09	0,09	0,18	0,05	0,0037	0,0004	0,0008	0,0035
L1Vap tzg	1,10	0,14	0,09	0,08	0,08	0,0310	0,0016	0,0012	0,0200
L2Vap tzg	1,35	0,17	0,09	0,09	0,08	0,0076	0,0006	0,0005	0,0115
L1Vap mtg	2,47	0,34	0,15	0,13	0,11	0,0185	0,0035	0,0024	0,0345
L2Vap mtg	2,73	0,40	0,20	0,16	0,11	0,0143	0,0037	0,0026	0,0370
L1Tem tzg	4,98	0,59	0,75	0,22	0,20	0,0081	0,0008	0,0089	0,0083
L2Tem tzg	4,97	0,59	0,74	0,22	0,20	0,0089	0,0011	0,0083	0,0092
L1Tem mtg	4,71	0,59	0,65	0,14	0,15	0,0080	0,0006	0,0086	0,0083
L2Tem mtg	4,80	0,56	0,63	0,22	0,18	0,0078	0,0006	0,0083	0,0090
L1Lrn tzg	1,40	0,13	0,34	0,06	0,06	0,0022	0,0024	0,0017	0,0015
L2Lrn tzg	1,45	0,14	0,38	0,07	0,07	0,0020	0,0027	0,0017	0,0016
L1Lrn mtg	1,41	0,08	0,09	0,13	0,04	0,0152	0,0043	0,0015	0,0015
L2Lrn mtg	1,21	0,08	0,13	0,13	0,04	0,0127	0,0047	0,0016	0,0013
L3Lrn tzg	1,35	0,17	0,40	0,07	0,09	0,0038	0,0016	0,0016	0,0067
L3Lrn mtg	1,24	0,15	0,28	0,07	0,07	0,0018	0,0014	0,0016	0,0035
Média	2,22	0,25	0,30	0,15	0,09	0,0088	0,0017	0,0030	0,0094
Mínimo	1,10	0,08	0,09	0,06	0,04	0,0018	0,0002	0,0005	0,0013
Máximo	4,98	0,59	0,75	0,24	0,20	0,0310	0,0047	0,0089	0,0370

Nota: Valores determinados no Laboratório de Qualidade Agrícola da Camacha (Divisão de Análises de Solos e Plantas)

O azoto apresenta o valor mais elevado para a totalidade das amostras analisadas. Em termos médios, este mineral exhibe um teor de 2,22 g/100g MS, o fósforo 0,25 g/100g MS, potássio 0,30 g/100g MS, cálcio 0,15 g/100g MS e o magnésio 0,09 g/100g. Relativamente aos micronutrientes, o ferro contribui com 0,0088 g/100g MS, o cobre com 0,0017 g/100g MS, zinco com 0,0030 g/100g MS e o manganês com 0,0094 g/100g MS.

Na globalidade das amostras analisadas observa-se a manutenção ou aumento do teor mineral para o estado de maturação mais avançado. O inverso, embora tenuemente, verifica-se na espécie *Tem* para o azoto, potássio e zinco, e *Lrn* para o ferro. Já a *Vap* apresenta para todos os micronutrientes analisados um teor mais baixo no estado de maturação mais avançado.

Quanto à composição do teor mineral das sementes antes do início do processo germinativo e as alterações verificadas no mesmo durante a germinação, observa-se para as 4 espécies um comportamento distinto, embora se possa considerar, em termos globais, que existe um decréscimo. A *Vap* é a única espécie que apresenta para os diferenciados lotes os valores mais elevados no mtg, ou seja, verifica-se maior teor mineral durante a germinação para todos os macro e micronutrientes analisados. A *Lrn* acompanha o mesmo progresso ascendente para os minerais cálcio, ferro e cobre (lotes L1 e L2). A maior concentração de minerais observada durante o processo germinativo deverá estar relacionada com a degradação do ácido fítico. Segundo Denisa et al [88], vários estudos mostraram que a germinação poderá levar a um aumento da biodisponibilidade de diversos minerais nas sementes. No trabalho com leguminosas publicado pelos autores (soja, tremoço, grão-de-bico, feijão, lentilha), o conteúdo de cálcio aumenta com o aumento do tempo de germinação para a generalidade das 5 leguminosas. Esse aumento deverá ser o resultado da diminuição do ácido fítico, que forma fitatos com o mineral, libertando o cálcio durante o processo germinativo. No mesmo estudo o fósforo aumentou 25,87% na lentilha, o ferro diminuiu nos primeiros 4 dias de germinação para a soja e grão-de-bico, e aumentou para o feijão e lentilha, enquanto o zinco amplia o valor em 50% para o tremoço.

#### 7.4.2. Hidratos de carbono

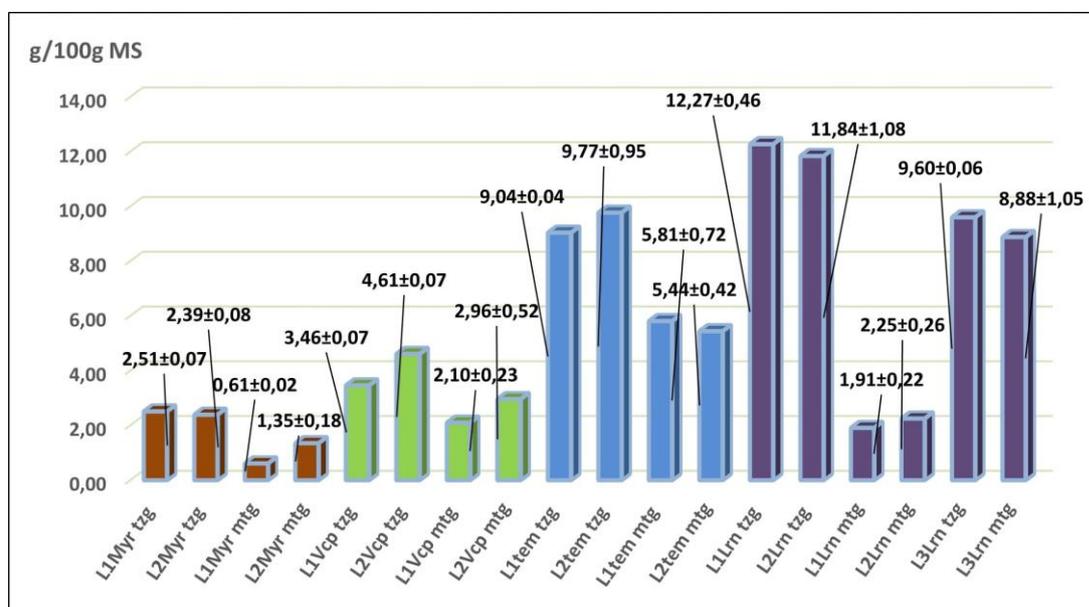
A extração dos hidratos de carbono foi efetuada em duas etapas distintas: os açúcares solúveis com etanol aquoso (extração alcoólica) e o amido a partir de uma extração ácida utilizando para o efeito o ácido clorídrico (hidrólise ácida). Posteriormente, os açúcares foram quantificados pelo método de antrona [72, 73].

Ali e Elozeiri [40] mencionaram, num estudo publicado, que a atividade da amilase é regulada pela concentração de açúcares redutores, tanto nos cotilédones, como no eixo

embrionário. Nesse mesmo estudo, observaram que a atividade da enzima nos cotilédones aumentou gradualmente até atingir um pico durante o processo de germinação, enquanto o teor de amido diminuiu os açúcares solúveis aumentaram.

#### 7.4.2.1. Açúcares solúveis

O teor médio dos açúcares solúveis presente na totalidade das amostras analisadas é de 5,38 g/100g MS. Os valores exibidos na Figura 21 mostram que a *Lrn* é a espécie que apresenta no período pré-germinativo o conteúdo mais elevado em açúcares solúveis (12,27 g/100g MS, L1). Já a *Myr* é a que apresenta o teor mais reduzido (2,39 g/100g MS, L2). As duas espécies apresentaram valores ligeiramente mais elevados no Lote 1. Pelo contrário, a *Vap* e a *Tem* exibiram um teor de açúcares superior no Lote 2.

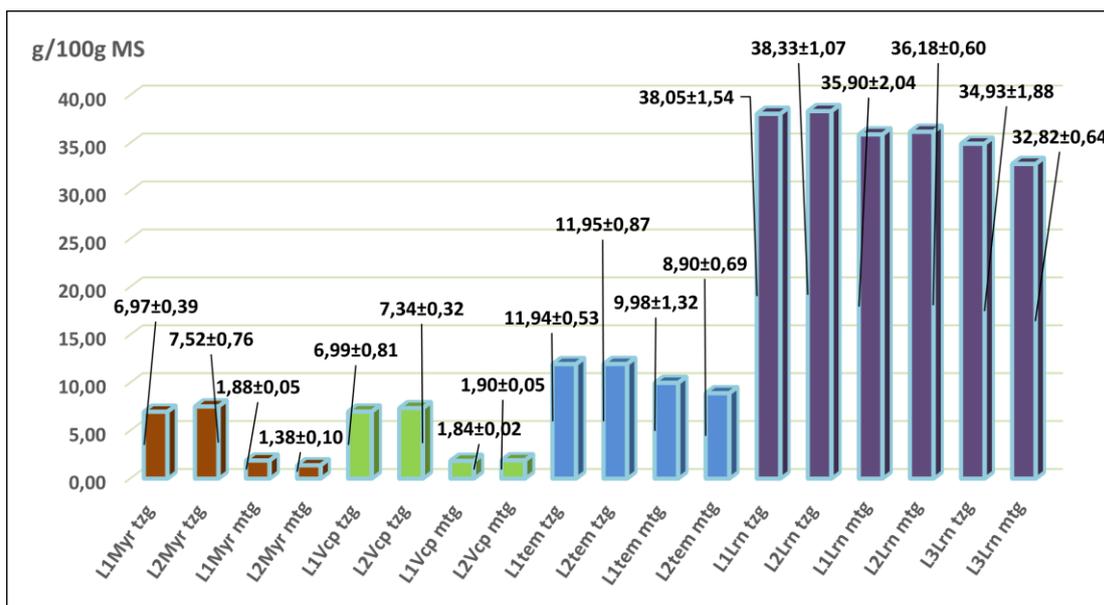


**Figura 21:** Valores médios do teor de açúcares solúveis presentes nas sementes das 4 espécies em estudo (g/100g MS). Rótulo de dados apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Relativamente ao teor de açúcares livres nas sementes no t zg e quanto às alterações observadas no mesmo no mtg, verifica-se que todas as espécies apresentam um comportamento idêntico, ou seja, um decréscimo para todas as análises efetuadas, o que revela um esgotamento do teor de açúcar no processo germinativo. A utilização média de açúcares nas 4 espécies foi de 49,70%. A espécie que exibiu uma redução mais acentuada foi a *Lrn*, seguida da *Tem*.

### 7.4.2.2. Amido

As amostras apresentaram um teor médio inicial em amido de 16,38 g/100g MS. Tal como sucede anteriormente para os açúcares solúveis, a *Lrn* e a *Tem* são as espécies que exibem o teor mais elevado (Figura 22). A *Lrn* destaca-se por auferir um valor consideravelmente superior às restantes espécies, quer no período pré-germinativo, quer na fase germinativa (variou entre os 38,33 g/100g MS e os 34,93 g/100g MS, para L2tzg e L3tzg, respetivamente, e entre os 36,18 g/100g MS e os 32,82 g/100g MS para L2 mtg e L3 mtg, respetivamente).



**Figura 22:** Valores médios do teor de amido presente nas sementes das 4 espécies em estudo (g/100g MS). Resultados apresentados com base no peso da matéria fresca sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

A *Myr* e a *Vap* apresentam um teor de amido semelhante, quer em ambos os estados de maturação, quer na mobilização daquela substância de reserva durante a germinação. Todas as espécies exibem um valor mais elevado no estado de maturação mais avançado. Tal como verificado precedentemente para os açúcares, observou-se um decréscimo no conteúdo de amido durante o processo germinativo. A mobilização média das reservas nas 4 espécies foi de 40,19%. As espécies que exibiram uma redução mais acentuada foram as que apresentavam menor reserva em amido, ou seja, a *Myr* e a *Vap*.

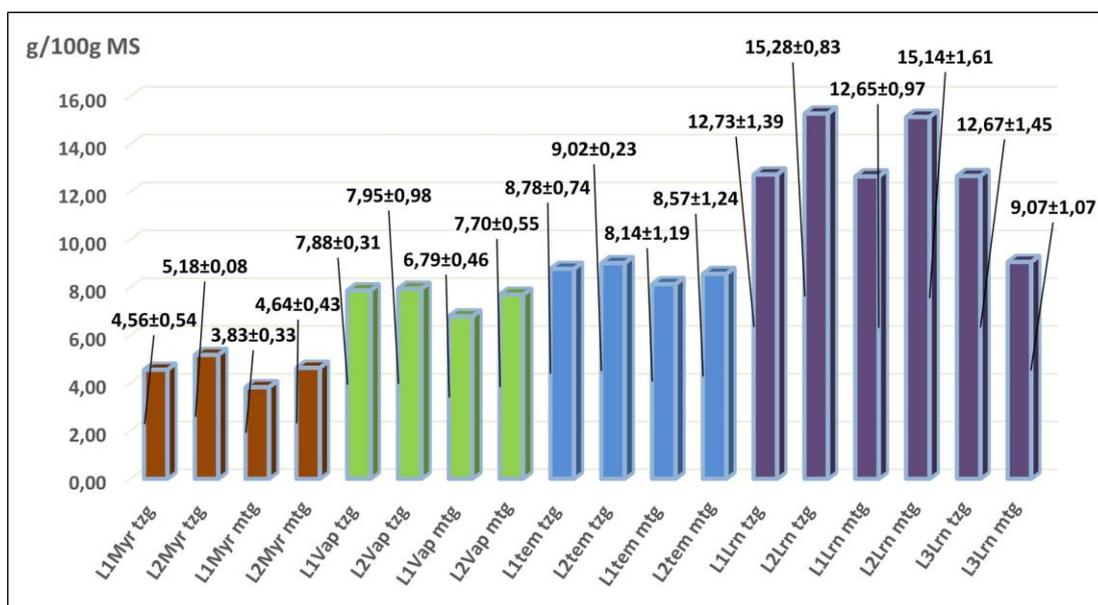
### 7.4.3. Lípidos

Os triacilglicerídeos, principais lípidos de reserva presentes nas sementes [41], são armazenados em oleossomas e representam cerca de 20 a 50% da matéria seca nas sementes.

À medida que a germinação prossegue, estes são hidrolisados para produzir a energia necessária para a síntese de açúcares, aminoácidos e cadeias de carbono necessárias para o crescimento embrionário [40].

A mobilização dos lípidos de armazenamento nas sementes em germinação inicia-se nos oleossomas com a hidrólise dos triacilglicerídeos em ácidos gordos e glicerol, por ação de lípases. Posteriormente, os ácidos gordos são submetidos em  $\beta$ -oxidação nos peroxissomas. Após esta fase, o ciclo do glioxilato prossegue parcialmente no peroxissoma e parcialmente no citoplasma. O succinato é então transportado dos peroxissomas para as mitocôndrias, sendo convertido em malato através do ciclo de Krebs. O malato, por sua vez, após transportado para o citoplasma, é convertido em oxaloacetato, contribuindo para a gluconeogénese e a síntese de açúcares, que são essenciais para o processo de germinação de sementes [40].

O teor médio inicial de lípidos presente nas amostras quantificadas no presente trabalho foi de 9,34 g/100g MS. Durante o período germinativo sofreu um ligeiro decréscimo para 8,50 g/100g MS. Segundo os resultados obtidos (Figura 23), a *Lrn* é a espécie que obteve a quantidade mais elevada de lípidos no período pré-germinativo (variou entre os 12,67 g/100g MS e os 15,28 g/100g MS para L3 e L2, respetivamente), e a *Myr* a que apresenta o menor valor (variou entre os 4,56 g/100g MS e os 5,18 g/100g MS para L1 e L2, respetivamente). Comparando as diferenças obtidas nos dois lotes, verifica-se um ligeiro aumento do teor de lípidos para a totalidade das amostras no estado de maturação mais avançado.



**Figura 23:** Teor médio de lípidos totais presente nas sementes das 4 espécies em estudo (g/100g MS). Resultados apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

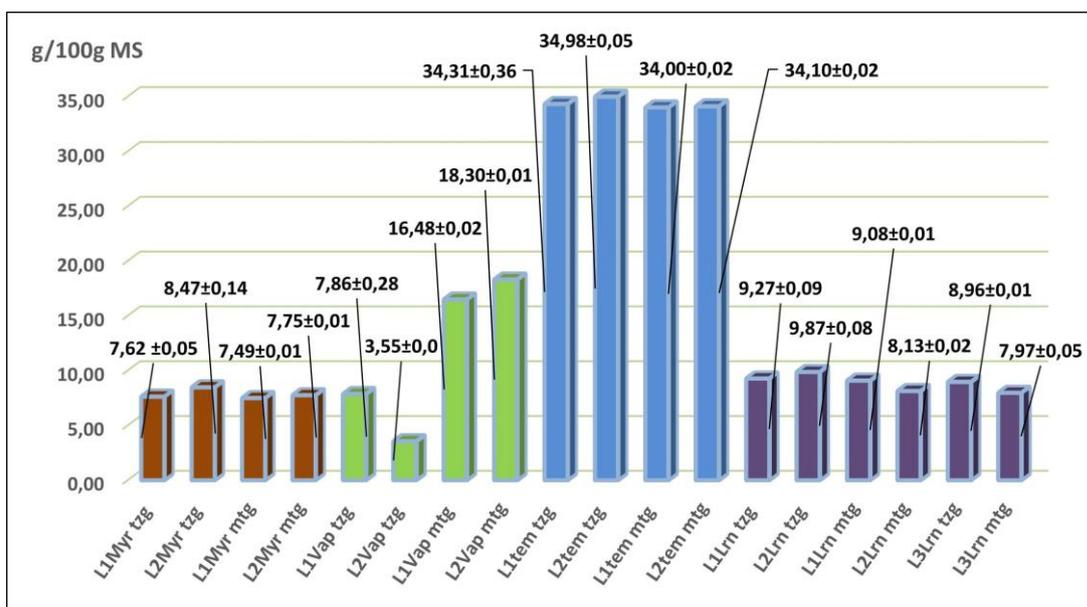
A redução média do teor de lípidos para todas as amostras analisadas foi de 9,52%. A espécie que exibiu uma diminuição mais acentuada foi a *Lrn* no Lote 3 (equivalente a 28,41% da totalidade dos lípidos armazenados nas sementes).

#### 7.4.4. Proteína Bruta

O método de Kjeldahl é utilizado para determinar o teor de azoto orgânico e inorgânico em amostras biológicas. Na digestão (primeira fase do método) é efetuada a decomposição do azoto, utilizando para o efeito um ácido concentrado a altas temperaturas, obtendo-se da reação uma solução de sulfato de amónia ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) [76]. Neste projeto, digeriu-se 1 g de amostra em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 420°C na presença de um regulador de ebulição (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e de um catalisador (Se). Na mistura reacional, deveria ser adicionado o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 35% para facilitar o processo digestivo. No entanto, todas as amostras no meio tempo de germinação submetidas ao processo digestivo ficaram totalmente ou praticamente calcinadas, obtendo-se teores proteicos praticamente inexistente ou mesmo nulos, pelo que optou-se por efetuar toda a metodologia na ausência do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para todas as análises efetuadas.

Durante o processo de germinação as enzimas proteolíticas desempenham um papel fundamental na quebra das proteínas armazenadas nas sementes. Protéases e peptidases foram detetadas em sementes em germinação, ao contrário dos inibidores, de natureza proteica, que diminuem a sua atividade durante o processo. A hidrólise das proteínas de reserva produz aminoácidos livres, essenciais para a síntese de proteínas no endosperma e no embrião durante a etapa germinativa [40].

O teor médio de proteína bruta presente na totalidade das amostras analisadas no período pré-germinativo foi de 13,88 g/100g MS. Durante a etapa germinativa, verificou-se um ligeiro aumento do teor proteico para 15,92 g/100g MS. Esse incremento deve-se à *Vap* que, ao contrário das restantes espécies, apresenta um conteúdo mais elevado de proteína bruta na etapa germinativa em ambos os lotes (Figura 24).



**Figura 24:** Composição média da proteína bruta presente nas sementes das 4 espécies em estudo (g/100g MS). Rótulo de dados apresentados sob a forma de média ± desvio padrão.

A *Tem* destaca-se das restantes espécies por apresentar um teor proteico consideravelmente superior, quer nos distintos estados de maturação, quer nas duas etapas germinativas. Com exceção da *Vap*, as espécies exibem um valor superior no estado de maturação mais avançado, bem como uma ligeira mobilização das reservas proteicas no processo germinativo.

A mobilização média total das reservas proteicas nas 3 espécies (*Tem*, *Myr* e *Lrn*) foi de 6,34%. Quanto à *Vap*, observou-se um incremento proteico exponencial na etapa germinativa, com um aumento da percentagem de proteína bruta nas amostras de 109,67% no L1 e 415,49% no L2. Segundo Ikenna et al [89], durante a germinação, os inibidores da tripsina e o fitato são restringidos através da hidrólise. Na reação, o conteúdo proteico aumenta nas sementes germinadas quando comparado com as não germinadas, sugerindo que as proteínas foram hidrolisadas ou dissociadas dos fatores antinutricionais.

#### 7.4.5. pH e acidez titulável

Durante a germinação das sementes ocorrem diversas alterações bioquímicas, incluindo mudanças de pH e acidez que estão frequentemente associadas à atividade metabólica das plântulas em crescimento. O pH desempenha um papel relevante na quebra da dormência e na germinação de sementes. Valores de pH inferiores a 3 e superiores a 8 foram descritos como sendo inibidores da germinação, enquanto outros trabalhos confirmaram que a germinação de muitas espécies não é afetada pelo pH entre 3 a 7. Algumas espécies poderão apresentar um pH

ótimo, no entanto, cada uma poderá expor um comportamento germinativo distinto em diferentes condições de pH do meio [90, 91].

Várias espécies necessitam de um pH ácido para germinar, crescer e se desenvolver adequadamente. Por outro lado, existem espécies que não toleram a acidez, consequência da presença dos íons  $H^+$  que, frequentemente, influenciam negativamente o desenvolvimento das plântulas [92].

A acidez é expressa neste trabalho em percentagem de ácido láctico. As sementes passam por condições de anaerobiose temporárias, quer no período pré-germinativo, quer após o início da germinação, resultando na produção de etanol e ácido láctico. Estes produtos, decorrentes da respiração anaeróbica, acumulam-se nas sementes em diferentes proporções, dependendo da espécie. Com o desenvolvimento da radícula nas estruturas seminais envolventes, esses produtos anaeróbicos diminuem à medida que são metabolizados sob condições de aerobiose crescente, por ação das enzimas álcool desidrogenase e desidrogenase do ácido láctico. Em condições anaeróbicas, a fermentação láctica sucede como um processo alternativo para a produção de energia, resultando na conversão dos hidratos de carbono em ácido láctico [60].

Tanto o pH quanto a acidez são importantes indicadores do estado metabólico das sementes durante a germinação, podendo influenciar diretamente o processo de desenvolvimento das plântulas [60, 91]. A Tabela 15 apresenta os valores médios do pH e acidez dos distintos estados de maturação das 4 espécies estudadas. Em termos médios, com exceção da *Tem* no L1, verifica-se um aumento de pH no período pós-germinativo. No *tzg*, a *Vap* e a *Lrn* apresentaram para os lotes 1 e 2 os valores de pH mais reduzidos. No entanto, foram as espécies que exibiram maior aumento na passagem para a fase germinativa. De acordo com Shoemaker e Carlson [91], não é conhecido o pH ótimo para as sementes postas a germinar em locais delimitados, embora seja recomendado um valor entre 5,2 a 6. O intervalo apresentado pelos autores está de acordo com o pH obtido nas sementes em processo germinativo dos lotes das 4 espécies, já que os valores apresentados foram superiores a 5,2 e inferiores a 5,92. Quanto ao estado de maturação, as espécies *Myr*, *Vap* e *Tem* exibem menor pH no L2, ao contrário da *Lrn*, que apresenta um valor superior para os lotes L2 e L3 após o período germinativo.

**Tabela 15:** Valores médios de pH e acidez (%) das 4 espécies em estudo  $\pm$  desvio-padrão.

Amostra	pH	Acidez	Amostra	pH	Acidez
L1Myr tzg	5,26 $\pm$ 0,00	3,04 $\pm$ 0,07	L1Tem tzg	5,92 $\pm$ 0,00	10,48 $\pm$ 0,35
L2Myr tzg	5,17 $\pm$ 0,00	2,36 $\pm$ 0,09	L2Tem tzg	5,83 $\pm$ 0,00	10,30 $\pm$ 0,53
L1Myr mtg	5,57 $\pm$ 0,01	1,52 $\pm$ 0,05	L1Tem mtg	5,91 $\pm$ 0,00	14,32 $\pm$ 0,00
L2Myr mtg	5,54 $\pm$ 0,00	1,31 $\pm$ 0,09	L2Tem mtg	5,87 $\pm$ 0,00	13,97 $\pm$ 0,17
L1Vap tzg	4,66 $\pm$ 0,00	4,65 $\pm$ 0,29	L1Lrn tzg	4,52 $\pm$ 0,00	6,55 $\pm$ 0,26
L2Vap tzg	4,22 $\pm$ 0,00	4,37 $\pm$ 0,17	L2Lrn tzg	4,45 $\pm$ 0,00	6,46 $\pm$ 0,17
L1Vap mtg	5,67 $\pm$ 0,00	6,11 $\pm$ 0,17	L1Lrn mtg	5,48 $\pm$ 0,01	7,16 $\pm$ 0,17
L2Vap mtg	5,61 $\pm$ 0,01	6,02 $\pm$ 0,26	L2Lrn mtg	5,52 $\pm$ 0,00	5,85 $\pm$ 0,26
			L3Lrn tzg	5,06 $\pm$ 0,00	4,63 $\pm$ 0,09
			L3Lrn mtg	5,21 $\pm$ 0,01	3,49 $\pm$ 0,17

Quanto à acidez titulável, verifica-se que a *Tem* é a espécie que apresenta maior valor e a *Myr* a que exibe os valores menores para todas as amostras analisadas. Comparando os dois lotes, observa-se uma redução da acidez na totalidade das amostras com maturação mais avançada. Esta diminuição sugere uma redução da atividade metabólica anaeróbica nos estágios de maior maturação, resultado da menor atividade enzimática responsável pela produção do ácido láctico, indicando um metabolismo mais eficiente [60]. Relativamente à passagem do período pré-germinativo para a fase germinativa, verifica-se um decréscimo nas espécies *Myr* (em ambos os lotes) e *Lrn* (Lotes 2 e 3).

#### 7.4.6. Metabolismo das sementes

##### 7.4.6.1. Atividade enzimática

Na determinação da atividade da peroxidase nas amostras de *Tem* foi necessário aumentar o volume para 5 mL com solução tampão, devido à grande viscosidade do extrato. Nas amostras desta espécie as absorvâncias atingiram valores superiores a 3,0, tendo sido necessário diluir o sobrenadante, em consequência da rápida oxidação da benzidina, e reduzido o tempo de medição da variação da absorvância (atividade da peroxidase) para 2 minutos.

A MDH e a peroxidase apresentaram, de um modo geral, um aumento da atividade no período pós-germinativo quando comparado com o estado pré-germinativo (Tabela 16). Na espécie *Lrn* verifica-se o oposto, ou seja, uma redução acentuada da atividade durante a germinação, apresentando, inclusivamente, total inatividade da peroxidase nos lotes 1 e 2. Esta situação deve-se ao carácter recalcitrante da espécie que levou à perda da totalidade do material durante a germinação com vista a determinar a atividade enzimática.

Comparando as duas enzimas, verifica-se que a MDH apresenta maior atividade que a peroxidase para todas as espécies estudadas. No período pré-germinativo a MDH mantém o

metabolismo celular reduzido, essencial à atividade vital das sementes, através do ciclo do ácido tricarboxílico. Durante a germinação e crescimento inicial das plântulas, a MDH desempenha um papel importante no fornecimento de energia para as diversas reações metabólicas, incluindo o metabolismo dos hidratos de carbono, aminoácidos e lípidos [44]. As peroxidases protegem as sementes de stresses oxidativos, essencial no período pré-germinativo para a manutenção da viabilidade até ao início do processo germinativo. As enzimas decompõem o  $H_2O_2$  em água e oxigénio, reduzindo os danos oxidativos nas sementes. Produzem igualmente radicais OH a partir do  $H_2O_2$ , importantes na regulação do desenvolvimento do eixo embrionário durante a germinação de sementes [45, 46] .

**Tabela 16:** Evolução da atividade enzimática da MDH e Peroxidase nas 4 espécies estudadas. Resultados apresentados em UC/g peso fresco sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Amostra	MDH	Peroxidase	Amostra	MDH	Peroxidase
L1Myr tzg	1,68 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,00	L1tem tzg	260,24 $\pm$ 0,89	14,68 $\pm$ 0,14
L2Myr tzg	2,29 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,00	L2tem tzg	214,59 $\pm$ 0,90	17,27 $\pm$ 0,14
L1Myr mtg	1,94 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,00	L1tem mtg	268,96 $\pm$ 0,76	16,06 $\pm$ 0,05
L2Myr mtg	2,53 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,00	L2tem mtg	295,88 $\pm$ 0,94	25,44 $\pm$ 0,10
L1Vcp tzg	10,76 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,00	L1Lrn tzg	53,37 $\pm$ 0,81	0,5 $\pm$ 0,00
L2Vcp tzg	54,32 $\pm$ 0,27	0,02 $\pm$ 0,00	L2Lrn tzg	56,68 $\pm$ 0,81	0,49 $\pm$ 0,00
L1Vcp mtg	82,33 $\pm$ 0,88	0,09 $\pm$ 0,00	L1Lrn mtg	13,79 $\pm$ 0,05	0 $\pm$ 0,00
L2Vcp mtg	155,27 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,00	L2Lrn mtg	7,07 $\pm$ 0,05	0 $\pm$ 0,00
			L3Lrn tzg	104,49 $\pm$ 0,20	2,29 $\pm$ 0,04
			L3Lrn mtg	108,16 $\pm$ 0,15	2,7 $\pm$ 0,01

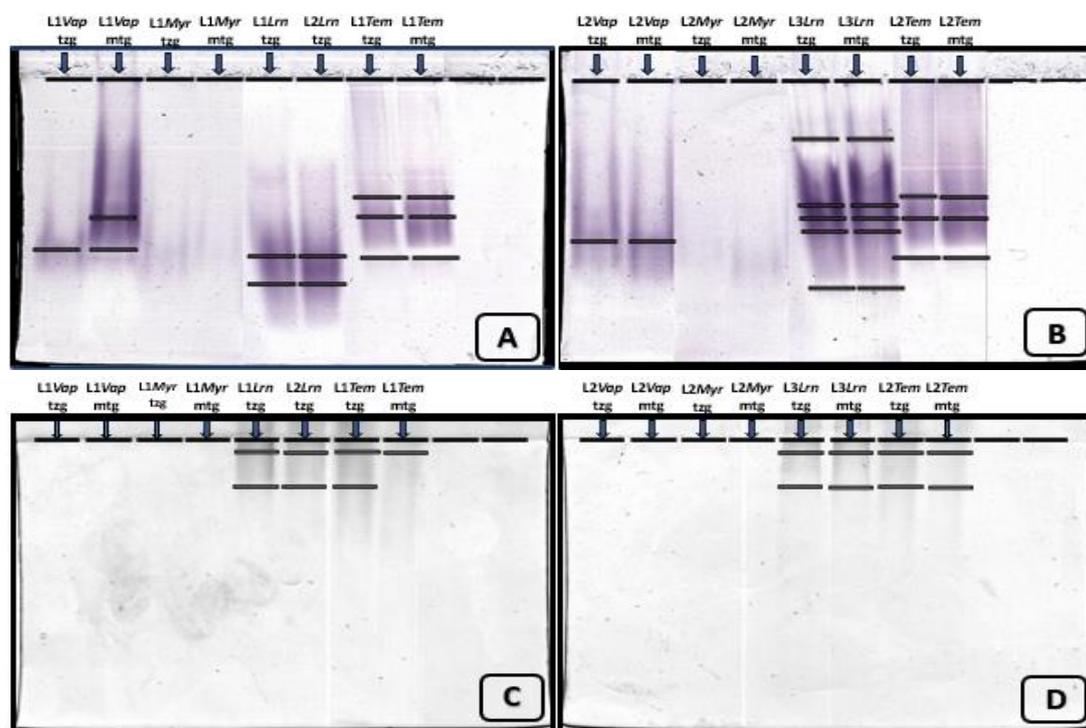
Quanto ao estado de maturação, observou-se um incremento da atividade da MDH no estado de maturação mais avançado da *Myr* e *Vap*, ao contrário da *Tem*, que apresentou uma redução na atividade da enzima. Analisando o comportamento da peroxidase, observa-se uma baixa atividade em todas as amostras, ainda que com um ligeiro aumento no estado de maturação mais avançado das espécies, com exceção da *Myr*.

#### 7.4.6.2. Eletroforese e revelação

Para detetar a presença de padrões isoenzimáticos da MDH e peroxidase nas amostras em estudo, realizou-se uma eletroforese em poliacrilamida (NATIVE-PAGE). Os resultados não foram totalmente satisfatórios, uma vez que obteve-se, em algumas amostras, bandas que não estavam inteiramente perceptíveis, o que dificultou a sua deteção e correspondente análise da intensidade. Apesar da ausência de referências bibliográficas específicas para as espécies em estudo, efetuou-se alterações ao procedimento experimental, nomeadamente, aumento da

concentração das amostras e alteração da concentração do gel de poliacrilamida. Contudo, não foram obtidas alterações significativas, mantendo-se a separação eletroforética das isoenzimas em gel de poliacrilamida (NATIVE-PAGE) a 6.5%, segundo Hames [83]. Ao analisar os eletroforegramas obtidos (Figura 25), observa-se, em termos globais, alguma variação no padrão de bandas da MDH, ao contrário da peroxidase, que manteve praticamente inalterada a separação das frações ativas nas amostras de cada espécie, independentemente do estado de maturação e da condição germinativa (exceção do L1*Tem* mtg que apresentou 1 banda, ao contrário dos restantes lotes que exibiram 2). A manutenção das bandas na peroxidase poderá indicar que a expressão e atividade da enzima permanece relativamente constante ao longo dos diferentes estágios do desenvolvimento das sementes, contribuindo da mesma forma para os processos metabólicos essenciais como a proteção contra stresses oxidativos ou regulação do desenvolvimento embrionário.

Não se observaram bandas nas amostras da espécie *Myr* em ambas as enzimas e na *Vap* para a peroxidase, apesar dos vários ensaios realizados no sentido de identificar eletroforéticamente as frações ativas. A ausência de bandas está em conformidade com a atividade enzimática reduzida ou praticamente nula obtida nas amostras referidas (Tabela 16), o que poderá dificultar a identificação das mesmas na eletroforese.



**Figura 25:** Eletroforese em poliacrilamida (NATIVE PAGE) com a revelação do padrão enzimático obtido nas amostras das 4 espécies estudadas: A e B – perfis enzimáticos da MDH; C e D – perfis enzimáticos da peroxidase.

Comparando o t<sub>z</sub>g com o m<sub>t</sub>g, observa-se o mesmo padrão enzimático em ambos os estados germinativos, à exceção da *Vap* para a MDH (1 e 2 bandas para t<sub>z</sub>g e m<sub>t</sub>g, respetivamente) e da *Tem* para a peroxidase (1 e 2 bandas para m<sub>t</sub>g e t<sub>z</sub>g, respetivamente), ambas no L1. Para a *Lrn* foram obtidas 2 bandas no t<sub>z</sub>g (lotes L1 e L2). Não foi realizada a eletroforese para a espécie em ambos os lotes no m<sub>t</sub>g, uma vez que as sementes apresentavam um avançado estado de degradação após serem submetidas ao processo germinativo. Já no L3 (sementes recolhidas no ano subsequente), observou-se um padrão enzimático com 5 bandas em ambos os estados germinativos.

### 7.5. Análise global dos ensaios realizados

Neste capítulo pretende-se avaliar e comparar, por espécie, os resultados obtidos nos distintos ensaios realizados para melhor compreender a fenologia e bioquímica de germinação das 4 espécies em estudo.

Comparando a totalidade dos ensaios germinativos, constata-se, em termos gerais, há existência de diferenças significativas em todas as espécies. O estado de maturação, local onde decorreram os ensaios e as condições edafoclimáticas, foram fatores que influenciaram as taxas de germinação obtidas. Apesar das principais reservas de armazenamento ocorrerem na maioria das sementes, a concentração relativa de cada uma varia consideravelmente entre as diferentes espécies e dentro da mesma espécie, uma vez que os fatores ambientais poderão influenciar a variação da composição, alterando consideravelmente o valor da massa seca das sementes [47, 41, 50] e, conseqüentemente, condicionando a germinação.

No JB e M, a temperatura e tempo térmico apresentaram, em média, valores mais elevados. Já a humidade relativa do ar foi superior no PP e PM. A T. méd. obteve no JB 4,21°C e 5,38°C superior ao verificado no PP e PM, respetivamente, e a M apresentou mais 3,94°C e 5,11°C que o valor obtido no PP e PM, respetivamente; o TT obteve no JB, 450,46°Cd e 570,58°Cd superior ao exibido no PP e PM, respetivamente, e a M obteve mais 271,33°Cd e 391,45°Cd relativamente aos valores aferidos no PP e PM, respetivamente. Já a H. méd. apresentou no PP 15,04%*Hr* e 20,92%*Hr* superior aos valores aferidos na M e JB, respetivamente, e o PM obteve 18,38%*Hr* e 24,26%*Hr* mais levada que a M e JB, respetivamente.

Quanto às duas etapas germinativas, TxG<sub>50</sub> e TxG<sub>100</sub>, observa-se, em termos globais, que os resultados obtidos em campo apresentaram um comportamento semelhante às taxas alcançadas em estufa, ou seja, uma TxG<sub>50</sub> limitada para a generalidade das espécies, independentemente do local e dos substratos testados, mas que evidencia uma melhoria

significativa até atingir a  $TxG_{100}$ . Apenas as espécies *Vap* e *Tem* exibem em estufa taxas germinativas muito próximas nos dois períodos referidos, indicando uma germinação mais eficiente na  $TxG_{50}$ , embora ambas as espécies apresentem, globalmente, sucesso germinativo muito restrito. Quanto aos ensaios realizados em laboratório, o controlo das variáveis climáticas associado aos tratamentos efetuados às sementes, permitiu aproximar as taxas de germinação nas duas etapas germinativas, com exceção da *Lrn*, independentemente dos pré-tratamentos germinativos realizados.

### 7.5.1. *Myrica faya*

Relativamente à caracterização dos lotes (número de sementes por quilograma, peso de 1000 sementes, análise biométrica) observa-se, em média, uniformidade dos parâmetros analisados para os dois estados de maturação estudados. Quanto ao processo de absorção de água em atmosfera saturada, observa-se a partir das 48h uma estabilização na embebição e, às 72h, os lotes apresentavam 30,73% e 31,60% para L1 e L2, respetivamente.

O processo germinativo da espécie em estufa foi demorado e indefinido no tempo, persistindo a incerteza quanto ao término da atividade germinativa. Dos três substratos testados, o STP obteve a melhor taxa de germinação, variando entre os 60,67% e os 60,00% para L1 e L2, respetivamente. O período de maior sucesso germinativo ocorreu entre as semanas 12 e 21 para todos os substratos. A  $TxG_{50}$  apresentou uma taxa de germinação reduzida em todos os substratos, ainda que o STP exiba valores ligeiramente superiores. Segundo a análise das correlações de Pearson, a  $TxG_{100}$  apresentou correlações positivas com a  $TxG_{50}$ , Ca, Mg, Zn e Fe ( $p \leq 0,05$ ), negativas com MO e CT ( $p \leq 0,05$ ), positiva com CTC e negativa com pH e Na ( $p \leq 0,01$ ). O teste *one-way* ANOVA revelou que o substrato apresenta diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ), quer para a  $TxG_{50}$ , quer para a  $TxG_{100}$ . Através do teste de comparação múltipla de Tukey HSD, verificou-se que, para a  $TxG_{50}$ , o substrato que contribuiu para as diferenças observadas foi o STP por ser o único a isolar-se; já na  $TxG_{100}$ , todos os substratos contribuíram igualmente para as diferenças verificadas, uma vez que se isolaram em grupos distintos (anexo I).

Quanto aos ensaios em campo, constata-se um sucesso germinativo limitado em todos os locais estudados (abaixo dos 42%), embora apresente uma ligeira melhoria na M e JB (variou entre os 36,67% e o 36% para L1M e L2M, respetivamente, e entre os 35,33% e os 41,33% para L1JB e L2JB, respetivamente). A maior taxa de germinação foi alcançada entre as semanas 15 a 21. A  $TxG_{50}$  exibiu um sucesso germinativo muito limitado ou nulo. A  $TxG_{100}$  apresenta uma correlação positiva com a  $TxG_{50}$  e T. méd ( $p \leq 0,05$ ), positiva com o

local e negativa com H.méd. ( $p \leq 0,01$ ). O teste *one-way* ANOVA revela que a germinação não apresenta diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) relativamente aos lotes, ao contrário do local, que exibe diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ). Os locais que mais contribuíram para as diferenças observadas foram o PP e o JB (anexo II).

Nos ensaios em laboratório, apesar dos cuidados adotados e das desinfecções efetuadas para evitar possíveis contaminações, verificou-se a presença constante de contágios nas placas de Petri. As sementes desta espécie sofreram desde os primeiros dias ataques de fungos, pelo que houve a necessidade de eliminar as modalidades germinativas Ef e As (embora se observe alguma germinação até à 17ª semana para as sementes colocadas em As). As sementes foram submetidas a um banho em ultrassons e colocadas novamente a germinar. No entanto, o tratamento não teve a eficácia desejada, levando ao reaparecimento dos contágios. Este ressurgimento pode dever-se à morfologia da semente (completamente irregular) que facilitou a manutenção dos contágios durante o tratamento. Quanto às sementes tratadas com GA<sub>3</sub>, a taxa de germinação foi superior ao verificado em campo e estufa variando entre os 66,67% no L1 e os 62,67% no L2. A TxG<sub>50</sub> apresentou igualmente um sucesso germinativo superior ao verificado nos ensaios realizados em campo e em estufa: 48% e 40% para L1 e L2, respetivamente. O sucesso germinativo das sementes submetidas ao pré-tratamento evidencia a eficácia do ácido giberélico na promoção da germinação. A análise da correlação de Pearson aos dois parâmetros germinativos evidenciou a presença de interligações significativas com os pré-tratamentos e a não existência de qualquer tipo de inter-relação com os lotes. Ambos os parâmetros apresentaram uma correlação significativa e positiva entre si e negativa com os pré-tratamentos, com  $p \leq 0,01$ . Assim sendo, para os tratamentos pré-germinativos, a *Myr* apresentou diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ), quer para a TxG<sub>50</sub>, quer para a TxG<sub>100</sub>. No entanto, como supracitado anteriormente, os ensaios efetuados com os pré-tratamentos Ef e As não culminaram o processo germinativo, comprovado nos valores exibidos nas tabelas da comparação múltipla de Tukey, pelo que não deverão ser considerados (anexo III).

Comparando os dois lotes estudados e os distintos ensaios germinativos realizados, não foram observadas evidências que comprovem a influência do estado de maturação no processo germinativo da espécie.

Quanto às cinzas, a espécie apresentou um teor total inicial de 1,83 g/100g MS (L1, tzg) e 1,87 g/100g MS (L2, tzg), reduzindo, durante o processo germinativo, para 1,72 g/100g MS (L1, mtg) e 1,79 g/100g MS (L2, mtg). Em termos de composição mineral, observa-se, durante o processo germinativo, uma diminuição para todos os macro e micronutrientes. O

azoto, potássio, ferro, cobre, zinco e manganês apresentaram um aumento do teor mineral para o estado de maturação mais avançado. O fósforo, cálcio e magnésio mantiveram igual valor para os dois lotes (L1 e L2).

Já no que se refere à mobilização das principais substâncias de reserva durante a germinação, a espécie apresentou um decréscimo em todas as análises efetuadas. Em termos médios, a redução dos açúcares solúveis face ao teor inicial foi de 75,70% (L1) e 43,51% (L2), o amido de 73,03% (L1) e 81,65% (L2), os lípidos de 16,01% (L1) e 10,42% (L2), e a proteína bruta de 1,71% (L1) e 8,59% (L2). À exceção dos açúcares solúveis, as substâncias de reserva apresentaram valores superiores no estado de maturação mais avançado.

Relativamente ao pH e à acidez titulável, o L1 exibiu um valor superior ao L2. Durante a etapa germinativa, observou-se um aumento do pH e uma diminuição da acidez titulável. Os valores obtidos mostram que a espécie necessita de um ambiente mais ácido e apresenta maior eficiência energética durante o processo germinativo, consequência da redução do ácido láctico.

Quanto à atividade enzimática, as duas enzimas analisadas apresentaram valores limitados para ambos os estados de maturação das sementes. Ainda assim, a MDH exibiu uma atividade inicial de 1,68 UC/g peso fresco (L1, tzg) e 2,29 UC/g peso fresco (L2, tzg), aumentando durante o processo germinativo para 1,94 UC/g peso fresco<sup>1</sup> (L1, mtg) e 2,53 UC/g peso fresco (L2, mtg). Já a peroxidase obteve uma atividade muito restrita para todas as amostras. Tal como referenciado precedentemente, na eletroforese em poliácridamida, não foram detetadas bandas para ambas as enzimas. A ausência de bandas está em conformidade com a atividade enzimática reduzida ou praticamente nula obtida nas amostras referidas, o que poderá dificultar a identificação das mesmas na eletroforese.

A análise da correlação de Pearson efetuada aos parâmetros bioquímicos indicaram que o tempo germinativo (tzg e mtg) exibe uma correlação significativa positiva com o K ( $p \leq 0,05$ ), positiva com a peroxidase e pH ( $p \leq 0,01$ ), negativa com o Ca, Mg, Fe, Mn, açúcares, amido, acidez e cinzas ( $p \leq 0,01$ ). O teste *one-way* ANOVA revelou para os dois lotes a existência de diferenças significativas para com o N e Cu ( $p \leq 0,05$ ), e diferenças altamente significativas para a proteína e MDH ( $p \leq 0,01$ ). As cinzas, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, açúcares, amido, pH, acidez e a peroxidase não apresentaram diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ). Relativamente ao tempo germinativo verificou-se a existência de diferenças significativas para as cinzas e K ( $p \leq 0,05$ ), e altamente significativas para peroxidase, Ca, Mg, Fe, Mn, açúcares, amido, pH e acidez ( $p \leq 0,01$ ). O N, P, Cu, Zn, lípidos, proteína e a MDH não apresentaram diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) (anexo IV).

### 7.5.2. *Vaccinium padifolium*

A espécie apresenta um considerável número de sementes por quilograma (L1 - 1.353.588 e L2 - 1.350.793). Comparando os dois estados de maturação, constata-se que o L2 apresenta maior dimensão, menor número de sementes por quilograma, maior peso (por 1000 sementes) e maior capacidade de absorção de água quando colocadas em atmosfera saturada. Após 24h o L1 já apresentava 30,53% e o L2 33,81%. Na passagem das 48h para as 72h verificou-se uma ligeira perda de humidade: o L1 passou de 32,96% para os 31,02% e o L2 de 35,64% para 34,27%.

A espécie exibiu uma reduzida taxa de germinação em campo. Os melhores resultados foram obtidos no JB (5,07% e 14,14% para o L1 e L2, respetivamente), seguida da M (10,61% e 15,50% para L1 e L2, respetivamente). A germinação foi gradual ao longo do tempo de permanência dos ensaios, não exibindo períodos de significativo aumento. A  $TxG_{50}$  obteve uma taxa mínima ou nula. A taxa no fim do período germinativo apresenta uma correlação positiva com o local e com a  $TxG_{50}$  ( $p \leq 0,05$ ), positiva com a T.méd. e TT, e negativa com a H.méd. ( $p \leq 0,01$ ). Segundo o teste *one-way* ANOVA a taxa de germinação não apresenta diferenças significativas relativamente aos lotes ( $p \geq 0,05$ ). Já o local exibe diferenças altamente significativas com a mesma taxa ( $p \leq 0,01$ ). Através do teste de Tukey HSD verificou-se que para a  $TxG_{100}$ , o PP e PM são semelhantes, distinguindo-se do JB e M, igualmente semelhantes entre si (anexo II).

Em estufa, a percentagem de sucesso germinativo foi superior ao verificado em campo, ainda assim, reduzida. Os substratos STP e *SCrj* (L2) exibiram os melhores resultados (26,72% e 33,86% para L2*SCrj* e L2STP, respetivamente). Os 2 substratos no lote 2 apresentaram um exponencial aumento da germinação entre as semanas 9 a 18. A espécie exibiu taxas germinativas muito próximas nos dois períodos germinativos, indicando uma germinação eficiente na  $TxG_{50}$ . Segundo a análise das correlações de Pearson a espécie apenas apresenta uma correlação negativa entre a  $TxG_{50}$  e  $TxG_{100}$  ( $p \leq 0,01$ ). O teste *one-way* ANOVA revelou a existência de diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) de ambos os parâmetros germinativos relativamente aos lotes. Os substratos apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) para ambos os parâmetros. Através do teste de Tukey HSD, verificou-se que a  $TxG_{50}$  e a  $TxG_{100}$  apresentaram um comportamento semelhante: o *SCrj* exibiu similaridade com o SL e com o STP, e este último, por sua vez, distinguiu-se do SL (anexo I).

Neste trabalho utilizou-se, na germinação da *Vap*, um substrato recolhida do interior de um povoamento de *C. japonica*, uma vez que a espécie requer solos preferencialmente ácidos, bem drenados e ricos em matéria orgânica [19] e, segundo Dias et al.[17], a *C. japonica* é uma

conífera que não aumenta significativamente a acidez do solo, evitando desta forma o uso de substâncias húmicas fracas. Comprova-se aqui a potencialidade daquele tipo de material, já que o substrato *SCrj* exibiu a segunda melhor taxa de germinação em estufa, no entanto, destacou-se como o melhor substrato por promover um maior desenvolvimento das plântulas (em média, 25%).

Na globalidade dos ensaios efetuados os melhores resultados foram obtidos em laboratório. Apesar da dificuldade em manusear as sementes de *Vap*, consequência das suas reduzidas dimensões, os ensaios apresentaram taxas de germinação muito significativas. O sucesso germinativo variou entre os 74% (L1, Fr) e os 81,67% (L2, Sn). Uma vez que as sementes de *Vap* poderiam perder facilmente a capacidade germinativa, resultado da rápida diminuição da humidade, os 3 ensaios realizados em laboratório demonstraram que as sementes, mesmo após um processo de dessecação a 15% de humidade, conservam uma boa taxa de viabilidade, desde que devidamente humedecidas antes da inoculação destas em suportes de germinação. A análise da correlação de Pearson aos dois parâmetros germinativos evidenciou a presença de interligações significativas com os pré-tratamentos e a não existência de qualquer tipo de inter-relação com os lotes. A  $TxG_{50}$  apresenta uma correlação negativa com os pré-tratamentos e positiva com a  $TxG_{100}$  ( $p \leq 0,01$ ); a  $TxG_{100}$  apresenta exclusivamente uma correlação positiva com a  $TxG_{50}$ . Segundo o teste *one-way* ANOVA, o pré-tratamento apresentou diferenças altamente significativas para a  $TxG_{50}$  ( $p \leq 0,01$ ) e significativas para a  $TxG_{100}$  ( $p \leq 0,05$ ). Através do teste de Tukey HSD verificou-se que, para a  $TxG_{50}$ , o pré-tratamento que contribuiu para as diferenças observadas foi o Fr por ser o único a isolar-se; na  $TxG_{100}$ , o As apresentou similaridade com o Fr e com o Sn, e este último, por sua vez, distinguiu-se do Fr, não se verificando nenhum pré-tratamento que se isole dos restantes.

A comparação dos lotes testados permite verificar que, na espécie, o estado de maturação da semente influencia os resultados alcançados. No final da etapa germinativa, o L2 obteve, em todos os ensaios realizados, uma percentagem de germinação mais elevada quando comparada com o L1 (anexo III).

Relativamente às cinzas, a espécie apresentou um teor total inicial de 3,66 g/100g MS (L1, tzg) e 3,78 g/100g MS (L2, tzg), reduzindo, durante a etapa germinativa, para 3,39 g/100g (L1, mtg) e 3,72 g/100g MS (L2, mtg). À exceção do ferro no L1, todos os elementos minerais analisados que compõem as cinzas apresentaram maior teor durante o processo germinativo. Tal como sucede com a *Vap*, a *Lrn* apresenta um aumento da composição de diversos minerais durante a etapa germinativa, no entanto, não foi possível comparar a composição mineral das

espécies em estudo com outros trabalhos publicados (por ausência destes). A maior concentração de minerais observada durante o processo germinativo deverá estar relacionada com a degradação do ácido fítico. Este antinutriente tem a capacidade de se ligar a cátions através de associações iônicas para formar um sal. Durante a germinação, a fitina é hidrolisada por ação da enzima fitase, levando ao aumento da disponibilidade dos minerais, como os macro e micronutrientes presentes nas amostras referidas [40, 60, 93]

Quanto à mobilização das principais substâncias de reserva, o teor em açúcares solúveis, amido e lípidos totais apresentaram um decréscimo. Em termos médios, o teor de açúcares utilizado durante a germinação foi de 39,31% (L1) e 35,79% (L2), o amido de 73,68% (L1) e 74,11% (L2) e os lípidos de 13,83% (L1) e 3,14% (L2). Já a proteína bruta obteve um aumento de 109,67% e 415% para o L1 e L2, respetivamente. Tal como referido anteriormente, o aumento do conteúdo proteico nas sementes germinadas deve-se à limitação da atividade do fitato e dos inibidores da tripsina durante as reações de hidrólise [89].

Relativamente ao pH e à acidez titulável das amostras, o L1 apresentou um valor mais alto que o L2 no período pré-germinativo. Durante a germinação observou-se um aumento do pH e acidez. Nesta etapa o L2 exibiu um valor inferior ao L1 para ambas as variáveis.

No que se refere à atividade enzimática, a MDH apresentou um valor superior no estado de maturação mais avançado. Durante a etapa germinativa, a espécie exibiu um aumento exponencial da atividade da enzima. Apresentou um valor inicial de 10,76 UC/g peso fresco (L1, tzg) e 54,32 UC/g peso fresco (L2, tzg), aumentando durante a germinação para 82,33 UC/g peso fresco (L1, mtg) e 155,27 UC/g peso fresco (L2, mtg). Já a peroxidase exibiu uma atividade limitada para ambos os estados de maturação das sementes. Não foram detetadas bandas na eletroforese para a enzima referida. Tal como observado na espécie anterior, a atividade restrita da peroxidase deverá estar na origem da não deteção de bandas na eletroforese. Para a MDH observou-se a presença de 2 isoenzimas distintas. Obteve-se 1 banda para os lotes L1 (tzg), L2 (tzg) e L2 (mtg), e 2 bandas para o lote L1 (mtg). Uma das bandas localiza-se na mesma posição para todos os lotes.

Relativamente aos parâmetros bioquímicos, a correlação de Pearson indicou para o tempo germinativo a presença de uma relação significativa e positiva ( $p \leq 0,01$ ) com as cinzas, N, P, Ca, Mg, Zn, Mn, MDH, peroxidase, pH, acidez e proteína, e negativa ( $p \leq 0,01$ ) com os açúcares e amido. Relativamente aos lotes, o teste *one-way* ANOVA revelou apenas a existência de uma diferença altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) para o Fe. Já para o tempo germinativo, constatou-se a presença de diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) para os

açúcares, cinzas, N, P, K, Ca, Mg, Zn, Mn, amido proteína, pH, acidez, MDH e a peroxidase (anexo IV).

### 7.5.3. *Teline maderensis*

Relativamente aos dois estados de maturação, o L1 apresentou menor número de sementes por quilograma, maior dimensão e capacidade de absorção de água. A espécie apresentou para os dois lotes uma capacidade de embebição bastante restrita (variou entre os 15% inicial e os 16,53% no L1, e os 15,82% no L2), exibindo, inclusivamente, uma perda de humidade no período compreendido entre as 48h e as 72h.

A caracterização dos lotes obtida contraria, em parte, as restantes espécies. Esta deverá estar associada à colheita de sementes no estado de maturação mais avançado, uma vez que foram observados muitos exemplares da espécie atacados por larvas de lepidópteros, o que dificultou a recolha de sementes de qualidade e em quantidade suficiente para proceder aos ensaios programados, inviabilizando, em parte, uma triagem de forma adequada por falta de material genético. De acordo com o catálogo de entomofauna do Arquipélago da Madeira e das ilhas Selvagens de Aguiar e Karsholt [94], estão identificadas várias larvas da ordem Lepidoptera que se alimentam da *Tem*, algumas das quais em exclusividade daquela espécie. Assim sendo, a percentagem de germinação do Lote 2 poderá ter sofrido alguma perturbação.

O sucesso germinativo da espécie em campo foi muito limitado em todos os locais estudados (abaixo dos 17%). Ainda assim, apresenta uma ligeira melhoria na M e JB (variou entre os 12,67% e os 9,33% para L1M e L2M, respetivamente, e entre os 16,67% e os 16,33% para L1JB e L2JB, respetivamente). A germinação foi gradual ao longo do tempo de permanência dos ensaios, não exibindo períodos de significativo aumento. A TxG<sub>50</sub> apresentou um sucesso germinativo muito limitado. Segundo a análise da correlação de Pearson, a TxG<sub>100</sub> apresenta uma correlação positiva com o local, TxG<sub>50</sub> e T.méd., e negativa com a H.méd. ( $p \leq 0,01$ ). O teste *one-way* ANOVA revela que a germinação não apresenta diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) relativamente aos lotes, ao contrário do local, que exhibe diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ). Através do teste de Tukey HSD, verificou-se que para a TxG<sub>100</sub>, o PP e o PM mostraram similaridade entre si, a M e o JB destacaram-se entre si e dos restantes locais (anexo II).

Em estufa, a percentagem de sucesso germinativo foi superior ao verificado em campo, embora apresente valores igualmente reduzidos. O SL obteve os melhores resultados para ambos os lotes (variou entre os 16,67% e os 16,33% para L1 e L2, respetivamente), ainda que as taxas de germinação obtidas estejam muito próximas nos ensaios realizados nos

três substratos. A TxG<sub>50</sub> apresentou um sucesso germinativo superior a 50% em todos os substratos. A análise da correlação de Pearson apresenta para a TxG<sub>100</sub> uma interligação negativa com P e Zn ( $p \leq 0,05$ ), negativa e com o solo, Ca, Mg e CTC ( $p \leq 0,01$ ). O teste *one-way* ANOVA revelou a não existência de diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) relativamente aos lotes. Quanto aos substratos, a espécie apresentou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) para a TxG<sub>50</sub> e diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) com a TxG<sub>100</sub>. Segundo o teste de Tukey HSD, verificou-se que, para a TxG<sub>50</sub>, o SL apresentou similaridade com o STP e com o SAT e, este último, por sua vez, distinguiu-se do STP. Na TxG<sub>100</sub>, o STP foi o único substrato a isolar-se (anexo I).

Observou-se em laboratório que os pré-tratamentos aceleram o processo germinativo e que as sementes, independentemente do estado de maturação, quando colocadas em H<sub>2</sub>O a 100°C, apresentam inicialmente uma germinação inferior, mas que, no final do ensaio, exibem praticamente o mesmo sucesso das sementes submetidas à digestão ácida. Os dois testes referidos apresentam uma taxa de germinação significativamente superior ao ensaio em que as sementes foram apenas colocadas em embebição, o que demonstra a potencialidade da utilização dos dois tipos de pré-tratamentos para quebrar a dormência tegumentar da espécie. O sucesso germinativo obtido variou entre os 71,11% e os 73,33 para H<sub>2</sub>O (100°C), e entre os 73,33 e os 74,44% para H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A espécie exibiu taxas muito próximas nos dois períodos germinativos, indicando maior eficiência na TxG<sub>50</sub>. A análise da correlação de Pearson aos parâmetros germinativos evidenciou a presença de interligações significativas com os pré-tratamentos e a não existência de qualquer tipo de inter-relação com os lotes. Ambos os parâmetros apresentam uma correlação significativa positiva forte ( $p \leq 0,01$ ) entre si e com os pré-tratamentos germinativos. Segundo a análise *one-way* ANOVA os parâmetros germinativos apresentam para com os tratamentos pré-germinativos diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ), quer para a TxG<sub>50</sub>, quer para a TxG<sub>100</sub>. Segundo o teste de Tukey HSD, verificou-se que, para ambos os parâmetros germinativos, o pré-tratamento que contribuiu para as diferenças observadas foi o As, por ser o único grupo a isolar-se dos restantes (anexo III).

Comparando os dois lotes estudados, não foram observadas evidências que comprovem a influência do estado de maturação no processo germinativo da espécie.

As cinzas apresentaram um teor total inicial de 6,82 g/100g MS (L1) e 6,84 g/100g MS (L2), reduzindo, durante a etapa germinativa, para 6,50 (L1) e 6,62 g/100g MS (L2). Em termos de composição nutricional, observou-se, durante o processo germinativo, uma diminuição dos minerais azoto, fósforo (L2), potássio, cálcio (L1), magnésio, ferro, cobre,

zinco (L1) e manganês (L2). O fósforo (L1) e zinco (L2) mantiveram igual valor, e o manganês (L1) aumentou. Quanto ao estado de maturação, alguns minerais apresentaram um teor mais elevados no L1, ao contrário de outros, que exibiram concentração superior no L2, com exceção do fósforo, cálcio e manganês que permaneceram inalterados.

Já no que se refere à mobilização das principais substâncias de reserva durante a germinação, a espécie apresentou um decréscimo em todas as análises efetuadas. Em termos médios, a redução dos açúcares solúveis face ao teor inicial foi de 35,73% (L1) e 44,32% (L2), o amido de 16,42% (L1) e 25,52% (L2), os lípidos de 7,29% (L1) e 4,99% (L2), e a proteína bruta de 0,90% (L1) e 2,52% (L2). Todas as substâncias de reserva apresentaram valores superiores no estado de maturação mais avançado.

O pH e acidez titulável das amostras apresentaram para o L1 um valor superior ao L2 no período pré-germinativo. Durante etapa germinativa o pH reduziu para o L1 e aumentou para o L2, enquanto a acidez intensificou o teor em ambos os lotes. Os valores apresentados mostram um comportamento germinativo distinto nos dois lotes em termos de necessidade de pH e um aumento das condições anaeróbicas durante a referida etapa.

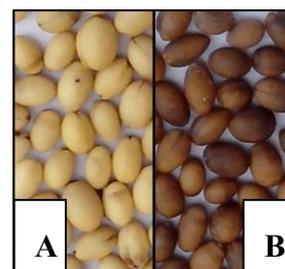
Quanto à atividade enzimática, a MDH apresentou um valor inicial de 260,24 UC/g peso fresco (L1) e 214,59 UC/g peso fresco (L2), e a peroxidase exibiu uma atividade de 14,68 UC/g peso fresco (L1) e 17,27  $\mu\text{mol S min}^{-1}$  (L2). Durante o período germinativo as duas enzimas apresentaram um aumento da atividade para ambos os lotes. Relativamente aos padrões enzimáticos obtidos na eletroforese, observou-se para a MDH a presença de 3 isoenzimas distintas localizadas na mesma posição para todos os lotes. Já a peroxidase obteve um padrão com 2 isoenzimas para os lotes L1 (tzm), L2 (tzm) e L2 (mtg), e apenas uma isoenzima para o L1 (mtg).

A análise da correlação de Pearson dos parâmetros bioquímicos indicaram que o tempo germinativo apresenta uma correlação significativa e negativa com o Cu e Mn ( $p \leq 0,05$ ), negativa com as cinzas, peroxidase, K, Mg, açúcares, amido e proteína ( $p \leq 0,01$ ), positiva com a MDH e acidez ( $p \leq 0,01$ ). O teste *one-way* ANOVA apresentou para os dois lotes a existência de diferenças significativas para o Ca ( $p \leq 0,05$ ), enquanto o Zn e o pH exibiram diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ). Relativamente ao tempo germinativo, detetou-se a existência de diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) para o Mn e Cu; já a proteína, MDH, cinzas, K, Mg, açúcares, amido, acidez e peroxidase apresentaram diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) para as duas variáveis (anexo IV).

#### 7.5.4. *Laurus novocanariensis*

Em termos de caracterização dos lotes, observa-se, para os dois estados de maturação, uniformidade dos parâmetros analisados. Já o processo de absorção de água em atmosfera saturada foi praticamente nulo (0,63% e 0,4% para o L1 e L2, respetivamente). Consequência do carácter recalcitrante da espécie, as sementes foram conservadas à temperatura ambiente, logo, com uma percentagem de água inicial já considerável (Figura 13). Durante todo o processo de embebição, o L1 variou de 36,95% para 37,58% e o L2 de 37,10% para 37,50%.

Neste estudo observou-se a existência de erros na determinação de alguns parâmetros analisados, o que levou à repetição de vários testes. Nos ensaios efetuados com os distintos lotes de sementes ao longo do tempo, obteve-se, gradualmente, uma diminuição da viabilidade, consequência do comportamento recalcitrante da espécie, comprovado pelos problemas intrínsecos às sementes quando colocadas a germinar ao longo do tempo com o propósito de efetuar as análises programadas. Observa-se em várias sementes a presença de embriões danificados 6 meses após a colheita. Na Figura 26 é possível visualizar as alterações ocorridas no fenótipo de um lote de



**Figura 26:** Aspeto das sementes de *Lrn* na colheita (A) e após 6 meses da coleta (B).

sementes 6 meses após a colheita. Para testar o comportamento recalcitrante da espécie, efetuou-se um ensaio germinativo com sementes conservadas numa câmara a 15% de humidade e 15°C de temperatura durante 5 meses, obtendo-se um insucesso germinativo total, consequência da permanência da humidade reduzida. Nos últimos ensaios realizados, as sementes entraram em germinação, mas não terminaram a etapa. Estas apresentavam elevado grau de putrefação, observando-se apenas sementes asquerosas e fétidas. As complexidades referidas foram detetadas particularmente nos testes associados ao metabolismo da espécie (extração da proteína pelo método de Bradford, atividade catalítica das enzimas e eletroforese). Para testar novamente a etapa germinativa da espécie, incluiu-se, nos ensaios bioquímicos, um lote adicional (L3) recolhido no ano subsequente.

A *Lrn* apresentou em campo e em estufa uma considerável taxa de germinação. À exceção do substrato L1AT, observa-se uma aproximação do sucesso germinativo em todos os ensaios, independentemente do local e da variável edáfica testada. Em campo, a taxa de germinação no L1 variou entre 76,67% (PM) e os 86% (JB), e no L2 variou entre 79,33% (PM) e os 88% (M). A espécie obteve um exponencial aumento da germinação entre as semanas 12 e 18 na M e JB, e entre as semanas 18 e 27 para o PP e PM. Quanto à TxG<sub>50</sub>, a espécie apresentou uma germinação significativamente reduzida em todos locais, ainda assim,

superior na M e JB. A análise da correlação de Pearson indicou que a TxG<sub>50</sub> encontra-se positivamente correlacionada com a TxG<sub>100</sub> e com a T.méd ( $p \leq 0,05$ ); a TxG<sub>100</sub> apresenta uma correlação positiva com a TxG<sub>50</sub> ( $p \leq 0,05$ ), positiva com a T.méd. e negativa com a H.méd. ( $p \leq 0,01$ ). Segundo o teste *one-way* ANOVA os dois parâmetros germinativos não apresentaram diferenças significativas relativamente ao lote. Quanto ao local, a TxG<sub>50</sub> apresenta uma diferença altamente significativa ( $p \leq 0,01$ ). Na espécie e para a TxG<sub>50</sub>, a M foi a que mais se distinguiu dos restantes locais por ser o único a isolar-se, o PM é semelhante ao JB e ao PP, e este último, por sua vez, diferiu significativamente do JB (anexo II).

Já em estufa, dos três substratos testados no estudo, o SL apresentou maior sucesso germinativo no L1 (86%) e o STP no L2 (90%). No entanto, todos os substratos exibiram ao longo do tempo um comportamento germinativo similar e, tal como referido anteriormente, à exceção do L1AT, elevadas taxas de germinação. A espécie obteve entre as semanas 12 e 18 um exponencial aumento da germinação, excetuando o L1AT, que apresentou um aumento considerável entre as semanas 12 e 15. A TxG<sub>50</sub>, obteve uma germinação reduzida. Segundo a análise das correlações de Pearson a *Lrn* apresenta uma única correlação significativa positiva com o Fe para a TxG<sub>100</sub> ( $p \leq 0,05$ ). Relativamente ao teste *one-way* ANOVA, não foram detetadas diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) na TxG<sub>50</sub>; já a TxG<sub>100</sub> apresentou diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ). Através do teste de Tukey HSD, verificou-se que o substrato que contribuiu para as diferenças observadas foi o SAT, por ser o único a isolar-se (anexo I).

A *Lrn* demonstrou ser uma espécie que não necessita de pré-tratamentos para eliminar dormências associadas. Comparando com os restantes ensaios, a espécie apresentou um sucesso germinativo muito limitado em laboratório. Das três variáveis testadas, as sementes submetidas à Esc obtiveram os melhores resultados (variou entre os 38,67% e os 40%, para L1 e L2, respetivamente). A análise da correlação de Pearson mostrou que na espécie a TxG<sub>50</sub> e a TxG<sub>100</sub> apresentam unicamente uma correlação positiva entre si ( $p \leq 0,01$ ). Quanto ao teste *one-way* ANOVA, não foram detetadas diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) em ambas as etapas germinativas (anexo III).

Comparando os dois lotes estudados, não foram observadas evidências que comprovem a influência do estado de maturação no processo germinativo da *Lrn*.

Relativamente às cinzas, a *Lrn* apresentou um teor total inicial de 2,02 g/100g MS no L1, 2,15 g/100g MS no L2 e 2,64 g/100g MS no L3, reduzindo, durante a etapa germinativa, para 1,83 g/100g no L1, 1,81 g/100g MS no L2 e 2,0 g/100g MS no L3. Em termos de composição mineral, observa-se, durante a etapa germinativa, uma diminuição do azoto (L2),

fósforo, potássio, magnésio, zinco e manganês (L2). O manganês no L1 permaneceu inalterado e os minerais azoto (L1), cálcio, ferro e cobre aumentaram o teor. Já o L3 exibiu a mesma concentração para o cálcio e zinco, e apresentou uma redução para os restantes minerais. Quanto ao estado de maturação, os macronutrientes apresentaram maior concentração no L2 e, os micronutrientes, exibiram um teor mais elevado no L1 para o ferro, mantendo o valor para o mineral zinco.

Quanto à mobilização das principais substâncias de reserva durante a germinação, a espécie apresentou um decréscimo em todas as análises efetuadas. Em termos médios, a redução dos açúcares solúveis face ao teor inicial foi de 84,43% (L1), 81% (L2) e 7,50% (L3), o amido de 5,65% (L1), 5,61% (L2) e 6,04% (L3), os lípidos 0,63% (L1), 0,92% (L2) e 28,41% (L3), e a proteína bruta 2,05% (L1), 17,63% (L2) e 11,05% (L3). Todas as substâncias de reserva apresentaram valores superiores no estado de maturação mais avançado.

Na determinação do pH das amostras em estudo obteve-se um valor médio inicial de 4,52 (L1), 4,45 (L2) e 5,06 (L3), aumentando durante a etapa germinativa para 5,48 (L1), 5,52 (L2) e 5,21 (L3). A acidez titulável variou entre os 6,55 (L1, tzg) e os 7,16 (L1, mtg), 6,46 (L2, tzg) e os 5,85 (L2, mtg), e entre os 4,63 (L3, tzg) e os 3,49 (L3, mtg). O pH e acidez titulável das amostras apresentaram para o L1 um valor superior ao L2 no período pré-germinativo. Durante a etapa germinativa os valores apresentados mostram um comportamento germinativo distinto nos dois lotes em termos de necessidade de pH e concentração da acidez. O L3 exibe maior eficiência energética, uma vez que obteve os valores mais baixos de acidez.

Na atividade enzimática da espécie, não foram avaliados os lotes L1 e L2 pelos fundamentos apresentados precedentemente. No entanto, observou-se uma atividade inicial para a MDH de 53,37 UC/g peso fresco<sup>1</sup> (L1) e 56,68 UC/g peso fresco (L2). O L3 apresentou uma atividade marcadamente superior, na ordem das 104,49 UC/g peso fresco, aumentando durante a etapa germinativa para 108,16 UC/g peso fresco. Já a peroxidase obteve uma atividade inicial restrita nos lotes L1 e L2. O L3 obteve 2,29 UC/g peso fresco, aumentando, durante o processo germinativo, para 2,7 UC/g peso fresco. Quanto aos padrões enzimáticos obtidos na eletroforese, observou-se para a MDH a presença de 2 isoenzimas para os lotes L1 e L2 (tzg). Foram identificadas 5 isoformas distintas da enzima para o Lote 3 em ambas as etapas germinativas. Já a peroxidase obteve um padrão com 2 isoenzimas para os lotes L1 (tzg), L2 (tzg) e L3. Não foi realizada a eletroforese para os lotes L1 e L2 na etapa germinativa, uma vez que as sementes obtidas nos últimos ensaios não apresentavam

qualquer viabilidade. Segundo Ranganathan et al [26], as sementes recalcitrantes poderão sofrer danos metabólicos e desnaturação macromolecular, levando à perda de viabilidade, consistente com a atividade enzimática obtida.

A análise da correlação de Pearson efetuada aos parâmetros bioquímicos da espécie indicaram que o tempo germinativo exibe uma correlação significativa positiva com o F, amido e peroxidase ( $p \leq 0,05$ ); positiva com o Ca, Fe, Cu e pH ( $p \leq 0,01$ ); negativa com as cinzas, K, açúcares e proteína, ( $p \leq 0,01$ ); e negativa com o amido ( $p \leq 0,05$ ). O teste *one-way* ANOVA apresentou para os três lotes diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) para as cinzas, P, Cu, amido, Mg, Mn, lípidos, acidez, MDH e a peroxidase. Segundo o teste de comparação múltipla de Tukey HSD, na globalidade dos parâmetros, o lote que contribuiu para as diferenças observadas foi o L3; apenas nos lípidos, o L2 distinguiu-se do L1 e L3. Já para o tempo germinativo, o P, amido e a peroxidase apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ), enquanto as cinzas, Cu, K, Ca, Fe, açúcares, proteína e pH apresentaram diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) (anexo IV).

## 8. Conclusão

Dos substratos testados em estufa, STP foi o que apresentou maior sucesso na germinação das espécies *Myr*, *Vap* e *Lrn*, e o SL na *Tem*. A incorporação de misturas de materiais no SAT, como matéria orgânica e componentes que apresentem textura grosseira-média, permite reter a água que fica mais facilmente disponível e assegurar um arejamento adequado, potenciando o uso deste substrato na germinação. Para a espécie *Vap* destaca-se o *SCrj* como o melhor substrato por promover a germinação e maior desenvolvimento nas plântulas. Já a *Lrn* apresentou os melhores resultados em todos os substratos testados, exibindo um sucesso germinativo, em média, na ordem dos 80,67%.

Em campo, nos 4 locais onde decorreram os ensaios, a temperatura mostrou ser a variável climática que mais influência o processo germinativo, destacando-se um sucesso superior na M e JB. Nestes locais a temperatura apresentou, em média, 4,07°C e 5,24°C superior ao verificado no PP e PM, respetivamente. A *Lrn* exibiu um sucesso germinativo considerável em todos os locais realizados (variou entre os 76,7% no PP e os 88% na M).

A espécie *Vap* apresenta grande sucesso germinativo em laboratório. Pelo contrário, a *Lrn* exibiu resultados pouco animadores. Já a *Myr* apresentou grandes contaminações, mesmo após as sementes terem sido submetidas a um tratamento com ultrassons. As sementes embebidas em água em ebulição para a espécie *Tem* poderá ser o pré-tratamento adequado para obter maiores taxas de germinação, em alternativa às digestões ácidas.

As sementes de *Vap* demonstraram que, mesmo após um processo de dessecação a 15% de humidade, preservaram uma boa taxa de viabilidade, desde que devidamente humedecidas antes da inoculação em suportes de germinação.

A *Vap* destaca-se como a única espécie em que as sementes no estado de maturação mais avançado apresentaram um sucesso germinativo superior em todos os ensaios realizados. A *Lrn* evidenciou uma elevada taxa de germinação em campo e em estufa, no entanto, devido ao comportamento recalcitrante, o seu armazenamento e conservação provoca diminuição da viabilidade ao longo do tempo.

Relativamente à composição bioquímica das sementes, na generalidade dos ensaios, o amido apresentou maior concentração em todos os lotes no estado de maturação mais avançado. Esses teores diminuíram durante a germinação, verificando-se um decréscimo mais acentuado nos lotes L2 para as espécies *Vap*, *Myr* e *Tem*. A *Vap* é a que apresenta maior queda na concentração desta reserva. Nos açúcares solúveis verifica-se uma situação semelhante à do amido. As concentrações são marcadamente reduzidas para a maioria das amostras, atingindo valores praticamente nulos após a germinação para a espécie *Myr*. De

todos os lotes, a *Lrn* é a que apresenta maior concentração de açúcares solúveis. Já nos lípidos, verificou-se para todas as amostras uma baixa taxa de mobilização. A *Myr* e a *Vap* mantêm-se como as espécies que apresentam menores concentrações e a *Lrn* a maior percentagem. A proteína é o parâmetro mais abundante na *Tem* e menor na *Myr*. Após a germinação, o teor proteico apresentou pouca alteração, denotando uma baixa variação no seu conteúdo.

Tanto o pH quanto a acidez são importantes indicadores do estado metabólico das sementes durante a germinação, podendo influenciar diretamente o processo de desenvolvimento das plântulas. Nos ensaios realizados a etapa germinativa ocorreu num ambiente com variação de pH entre os 5,21 e os 5,92. A acidez titulável variou consoante a as condições aeróbicas ou anaeróbicas de cada espécie.

No que concerne aos marcadores do metabolismo estudados, a MDH apresenta um aumento da atividade enzimática no período pós-germinativo e na peroxidase observa-se uma baixa atividade em todas as amostras. Na espécie *Lrn* verifica-se o oposto, ou seja, uma redução acentuada da atividade durante a germinação, apresentando, inclusivamente, total inatividade da peroxidase nos Lotes 1 e 2, consequência do carácter recalcitrante da espécie que levou à perda da totalidade do material durante a germinação com vista a determinar a atividade enzimática. O Lote 3 apresenta um comportamento semelhante às restantes espécies para ambas as enzimas.

## 9. Perspetivas futuras

O aprofundamento do conhecimento relacionado com a fenologia da germinação de espécies, como as 4 nativas lenhosas da Madeira estudadas neste trabalho, permite aumentar a eficiência e a eficácia de um ciclo produtivo. A utilização em maior escala deste tipo de espécies, poderá, por um lado, contribuir para a conservação da natureza, mantendo o equilíbrio biológico e biofísico e, por outro lado, gerar um maior interesse económico direto para as populações, favorecendo indiretamente toda a RAM com a dinamização da recuperação de áreas privadas incultas ou degradadas, não desvalorizando os demais serviços, com particular ênfase para a componente ecológica e peculiaridade paisagística numa Região em que o turismo se afirma como pilar estruturante da sua economia.

Assim, e uma vez que as condições de solo e clima afetam todo o metabolismo e a atividade enzimática nas sementes e, conseqüentemente, o comportamento da semente e o próprio sucesso germinativo, é crucial replicar os ensaios realizados neste estudo.

Após realizada uma revisão bibliográfica à bioquímica de germinação de plantas florestais, constata-se que esta área é ainda muito pouco explorada, e inexistente para as

espécies estudadas, pelo que deverá ser dado especial enfoque nesta temática, aprofundando o estudo dos ensaios bioquímicos e dos marcadores do metabolismo, de modo a verificar a reprodutibilidade dos métodos utilizados e diminuir eventuais erros associadas.

## 10. Referências

1. Neves HC, Valente AV. Conheça o Parque Natural da Madeira. Parque Natural Região Autónoma da Madeira - Secretaria Regional da Economia. Funchal: Grafimadeira, 1992. p.7-50.
2. Andrada EC. Repovoamento Florestal do Arquipélago da Madeira (1952-1975). Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Lisboa: Papelaria Fernandes, 1990. p.11-35.
3. Vieira R. Flora da Madeira - O interesse das plantas endémicas macaronésicas. Serviço Nacional de Parques Reservas e Conservação da Natureza. Lisboa:Gráfica Europam, 1992. p.11-18, 106-122 e 127-140.
4. Faria B F, Jardim R. Fauna e Flora da Madeira. Funchal: Direção Regional do Ambiente, 2006. p.11-16.
5. Borges PAV, Abreu C, Aguiar AMF, Carvalho P, Jardim R, Melo I, Oliveira P, Sérgio C, Serrano ARM. A list of the terrestrial fungi, flora and fauna of Madeira and Selvagens archipelagos. Lisboa: Tipografia Peres, 2008. p.157-189.
6. Ista. International rules for seed testing. Switzerland: The International Seed Testing Association, 2015. Chapters 1, 2, 3, 5, 6, 11,15 and 17.
7. Jardim R. Flora endémica da Madeira. Madeira: Múchia, 1ª ed., 2000. p. 10-23, 158-159 e 172-178.
8. Press JR, Short M, Turland NJ. Flora of Madeira. London: HMSO publications, 1994. p. 1-10, 54-56 e 102-104.
9. Gouveia L.M. The Laurisilva of Madeira. World Heritage. Sintra: Heska Portuguesa, 2ª ed., 2006. p. 25-44.
10. Vieira RMS. Flora da Madeira - Plantas vasculares naturalizadas no Arquipélago da Madeira. Funchal: Eco do Funchal, 2002. p. 9-19.
11. Ribeiro D, Ribeiro H, Louro V. Produção em viveiros florestais. Lisboa: Tipografia Peres, 2001. p. 25-33, 37-39, 42 e 85-112.
12. Neves HC, Valente AV, Faria BF, Silva IG, Marques JC, Gouveia NA, Siva PG, Oliveira PJ. Laurissilva da Madeira - Caracterização quantitativa e qualitativa. Funchal: Grafimadeira, 1996. p. 15-20 e 177-179.
13. Freitas F, Mateus MG. Plantas e seus usos tradicionais. Lisboa: Palmigráfica, 1ª ed., 2013. p. 106-107, 135 e 168-169.
14. Jocama V, Viveros S. Guía sobre técnicas de produccción de especies de interés forestal. Canarias: Dirección General de Protección de la Naturaleza, 2011. p. 57-62.
15. Bremer B, Bremer K, Chase MW, Reveal JL, Soltis DE, Soltis PS. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot J Linn Soc: 2003;141: 399-436.
16. Franquinho AC. Madeira - Plantas e flores. Porto: Ribeiro e Francisco, 16ª ed., 1998. p. 224, 256,375 e 390.
17. Dias E, Araújo C, Mendes JF. Espécies florestais das ilhas. Madeira e Açores. Árvores e

florestas. Porto: 2007. p. 202-209, 234-238 e 265.

18. Vitousek PM, Walker LR. Biological Invasion by *Myrica Faya* in Hawai'i: Plant Demography, Nitrogen Fixation, Ecosystem Effects. Ecological Society of America: 1989; vol 59(3):247–265.

19. Baskin JM. The Woody Plant Seed Manual. Native Plants Journal: 2009; vol.10: 300-301.

20. Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H. Seed dormancy and germination. Current Opinion Plant Biology: 2002; 5:33-36.

21. Bareke T. Biology of seed development and germination: a review. Advances in Plants & Agriculture Research: 2018; 8:336-346.

22. Rao NK, Hanson J, Ehsan DM, Kakoll G, Nowell D, Larinde M. Manual of Seed Handling in Genebanks. Italy: Bioversity International, 2006. p. 50-77.

23. Correa EAC, Hernández JLM, Galdona RP, González LMF, Núñez CB. Métodos de escarificación de leguminosas arbustivas endémicas de Canarias. Tenerife: EMAGROF, 2011. p. 34-47 e 55-59.

24. Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D. Seed germination and vigor. Annu Review of Plant Biology: 2012; 63:507–533.

25. Hong TD, Linington S, Ellis RH. Seed Storage Behavior: A Compendium - Handbooks for Genebanks. Italy: 4<sup>a</sup> ed. 1996. p. 3-21.

26. Umarani R, Kanthaiya AE, Mohamed FM. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. Current Science: 2015;108:2023-2034.

27. Kumar P, Choudhary U, Banda UP. Conservation of Orthodox and Recalcitrant Seeds. Just Agriculture: 2023; 3:80-84.

28. Piotto B, Di Noi A. Seed Propagation of Mediterranean Trees and Shrubs. Italy: IGER, 2003. p. 7-10 e 31-32.

29. Bentsink L, Koornneef M. Seed Dormancy and Germination. American Society of Plant Biologists: 2008; 6: 2-18.

30. Don R. ISTA Handbook on Seedling Evaluation. Switzerland: ISTA, 3<sup>a</sup> ed., 2003. Section 2, 3, 4 e 5.

31. Ellis RH, Hong TD, Roberts EH. Handbook of seed technology for genebanks. Volume I. Principles and methodology. Italy: IBPGR, 1985. p. 54-67.

32. Kelly KM, Van J. Effect of Acid Scarification on Seed Coat Structure, Germination and Seedling Vigour of *Aspalathus linearis*. Journal of Plant Physiology: 1985;121:37-45.

33. Chen SY, Chou SH, Tsai CC, Hsu WY, Baskin CC, Baskin JM, Chien C, Kui-Huang L. Effects of moist cold stratification on germination, plant growth regulators, metabolites and embryo ultrastructure in seeds of *Acer morrisonense* (Sapindaceae). Plant Physiology Biochemistry: 2015; 94:165-173.

34. Kramer PJ, Kozlowski TT. Physiology of Woody Plants, Chapter 14 - Fisiology of seeds and seedlings. Academy Press: 1979; 494-530.

35. Amri B, Khamassi K, Ali MB, Silva TJA, Bettaieb BKL. Effects of gibberellic acid on

the process of organic reserve mobilization in barley grains germinated in the presence of cadmium and molybdenum. South African Journal of Botany: 2016; 106:35-40.

36. Pio R, Dalastra IM, Abucarma VM. Concentrações de ácido giberélico e períodos de estratificação na emergência do porta-enxerto de marmeleiro ‘japonês’ (*Chaenomeles sinensis*). Revista Brasileira de sementes: 2010; 32, nº4:125-131.

37. Ma Y, Zhang J, Li X, Zhang S, Lan H. Effects of environmental stress on seed germination and seedling growth of *Salsola ferganica* (Chenopodiaceae). Acta Ecologica Sinica: 2016; 36:456-463.

38. Su L, Lan Q, Pritchard HW, Xue H, Wang X. Reactive oxygen species induced by cold stratification promote germination of *Hedysarum scoparium* seeds. Plant Physiology Biochemistry: 2016; 109:406-415.

39. Bewley J. Seed Germination and Dormancy. The Plant Cell: 1997; 9:1055-1066.

40. Ali AS, Elozeiri AA. Metabolic Processes During Seed Germination. Intech: 2017; 8: 141-166.

41. Bewley JD. Seed Germination and Reserve Mobilization. Encyclopedia of Life Sciences: 2008; 1-7.

42. Ranal M, Santana DG. How and why to measure the germination process? Revista Brasileira de Botânica: 2006; 29:1-11.

43. Musrati RA, Kollárová M, Mernik N, Mikulášová D. Malate dehydrogenase: Distribution, Function and Properties. General Physiology and Biophysics: 1998; 17:193-210.

44. Sew IS, Stroher E, Fenske R, Millar AH. Loss of Mitochondrial Malate Dehydrogenase Activity Alters Seed Metabolism Impairing Seed Maturation and Post- Germination Growth in Arabidopsis. Plant Physiology: 2016; 171:849-863.

45. Singh KL, Chaudhuri A, Kar RK. Role of peroxidase activity and  $Ca^{2+}$  in axis growth during seed germination. Planta: 2015; 242:997-1007.

46. Belt D, Grygier A, Siger A, Kmiecik D, Spasibionek S, Rudzinska M. Changes in Oil Quality and Peroxidase Activity during Germination of Rape Seeds and Mustard Seeds. Applied Sciences: 2023;13:1-15.

47. Kozłowski T, Pallardy SG. Growth control in woody plants, Chapter 2 - Seed Germination and seedling growth. New York: Academic Press, 1997. p. 14-71.

48. Ashton FM. Mobilisation of storage proteins of seeds. Annual Review of Plant Biology: 1976; 27:95-117.

49. Sadasivam S, Manickam A. Biochemical Methods, Chapter 1 - Carbohydrates. India: New Age International, 1996. p.1-19.

50. Quintas A, Freire AP, Halpern MJ. Bioquímica-Organização molecular da vida. Capítulo 5: Macromoléculas. Lisboa:Lidel, 2008. p. 83-88.

51. Mandal S, Mandal RK. Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. Current Science: 2000; 79:576- 589.

52. Simonne a H, Simonne EH, Eitenmiller RR, Mills HA, Cresman CP. Could the dumas method replace the Kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods?

- Journal of Science Food and Agriculture: 1997; 73:39-45.
53. Smedes F, Thomasen TK. Evaluation of the Bligh and Dyer lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*:1996; 32:681-688.
54. Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH. Comparison of the bligh and dyer and folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*: 2001; 36:1283-1287.
55. Folch J, Less M, Sloane-STanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*:1957; 226:497-509.
56. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*:1959; 37:911-917.
57. Mayer AM, Poljakf-MayBer A. The germination of seeds. Chapter 2 - Chemical composition of seeds. Third edit. United Kingdon: Pergamon Press, 1982. p. 10–21.
58. Raboy V. Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development. Chapter 12 - Accumulation and Storage of Phosphate and Minerals. USA:1997. p. 441-442.
59. Lott JNA, Greenwood JS, Batten GDB. Seed Development and Germination. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 215-220.
60. Bewley JD, Black M. Seeds Physiology of development and germination. Second Edicion. Chapter 1 - Seeds: Germination, Structure, and Composition. New York: Plenum Press, 1994. p.1-31.
61. Sáez JNP. Utilización de sustratos en viveros. *Terra*: 1999;17: 231-235.
62. Varennes A. Produtividade dos solos e ambiente. Lisboa: Escolar Editora, 2003. p. 21-42, 65-74 e 211-285.
63. López CC. Fertirrigación en cultivos hortícolas, frutales y ornamentales. 3ª edición. Capítulo 8 - Sustratos para el cultivo sin suelo y fertirrigación. Barcelona: Mundi-Prensa, 2005. p. 299-352.
64. Bot A, Benites J. The importance of soil organic matter: key to drought-resistant soil and sustained food production. Italy: 2005. p. 5-19.
65. Hornung M. Acidification of soils by trees and forests. *Soil Use and Management*: 1985; 1: 24-28.
66. Maxim LD, Niebo R, McConnell EE. Perlite toxicology and epidemiology - a review. *Inhalation Toxicology*: 2014; 26: 259-270.
67. Pereira MJ. Reproductive biology of *Vaccinium cylindraceum* (Ericaceae), an endemic species of the Azores archipelago. *Botany-Botanique*: 2008; 86: 359-366.
68. Huguet V, Gouy M, Normand P, Zimpfer JF, Fernandez MP. Molecular phylogeny of Myricaceae: A reexamination of host-symbiont specificity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*: 2005; 34: 557-568.
69. Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL. Hartmann and Kester's plant propagation: principles and pratice. Capter 20 - Propagation of Ornamental Trees, Shrubs, and Woody Vines. Boston: prentice Hall, 2011. p. 822-824.
70. AOAC, Official methods of analysis, Method 925.10 Solids (total) and Moisture in Flour, AOAC International Publisher, 2005.

71. NP 518:1986 – Determinação do teor de cinza em cereais e leguminosas.
72. Mccready RM, Guggolz J, Silviera V, Owens DHS. Determination of Starch and Amylose in Vegetables Application to Peas. *Analytical Chemistry*: 1950;1156-1158.
73. Bailey RW. The reaction of pentoses with anthrone. *The Biochemical Journal*: 1958; 68: 669-672.
74. Hodge JE, Hofreiter BT. *Methods in Carbohydrate Chemistry: Analysis and Preparation of Sugars*, 6 edition. New York: Academic Press, 1962. p. 356-378.
75. AOAC, Official methods of analysis, Method 945.18-B Determination of Protein Content in Food. AOAC International Publisher, 2000.
76. Corporation, LA guide to Kjeldahl nitrogen determination methods and apparatus. Labconco Corporation, 1998.
77. AOAC, Official methods of analysis, Method 943.02 pH of fluor, AOAC International Publisher, 2005.
78. AACC International. *Approved Methods of Analysis*, Method 02-31.01. Titratable Acidity. AACC International Publisher, 1999.
79. Carvalho MÂAP, Zemlyanukhin AA, Eprintsev AT. The malate dehydrogenase system from higher plants. Structure, properties, functions and regulation in plant cell. Voronezh: Voronezh University Press, 1991. p. 215.
80. Wharton D, Tzagoloff A. *Methods in Enzymology*. 1967; 10: 245-250.
81. Zemlyanukhin AA. *Experimental Biochemistry. Theory and Exercises in Fundamental Methods*. 3 edition. New York: 1999.
82. Bio-Rad Protein Assay - <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf> acessado a 05-01-2024.
83. Hames, BD. *One-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis in Gel electrophoresis of proteins, a practical approach*. 2 edition. New York: Oxford University Press, 1990.
84. Manchenko GP. *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. USA: CRC Press, 2000. p. 39-Section 3-Enzyme Sheets.
85. Wendel JF. *Isozymes in plant biology*, Chapter 1 - Visualization and interpretation of plant Isozymes. London: Chapman and Hall, 1989. p. 5-45.
86. Pipinis E, Miliotis E, Kitikidou K, Radoglou K. Treatments for seed germination improvement in *Prunus azorica*, *Frangula azorica* and *Morella faya*, three native species of Azores Islands. *Botany Letters*: 2016; 163: 329-335.
87. Man JM. *Principles of Food Chemistry*. Chapter 5- Minerals. 3 edition. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999. p. 209-226.
88. Atudorei D, Stroe SG, Codina GG. Physical, physiological and minerals changes of different legumes types during the germination process. *Ukrainian Food Journal*: 2020; 9: 844-863.
89. Ohanenye IC, Tsopmo A, Ejike CECC, Udenigwe CC. Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins. *Trends Food and Science Technology*: 2020; 101: 213-222.

90. Pérez-Fernández MA, Calvo-Magro E, Montanero-Fernández J, Oyola-Velasco JA. Seed germination in response to chemicals: Effect of nitrogen and pH in the media. *Journal of Environmental Biology*: 2006; 27: 13-20.
91. Shoemaker CA, Carlson WH. pH Affects Seed Germination of Eight Bedding Plant Species. *HortScience*: 1990; 25: 762-764.
92. Rymusa K, Radzka E. Effect of pH Levels on Soybean Seed Germination Dynamics. *Acta Scientiarum Polonorum Agricultura*: 2021; 20: 81-88.
93. Rodríguez-Espana M, Figueroa-Hernández CY, Figueroa-Cárdenas JD, Rayas-Duarte P, Hernández-Estrada ZJ. Effects of germination and lactic acid fermentation on nutritional and rheological properties of sorghum: A graphical review. *Current Research in Food Science*: 2022; 5: 807-812.
94. Aguiar AMF, Karsholt O. Systematic Catalogue of the Entomofauna from the Madeira Archipelago and Selvagens Islands - Lepidoptera, Vol. I . *Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural)*: 2006; suplemento 9: 5-92.

## **11. Anexos**

### **Correlações de Pearson, teste *one-way* ANOVA e teste de Tukey HSD**

**Anexo I.** Dados estatísticos relativos aos ensaios realizados em estufa

**Anexo II.** Dados estatísticos relativos aos ensaios realizados em campo

**Anexo III.** Dados estatísticos relativos aos ensaios realizados em laboratório

**Anexo IV.** Dados estatísticos relativos aos ensaios bioquímicos

## Anexos: correlações de Pearson, teste one-way ANOVA e teste de Tukey HSD

### Anexo I. Dados estatísticos relativos aos ensaios realizados em estufa

Correlations - JB

<i>Myrica faya</i>		Lote	Solo	TxG50	TxG100	pH	P	K	Ca	Mg	K	Na	CTC	MO	Cu	Zn	Mn	Fe	CT	
TxG50	Pearson		,832	1	,911	-,835	,752	-,529	,996	,550	-,429	-,892	,855	-,845	,026	,684	-,445	,565	-,845	
	Sig. (2-tailed)	,897	,040		,011	,039	,084	,280	,000	,258	,396	,017	,030	,155	,960	,134	,376	,243	,155	
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4
TxG100	Pearson	,000	,548	,911	1	-,974**	,435	-,811	,893	,824	-,741	-,988**	,980**	-,952	,410	,906	-,062	,834	-,952	
	Sig. (2-tailed)	1,000	,260	,011		,001	,388	,050	,016	,044	,092	,000	,001	,048	,420	,013	,907	,039	,048	
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4

<i>Vaccinium padifolium</i>		Lote	Solo	TxG50	TxG100	pH	P	K	Ca	Mg	K	Na	CTC	MO	Cu	Zn	Mn	Fe	CT	
TxG50	Pearson	,682	,523	1	1,000**	,417	,567	,446	,633	,669	,520	,360	,623	. <sup>a</sup>	-,445	,667	-,672	,181	. <sup>a</sup>	
	Sig. (2-tailed)	,136	,287		,000	,411	,241	,375	,178	,146	,290	,483	,187	. <sup>a</sup>	,377	,148	,144	,732	. <sup>a</sup>	
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	2	6	6	6	6	6	2
TxG100	Pearson	,683	,504	1,000**	1	,431	,574	,459	,635	,659	,530	,338	,608	. <sup>a</sup>	-,424	,664	-,663	,201	. <sup>a</sup>	
	Sig. (2-tailed)	,134	,308	,000		,394	,234	,360	,176	,154	,280	,512	,200	. <sup>a</sup>	,403	,150	,151	,702	. <sup>a</sup>	
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	2	6	6	6	6	6	2

<i>Teline maderensis</i>		Lote	Solo	TxG50	TxG100	pH	P	K	Ca	Mg	K	Na	CTC	MO	Cu	Zn	Mn	Fe	CT	
TxG50	Pearson	-,245	-,200	1	,488	,536	-,127	,596	-,437	-,360	,562	,626	-,429	-,522	-,635	-,548	-,135	-,575	-,522	
	Sig. (2-tailed)	,640	,704		,326	,273	,811	,212	,387	,483	,246	,183	,396	,478	,176	,260	,799	,233	,478	
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	4
TxG100	Pearson	-,001	-,941**	,488	1	-,011	-,904	,175	-,964**	-,976**	,062	,312	-,967**	,801	-,366	-,889	,685	-,102	,801	
	Sig. (2-tailed)	,999	,005	,326		,984	,013	,741	,002	,001	,907	,547	,002	,199	,475	,018	,133	,847	,199	
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	4

<i>Laurus novocanariensis</i>		Lote	Solo	TxG50	TxG100	pH	P	K	Ca	Mg	K	Na	CTC	MO	Cu	Zn	Mn	Fe	CT	
TxG50	Pearson	-,496	,111	1	-,542	,128	,143	,453	-,149	-,292	,459	,283	-,183	,470	-,470	-,278	-,319	-,395	-,470	
	Sig. (2-tailed)	,317	,835		,267	,810	,786	,367	,778	,574	,360	,587	,729	,530	,530	,594	,538	,438	,530	
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	4	6	6	6	6	4
TxG100	Pearson	,359	,117	-,542	1	-,508	,057	-,804	,539	,722	-,780	-,711	,586	-,764	,764	,706	,305	,812	,764	
	Sig. (2-tailed)	,484	,825	,267		,303	,915	,054	,270	,105	,068	,113	,221	,236	,236	,117	,557	,050	,236	
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	4	6	6	6	6	4

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

a. Cannot be computed because at least one of the variables is constant.

**Myrica Faya**

**ANOVA - JB**

TxG50 TxG100 by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	10,889	1	10,889	,073	,790
	Within	2382,222	16	148,889		
	Total	2393,111	17			
TxG100	Between	0,000	1	0,000	0,000	1,000
	Within	5367,111	16	335,444		
	Total	5367,111	17			

TxG50 TxG100 by Substrato		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	2280,444	2	1140,222	151,805	,000
	Within	112,667	15	7,511		
	Total	2393,111	17			
TxG100	Between	4739,111	2	2369,556	56,598	,000
	Within	628,000	15	41,867		
	Total	5367,111	17			

Tukey HSD<sub>a</sub> TxG50

Substrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
AT	6	6,0000000000000000	
SL	6	7,666666666666670	
TP	6		30,666666666666700
Sig.		,556	1,000

Tukey HSD<sub>a</sub> TxG100

Substrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
AT	6	20,666666666666700		
SL	6		38,333333333333300	
TP	6			60,333333333333300
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

**Vaccinium padifolium**

**ANOVA - JB**

TxG50 TxG100 by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	476,440	1	476,440	13,739	,002
	Within	554,840	16	34,677		
	Total	1031,280	17			
TxG100	Between	521,830	1	521,830	13,841	,002
	Within	603,222	16	37,701		
	Total	1125,052	17			

TxG50 TxG100 by Substrato		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	469,012	2	234,506	6,256	,011
	Within	562,267	15	37,484		
	Total	1031,280	17			
TxG100	Between	502,868	2	251,434	6,062	,012
	Within	622,185	15	41,479		
	Total	1125,052	17			

Tukey HSD<sub>a</sub> TxG50

Substrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
SL	6	9,391001067572220	
Cr	6	17,391194374596200	17,391194374596200
TP	6		21,712804517868300
Sig.		,093	,459

Tukey HSD<sub>a</sub> TxG100

Substrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
SL	6	13,053042176599500	
Cr	6	20,993348622941600	20,993348622941600
TP	6		25,879299613176900
Sig.		,116	,409

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Teline maderensis*

ANOVA - JB

TxG50 TxG100 by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	4,500	1	4,500	,873	,364
	Within	82,444	16	5,153		
	Total	86,944	17			
TxG100	Between	0,000	1	0,000	0,000	1,000
	Within	85,778	16	5,361		
	Total	85,778	17			

TxG50 TxG100 by Substrato		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	31,444	2	15,722	4,249	,035
	Within	55,500	15	3,700		
	Total	86,944	17			
TxG100	Between	47,444	2	23,722	9,283	,002
	Within	38,333	15	2,556		
	Total	85,778	17			

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG50

Substrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
TP	6	8,666666666666670	
SL	6	9,666666666666670	9,666666666666670
AT	6		11,833333333333300
Sig.		,648	,159

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG100

Substrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
TP	6	12,666666666666700	
AT	6		15,500000000000000
SL	6		16,500000000000000
Sig.		1,000	,538

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Laurus novocanariensis*

## ANOVA - JB

TxG50 TxG100 by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	107,556	1	107,556	4,264	,056
	Within	403,556	16	25,222		
	Total	511,111	17			
TxG100	Between	200,000	1	200,000	1,980	,178
	Within	1616,000	16	101,000		
	Total	1816,000	17			

TxG50 TxG100 by Substrato		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	92,444	2	46,222	1,656	,224
	Within	418,667	15	27,911		
	Total	511,111	17			
TxG100	Between	1045,333	2	522,667	10,173	,002
	Within	770,667	15	51,378		
	Total	1816,000	17			

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG100

Substrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
AT	6	70,000000000000000	
SL	6		84,666666666666700
TP	6		87,333333333333300
Sig.		1,000	,798

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

**Anexo II. Dados estatísticos relativos ao ensaios realizados em campo**

**Correlations - Campo**

<b><i>Myrica faya</i></b>		Lote	Local	TxG50	TxG100	TT	T.med	Hmed
TxG50	Pearson Correlation	,191	,713*	1	,714*	,882**	,791*	-,885**
	Sig. (2-tailed)	,650	,047		,047	,004	,019	,004
	N	8	8	8	8	8	8	8
TxG100	Pearson Correlation	,198	,928**	,714*	1	,644	,731*	-,844**
	Sig. (2-tailed)	,639	,001	,047		,085	,039	,008
	N	8	8	8	8	8	8	8

<b><i>Vaccinium padifolium</i></b>		Lote	Local	TxG50	TxG100	TT	T.med	Hmed
TxG50	Pearson Correlation	,210	,728*	1	,769*	,656	,730*	-,717*
	Sig. (2-tailed)	,618	,040		,026	,078	,040	,045
	N	8	8	8	8	8	8	8
TxG100	Pearson Correlation	,394	,757*	,769*	1	,868**	,935**	-,843**
	Sig. (2-tailed)	,334	,030	,026		,005	,001	,009
	N	8	8	8	8	8	8	8

<b><i>Teline maderensis</i></b>		Lote	Local	TxG50	TxG100	TT	T.med	Hmed
TxG50	Pearson Correlation	-,025	,819*	1	,887**	,392	,870**	-,878**
	Sig. (2-tailed)	,953	,013		,003	,337	,005	,004
	N	8	8	8	8	8	8	8
TxG100	Pearson Correlation	-,201	,861**	,887**	1	,496	,853**	-,869**
	Sig. (2-tailed)	,633	,006	,003		,211	,007	,005
	N	8	8	8	8	8	8	8

<b><i>Laurus novocanariensis</i></b>		Lote	Local	TxG50	TxG100	TT	T.med	Hmed
TxG50	Pearson Correlation	-,015	,610	1	,758*	,267	,717*	-,637*
	Sig. (2-tailed)	,972	,108		,029	,522	,045	,090
	N	8	8	8	8	8	8	8
TxG100	Pearson Correlation	,099	,531	,758*	1	,576	,849**	-,776*
	Sig. (2-tailed)	,816	,175	,029		,135	,008	,023
	N	8	8	8	8	8	8	8

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

***Myrica Faya*  
ANOVA - Campo**

<b>TxG50 TxG100 by Lote</b>		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between Groups	13,500	1	13,500	,712	,408
	Within Groups	417,000	22	18,955		
	Total	430,500	23			
TxG100	Between Groups	42,667	1	42,667	,561	,462
	Within Groups	1674,667	22	76,121		
	Total	1717,333	23			

<b>TxG50 TxG100 by local</b>		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between Groups	329,833	3	109,944	21,843	,000
	Within Groups	100,667	20	5,033		
	Total	430,500	23			
TxG100	Between Groups	984,000	3	328,000	8,945	,001
	Within Groups	733,333	20	36,667		
	Total	1717,333	23			

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG50

Local	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
PM	6	0,0000000000000000	
PP	6	2,3333333333333330	
JB	6		7,6666666666666670
M	6		9,0000000000000000
Sig.		,302	,735

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG100

Local	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PP	6	22,333333333333300		
PM	6	28,333333333333300	28,333333333333300	
M	6		36,333333333333300	36,333333333333300
JB	6			38,333333333333300
Sig.		,342	,134	,939

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Vaccinium padifolium*

ANOVA - Campo

TxG50 TxG100 by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	17,463	1	17,463	1,012	,325
	Within	379,596	22	17,254		
	Total	397,059	23			
TxG100	Between	88,070	1	88,070	3,967	,059
	Within	488,414	22	22,201		
	Total	576,484	23			

TxG50 TxG100 by local		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	358,631	3	119,544	62,217	,000
	Within	38,428	20	1,921		
	Total	397,059	23			
TxG100	Between	406,330	3	135,443	15,920	,000
	Within	170,154	20	8,508		
	Total	576,484	23			

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG50

Local	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
PM	6	0,0000000000000000	
M	6	,674142239044054	
PP	6	,800174814338237	
JB	6		9,391001067572220
Sig.		,751	1,000

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG100

Local	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
PM	6	2,741486494537780	
PP	6	4,364388327741220	
M	6		9,603338190667960
JB	6		13,053042176599500
Sig.		,771	,204

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Teline maderensis*

ANOVA - Campo

TxG50 TxG100 by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	,167	1	,167	,012	,915
	Within	313,167	22	14,235		
	Total	313,333	23			
TxG100	Between	18,375	1	18,375	,859	,364
	Within	470,583	22	21,390		
	Total	488,958	23			

TxG50 TxG100 by local		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	234,333	3	78,111	19,775	,000
	Within	79,000	20	3,950		
	Total	313,333	23			
TxG100	Between	429,125	3	143,042	47,813	,000
	Within	59,833	20	2,992		
	Total	488,958	23			

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG50

Local	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PM	6	1,5000000000000000		
PP	6	3,166666666666670	3,166666666666670	
M	6		6,333333333333330	
JB	6			9,666666666666670
Sig.		,483	,054	1,000

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG100

Local	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PM	6	5,5000000000000000		
PP	6	7,166666666666670		
M	6		11,0000000000000000	
JB	6			16,5000000000000000
Sig.		,365	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Laurus novocanariensis*

ANOVA - Campo

TxG50 TxG100 by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	,667	1	,667	,005	,945
	Within	3030,667	22	137,758		
	Total	3031,333	23			
TxG100	Between	2,667	1	2,667	,068	,797
	Within	866,667	22	39,394		
	Total	869,333	23			

TxG50 TxG100 by local		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	2419,333	3	806,444	26,354	,000
	Within	612,000	20	30,600		
	Total	3031,333	23			
TxG100	Between	224,000	3	74,667	2,314	,107
	Within	645,333	20	32,267		
	Total	869,333	23			

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG50

Local	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PP	6	1,333333333333330		
PM	6	5,666666666666670	5,666666666666670	
JB	6		14,000000000000000	
M	6			27,666666666666700
Sig.		,539	,073	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Myrica Faya*

ANOVA - Campo

TT, Tméd, Hméd by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TT	Between	35584,487	1	35584,487	,041	,839
	Within	202135427,700	235	860150,756		
	Total	202171012,187	236			
Tméd	Between	2,434	1	2,434	,258	,612
	Within	2216,979	235	9,434		
	Total	2219,413	236			
Hméd	Between	79,386	1	79,386	,513	,474
	Within	36342,804	235	154,650		
	Total	36422,190	236			

TT, Tméd, Hméd by Local		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TT	Between	20163284,981	3	6721094,994	8,604	,000
	Within	182007727,206	233	781149,044		
	Total	202171012,187	236			
Tméd	Between	1391,700	3	463,900	130,587	,000
	Within	827,713	233	3,552		
	Total	2219,413	236			
Hméd	Between	25244,361	3	8414,787	175,405	,000
	Within	11177,829	233	47,974		
	Total	36422,190	236			

Tukey HSD<sub>a,b</sub>

TT

Local	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2,0	57	1138,633508771930000		
1,0	60	1407,382500000000000	1407,382500000000000	
3,0	60		1784,771333333330000	1784,771333333330000
4,0	60			1866,090500000000000
Sig.		,350	,096	,959

Tukey HSD<sub>a,b</sub>

Tméd

Local	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2,0	57	11,4579		
1,0	60		12,8965	
3,0	60			16,7467
4,0	60			17,1112
Sig.		1,000	1,000	,719

Tukey HSD<sub>a,b</sub>

H.med

Local	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4,0	60	66,5630			
3,0	60		72,8250		
1,0	60			87,6762	
2,0	57				91,7249
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Vaccinium padifolium*

ANOVA - Campo

TT, Tméd, Hméd by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TT	Between	159649,726	1	159649,726	,160	,689
	Within	252140520,193	253	996602,847		
	Total	252300169,919	254			
Tméd	Between	,963	1	,963	,100	,752
	Within	2444,631	253	9,663		
	Total	2445,594	254			
Hméd	Between	1,883	1	1,883	,013	,911
	Within	37989,292	253	150,155		
	Total	37991,175	254			

TT, Tméd, Hméd by Local		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TT	Between	25901888,958	3	8633962,986	9,572	,000
	Within	226398280,961	251	901985,183		
	Total	252300169,919	254			
Tméd	Between	1488,416	3	496,139	130,102	,000
	Within	957,178	251	3,813		
	Total	2445,594	254			
Hméd	Between	26525,936	3	8841,979	193,571	,000
	Within	11465,239	251	45,678		
	Total	37991,175	254			

Tukey HSD<sub>a,b</sub>

TT

Local	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PM	60	1198,7360000000000000		
PP	66	1533,1533333333330000	1533,1533333333330000	
M	63		1880,522222222220000	1880,522222222220000
JB	66			2029,897272727270000
Sig.		,196	,168	,811

Tukey HSD<sub>a</sub>

Tméd

Local	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PM	60	11,6247		
PP	66		13,1042	
M	63			16,9019
JB	66			17,3088
Sig.		1,000	1,000	,643

Tukey HSD<sub>a,b</sub>

Hméd

Local	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
JB	66	66,8936			
M	63		72,7978		
PP	66			87,8094	
PM	60				91,5077
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Teline maderensis*

ANOVA - Campo

TT, Tméd, Hméd by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TT	Between	279057,628	1	279057,628	,625	,430
	Within	84782971,648	190	446226,167		
	Total	85062029,276	191			
Tméd	Between	,969	1	,969	,116	,734
	Within	1592,586	190	8,382		
	Total	1593,555	191			
Hméd	Between	7,548	1	7,548	,044	,834
	Within	32492,114	190	171,011		
	Total	32499,662	191			

TT, Tméd, Hméd by Local		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TT	Between	1065778,126	3	355259,375	,795	,498
	Within	83996251,149	188	446788,570		
	Total	85062029,276	191			
Tméd	Between	983,119	3	327,706	100,926	,000
	Within	610,436	188	3,247		
	Total	1593,555	191			
Hméd	Between	22222,148	3	7407,383	135,499	,000
	Within	10277,514	188	54,668		
	Total	32499,662	191			

Tukey HSD<sub>a,b</sub>

Tméd

Local	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PM	57	11,4579		
PP	51		12,5261	
M	42			16,0914
JB	42			16,7671
Sig.		1,000	1,000	,266

Tukey HSD<sub>a,b</sub>

Hméd

Local	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
JB	42	64,9867			
M	42		72,9757		
PP	51			87,5855	
PM	57				91,7249
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Laurus novocanariensis*

## ANOVA - Campo

TT, Tméd, Hméd by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Tméd	Between	,039	1	,039	,005	,945
	Within	1862,148	232	8,026		
	Total	1862,186	233			
Hméd	Between	80,057	1	80,057	,591	,443
	Within	31407,358	232	135,377		
	Total	31487,415	233			
TT	Between	1345,441	1	1345,441	,002	,965
	Within	160235941,230	232	690672,160		
	Total	160237286,671	233			

TT, Tméd, Hméd by Local		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Tméd	Between	1003,848	3	334,616	89,664	,000
	Within	858,338	230	3,732		
	Total	1862,186	233			
Hméd	Between	19957,203	3	6652,401	132,699	,000
	Within	11530,212	230	50,131		
	Total	31487,415	233			
TT	Between	4077885,885	3	1359295,295	2,002	,114
	Within	156159400,786	230	678953,916		
	Total	160237286,671	233			

Tukey HSD<sub>a,b</sub>

Tméd

Local	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2,0	63	11,7852		
1,0	66		13,1042	
3,0	54			16,4356
4,0	51			16,5792
Sig.		1,000	1,000	,978

Tukey HSD<sub>a,b</sub>

Hméd

Local	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4,0	51	69,4763			
3,0	54		73,0174		
1,0	66			87,8094	
2,0	63				91,3213
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

**Anexo III.** Dados estatísticos relativos ao ensaios realizados em laboratório

**Correlations - laboratório**

<b><i>Myrica faya</i></b>		Lote	Pré-tratamento	TxG50	TxG100
TxG50	Pearson Correlation	-,059	-.798**	1	.953**
	Sig. (2-tailed)	,815	,000		,000
	N	18	18	18	18
TxG100	Pearson Correlation	-,042	-.782**	.953**	1
	Sig. (2-tailed)	,870	,000	,000	
	N	18	18	18	18

<b><i>Vaccinium padifolium</i></b>		Lote	Pré-tratamento	TxG50	TxG100
TxG50	Pearson Correlation	,060	-.822**	1	.668**
	Sig. (2-tailed)	,814	,000		,002
	N	18	18	18	18
TxG100	Pearson Correlation	,290	-.389	.668**	1
	Sig. (2-tailed)	,243	,110	,002	
	N	18	18	18	18

<b><i>Teline maderensis</i></b>		Lote	Pré-tratamento	TxG50	TxG100
TxG50	Pearson Correlation	-,128	.814**	1	.943**
	Sig. (2-tailed)	,613	,000		,000
	N	18	18	18	18
TxG100	Pearson Correlation	-,179	.689**	.943**	1
	Sig. (2-tailed)	,477	,002	,000	
	N	18	18	18	18

<b><i>Laurus novocanariensis</i></b>		Lote	Pré-tratamento	TxG50	TxG100
TxG50	Pearson Correlation	-,163	,297	1	.781**
	Sig. (2-tailed)	,519	,231		,000
	N	18	18	18	18
TxG100	Pearson Correlation	,057	,324	.781**	1
	Sig. (2-tailed)	,823	,189	,000	
	N	18	18	18	18

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

***Myrica Faya***

**ANOVA - Laboratório**

<b>TxG50 TxG100 by Lote</b>		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between Groups	32,000	1	32,000	,056	,815
	Within Groups	9088,000	16	568,000		
	Total	9120,000	17			
TxG100	Between Groups	32,000	1	32,000	,028	,870
	Within Groups	18432,000	16	1152,000		
	Total	18464,000	17			

TxG50 TxG100 by Pré-tratamento		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	7744,000	2	3872,000	42,209	,000
	Within	1376,000	15	91,733		
	Total	9120,000	17			
TxG100	Between	15909,333	2	7954,667	46,707	,000
	Within	2554,667	15	170,311		
	Total	18464,000	17			

Tukey HSD<sub>a</sub> TxG50

Pré-tratamento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ef	6	0,0000000000000000	
As	6	0,0000000000000000	
GA3	6		44,0000000000000000
Sig.		1,000	1,000

Tukey HSD<sub>a</sub> TxG100

Pré-tratamento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ef	6	0,0000000000000000	
As	6	3,3333333333333330	
GA3	6		64,6666666666666700
Sig.		,898	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Vaccinium padifolium*

ANOVA - Laboratório

TxG50 TxG100 by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between Groups	8,000	1	8,000	,057	,814
	Within Groups	2237,778	16	139,861		
	Total	2245,778	17			
TxG100	Between Groups	24,500	1	24,500	1,471	,243
	Within Groups	266,444	16	16,653		
	Total	290,944	17			

TxG50 TxG100 by Pré-tratamento		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	1738,778	2	869,389	25,722	,000
	Within	507,000	15	33,800		
	Total	2245,778	17			
TxG100	Between	122,111	2	61,056	5,424	,017
	Within	168,833	15	11,256		
	Total	290,944	17			

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG50

Pré-tratamento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Fr	6	44,166666666666700	
Sn	6		62,833333333333300
As	6		66,666666666666700
Sig.		1,000	,504

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG100

Pré-tratamento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Fr	6	74,666666666666700	
As	6	78,500000000000000	78,500000000000000
Sn	6		81,000000000000000
Sig.		,152	,422

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Teline maderensis*

ANOVA - Laboratório

TxG50 TxG100 by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	138,889	1	138,889	,267	,613
	Within	8333,333	16	520,833		
	Total	8472,222	17			
TxG100	Between	272,222	1	272,222	,530	,477
	Within	8219,753	16	513,735		
	Total	8491,975	17			

TxG50 TxG100 by Pré-tratamento		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	5700,000	2	2850,000	15,421	,000
	Within	2772,222	15	184,815		
	Total	8472,222	17			
TxG100	Between	4053,086	2	2026,543	6,848	,008
	Within	4438,889	15	295,926		
	Total	8491,975	17			

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG50

Pré-tratamento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
As	6	21,111111111111100	
H2S04	6		56,111111111111100
H2O	6		61,111111111111100
Sig.		1,000	,802

Tukey HSD<sub>a</sub>

TxG100

Pré-tratamento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
As	6	37,77777777777800	
H2SO4	6		66,111111111111100
H2O	6		72,22222222222200
Sig.		1,000	,814

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

*Laurus novocanariensis*

ANOVA - Laboratório

TxG50 TxG100 by Lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	22,222	1	22,222	,435	,519
	Within	817,778	16	51,111		
	Total	840,000	17			
TxG100	Between	14,222	1	14,222	,052	,823
	Within	4401,778	16	275,111		
	Total	4416,000	17			

TxG50 TxG100 by Pré-tratamento		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TxG50	Between	165,333	2	82,667	1,838	,193
	Within	674,667	15	44,978		
	Total	840,000	17			
TxG100	Between	485,333	2	242,667	,926	,418
	Within	3930,667	15	262,044		
	Total	4416,000	17			

## Anexo IV. Dados estatísticos relativos ao ensaios bioquímicos

### Correlations - parâmetros bioquímica

<b><i>Myrica faya</i></b>		Cinzas	Azoto	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Ferro	Cobre	Zinco	Manganês	Açúcares	Amido	Lípidos	Proteína	pH	Acidez	MDH	Peróxidase
tempo germinativo	Pearson Correlation	-.764**	,501	0,000	-.627*	-.971**	-.933**	-.937**	-,402	,389	-.939**	-.935**	-.988**	-,551	-,552	,981**	-.928**	,360	,788**
	Sig. (2-tailed)	,004	,097	1,000	,029	,000	,000	,000	,195	,211	,000	,000	,000	,063	,063	,000	,000	,250	,002
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

<b><i>Vaccinium padifolium</i></b>		Cinzas	Azoto	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Ferro	Cobre	Zinco	Manganês	Açúcares	Amido	Lípidos	Proteína	pH	Acidez	MDH	Peróxidase
tempo germinativo	Pearson Correlation	,992**	,960**	,957**	,933**	,894**	,894**	-,172	,172	,963**	,951**	-,802**	-,990**	-,487	,962**	,967**	,964**	,819**	,895**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,593	,594	,000	,000	,002	,000	,108	,000	,000	,000	,001	,000
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

<b><i>Teline maderensis</i></b>		Cinzas	Azoto	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Ferro	Cobre	Zinco	Manganês	Açúcares	Amido	Lípidos	Proteína	pH	Acidez	MDH	Peróxidase
tempo germinativo	Pearson Correlation	-.921**	,358	-,551	-,846**	-,339	-,812**	-,413	-,629*	,058	,613*	-,954**	-,834**	-,327	-,748**	,209	,987**	,724**	-,904**
	Sig. (2-tailed)	,000	,253	,063	,001	,281	,001	,182	,028	,858	,034	,000	,001	,300	,005	,514	,000	,008	,000
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

<b><i>Laurus novocanariensis</i></b>		Cinzas	Azoto	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Ferro	Cobre	Zinco	Manganês	Açúcares	Amido	Lípidos	Proteína	pH	Acidez	MDH	Peróxidase
tempo germinativo	Pearson Correlation	-,597**	,280	-,580*	-,713**	,821**	-,387	,748**	,603**	-,162	-,265	-,812**	-,474*	-,276	-,741**	,860**	-,149	-,362	,679*
	Sig. (2-tailed)	,009	,261	,012	,001	,000	,113	,000	,008	,520	,288	,000	,047	,267	,000	,000	,555	,140	,015
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

*Myrica Faya*

**ANOVA - parâmetros bioquímicos**

parâmetros bioquímicos by lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cinzas	Between	,008	1	,008	2,155	,173
	Within	,039	10	,004		
	Total	,047	11			
Azoto	Between	,012	1	,012	5,518	,041
	Within	,021	10	,002		
	Total	,033	11			
Fósforo	Between	0,000	1	0,000	0,000	1,000
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Potássio	Between	,000	1	,000	,252	,626
	Within	,003	10	,000		
	Total	,003	11			
Cálcio	Between	,000	1	,000	,056	,818
	Within	,013	10	,001		
	Total	,013	11			
Magnésio	Between	0,000	1	0,000	0,000	1,000
	Within	,001	10	,000		
	Total	,001	11			
Ferro	Between	,000	1	,000	,491	,499
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Cobre	Between	,000	1	,000	18,305	,002
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Zinco	Between	,000	1	,000	1,965	,191
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Manganês	Between	,000	1	,000	,619	,450
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Açúcares	Between	,287	1	,287	,406	,538
	Within	7,076	10	,708		
	Total	7,363	11			
Amido	Between	,002	1	,002	,000	,989
	Within	96,859	10	9,686		
	Total	96,861	11			
Lípidos	Between	1,548	1	1,548	6,376	,030
	Within	2,427	10	,243		
	Total	3,975	11			
Proteína	Between	,932	1	,932	11,323	,007
	Within	,823	10	,082		
	Total	1,756	11			
pH	Between	,011	1	,011	,309	,591
	Within	,350	10	,035		
	Total	,361	11			
Acidez	Between	,590	1	,590	1,149	,309
	Within	5,139	10	,514		
	Total	5,729	11			
MDH	Between	,011	1	,011	26,524	,000
	Within	,004	10	,000		
	Total	,015	11			
Peróxidase	Between	,000	1	,000	1,555	,241
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			

parâmetros bioquímicos by tempo germinativo		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cinzas	Between	,028	1	,028	14,041	,004
	Within	,020	10	,002		
	Total	,047	11			
Azoto	Between	,008	1	,008	3,349	,097
	Within	,025	10	,002		
	Total	,033	11			
Fósforo	Between	0,000	1	0,000	0,000	1,000
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Potássio	Between	,001	1	,001	6,486	,029
	Within	,002	10	,000		
	Total	,003	11			
Cálcio	Between	,013	1	,013	163,548	,000
	Within	,001	10	,000		
	Total	,013	11			
Magnésio	Between	,001	1	,001	67,500	,000
	Within	,000	10	,000		
	Total	,001	11			
Ferro	Between	,000	1	,000	72,429	,000
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Cobre	Between	,000	1	,000	1,929	,195
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Zinco	Between	,000	1	,000	1,783	,211
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Manganês	Between	,000	1	,000	74,393	,000
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Açúcares	Between	6,439	1	6,439	69,728	,000
	Within	,924	10	,092		
	Total	7,363	11			
Amido	Between	94,535	1	94,535	406,398	,000
	Within	2,326	10	,233		
	Total	96,861	11			
Lípidos	Between	1,209	1	1,209	4,369	,063
	Within	2,766	10	,277		
	Total	3,975	11			
Proteína	Between	,536	1	,536	4,388	,063
	Within	1,220	10	,122		
	Total	1,756	11			
pH	Between	,347	1	,347	253,139	,000
	Within	,014	10	,001		
	Total	,361	11			
Acidez	Between	4,930	1	4,930	61,673	,000
	Within	,799	10	,080		
	Total	5,729	11			
MDH	Between	,002	1	,002	1,492	,250
	Within	,013	10	,001		
	Total	,015	11			
Peróxidase	Between	,000	1	,000	16,406	,002
	Within	,000	10	,000		
	Total	,000	11			

*Vaccinium padifolium*

## ANOVA - parâmetros bioquímicos

parâmetros bioquímicos by lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cinzas	Between Groups	,083	1	,083	,104	,754
	Within Groups	7,951	10	,795		
	Total	8,034	11			
Azoto	Between Groups	,111	1	,111	,119	,737
	Within Groups	9,328	10	,933		
	Total	9,439	11			
Fósforo	Between Groups	,001	1	,001	,044	,838
	Within Groups	,208	10	,021		
	Total	,209	11			
Potássio	Between Groups	,001	1	,001	,660	,435
	Within Groups	,018	10	,002		
	Total	,019	11			
Cálcio	Between Groups	,001	1	,001	,381	,551
	Within Groups	,018	10	,002		
	Total	,018	11			
Magnésio	Between Groups	,000	1	,000	,018	,896
	Within Groups	,010	10	,001		
	Total	,010	11			
Ferro	Between Groups	,001	1	,001	16,549	,002
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,001	11			
Cobre	Between Groups	,000	1	,000	1,399	,264
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Zinco	Between Groups	,000	1	,000	,241	,634
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Manganês	Between Groups	,000	1	,000	,141	,715
	Within Groups	,001	10	,000		
	Total	,001	11			
Açúcares	Between Groups	3,055	1	3,055	4,052	,072
	Within Groups	7,539	10	,754		
	Total	10,593	11			

Amido	Between Groups	,125	1	,125	,015	,906
	Within Groups	85,701	10	8,570		
	Total	85,827	11			
Lípidos	Between Groups	,720	1	,720	1,434	,259
	Within Groups	5,025	10	,502		
	Total	5,745	11			
Proteína	Between Groups	4,631	1	4,631	,106	,752
	Within Groups	438,006	10	43,801		
	Total	442,637	11			
pH	Between Groups	,188	1	,188	,423	,530
	Within Groups	4,429	10	,443		
	Total	4,616	11			
Acidez	Between Groups	,106	1	,106	,136	,720
	Within Groups	7,744	10	,774		
	Total	7,850	11			
MDH	Between Groups	101,798	1	101,798	4,400	,062
	Within Groups	231,367	10	23,137		
	Total	333,164	11			
Peróxidase	Between Groups	,000	1	,000	,955	,351
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			

parâmetros bioquímicos by tempo germinativo		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cinzas	Between Groups	7,909	1	7,909	633,797	,000
	Within Groups	,125	10	,012		
	Total	8,034	11			
Azoto	Between Groups	8,696	1	8,696	116,956	,000
	Within Groups	,743	10	,074		
	Total	9,439	11			
Fósforo	Between Groups	,191	1	,191	109,688	,000
	Within Groups	,017	10	,002		
	Total	,209	11			
Potássio	Between Groups	,017	1	,017	67,500	,000
	Within Groups	,003	10	,000		
	Total	,019	11			
Cálcio	Between Groups	,015	1	,015	40,000	,000

	Within Groups	,004	10	,000		
	Total	,018	11			
Magnésio	Between Groups	,008	1	,008	39,611	,000
	Within Groups	,002	10	,000		
	Total	,010	11			
Ferro	Between Groups	,000	1	,000	,305	,593
	Within Groups	,001	10	,000		
	Total	,001	11			
Cobre	Between Groups	,000	1	,000	,304	,594
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Zinco	Between Groups	,000	1	,000	125,952	,000
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Manganês	Between Groups	,001	1	,001	94,536	,000
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,001	11			
Açúcares	Between Groups	6,806	1	6,806	17,969	,002
	Within Groups	3,787	10	,379		
	Total	10,593	11			
Amido	Between Groups	84,107	1	84,107	489,063	,000
	Within Groups	1,720	10	,172		
	Total	85,827	11			
Lípidos	Between Groups	1,362	1	1,362	3,108	,108
	Within Groups	4,383	10	,438		
	Total	5,745	11			
Proteína	Between Groups	409,793	1	409,793	124,769	,000
	Within Groups	32,844	10	3,284		
	Total	442,637	11			
pH	Between Groups	4,320	1	4,320	145,946	,000
	Within Groups	,296	10	,030		
	Total	4,616	11			
Acidez	Between Groups	7,289	1	7,289	130,055	,000
	Within Groups	,560	10	,056		
	Total	7,850	11			
MDH	Between Groups	223,202	1	223,202	20,298	,001

	Within Groups	109,962	10	10,996		
	Total	333,164	11			
Peróxidase	Between Groups	,000	1	,000	40,177	,000
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			

*Teline maderensis*

ANOVA - parâmetros bioquímicos

parâmetros bioquímicos by lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cinzas	Between Groups	,014	1	,014	,582	,463
	Within Groups	,239	10	,024		
	Total	,252	11			
Azoto	Between Groups	,101	1	,101	1,384	,267
	Within Groups	,729	10	,073		
	Total	,829	11			
Fósforo	Between Groups	,001	1	,001	4,355	,063
	Within Groups	,002	10	,000		
	Total	,002	11			
Potássio	Between Groups	,001	1	,001	,213	,654
	Within Groups	,043	10	,004		
	Total	,044	11			
Cálcio	Between Groups	,007	1	,007	5,232	,045
	Within Groups	,013	10	,001		
	Total	,020	11			
Magnésio	Between Groups	,001	1	,001	1,674	,225
	Within Groups	,005	10	,001		
	Total	,006	11			
Ferro	Between Groups	,000	1	,000	1,432	,259
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Cobre	Between Groups	,000	1	,000	,944	,354
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Zinco	Between Groups	,000	1	,000	30,405	,000
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			

Manganês	Between Groups	,000	1	,000	,153	,704
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Açúcares	Between Groups	,098	1	,098	,021	,888
	Within Groups	46,999	10	4,700		
	Total	47,097	11			
Amido	Between Groups	,862	1	,862	,328	,579
	Within Groups	26,231	10	2,623		
	Total	27,092	11			
Lípidos	Between Groups	,336	1	,336	,420	,532
	Within Groups	8,010	10	,801		
	Total	8,346	11			
Proteína	Between Groups	,445	1	,445	3,130	,107
	Within Groups	1,420	10	,142		
	Total	1,865	11			
pH	Between Groups	,013	1	,013	46,091	,000
	Within Groups	,003	10	,000		
	Total	,015	11			
Acidez	Between Groups	,206	1	,206	,048	,832
	Within Groups	43,157	10	4,316		
	Total	43,362	11			
MDH	Between Groups	2,630	1	2,630	,232	,640
	Within Groups	113,143	10	11,314		
	Total	115,773	11			
Peróxidase	Between Groups	1,887	1	1,887	1,624	,231
	Within Groups	11,621	10	1,162		
	Total	13,509	11			

parâmetros bioquímicos by tempo germinativo		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cinzas	Between Groups	,214	1	,214	56,002	,000
	Within Groups	,038	10	,004		
	Total	,252	11			
Azoto	Between Groups	,106	1	,106	1,472	,253
	Within Groups	,723	10	,072		
	Total	,829	11			
Fósforo	Between Groups	,001	1	,001	4,355	,063

	Within Groups	,002	10	,000		
	Total	,002	11			
Potássio	Between Groups	,032	1	,032	25,240	,001
	Within Groups	,012	10	,001		
	Total	,044	11			
Cálcio	Between Groups	,002	1	,002	1,301	,281
	Within Groups	,017	10	,002		
	Total	,020	11			
Magnésio	Between Groups	,004	1	,004	19,286	,001
	Within Groups	,002	10	,000		
	Total	,006	11			
Ferro	Between Groups	,000	1	,000	2,056	,182
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Cobre	Between Groups	,000	1	,000	6,553	,028
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Zinco	Between Groups	,000	1	,000	,034	,858
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Manganês	Between Groups	,000	1	,000	6,023	,034
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	11			
Açúcares	Between Groups	42,878	1	42,878	101,626	,000
	Within Groups	4,219	10	,422		
	Total	47,097	11			
Amido	Between Groups	18,827	1	18,827	22,778	,001
	Within Groups	8,265	10	,827		
	Total	27,092	11			
Lípidos	Between Groups	,890	1	,890	1,194	,300
	Within Groups	7,456	10	,746		
	Total	8,346	11			
Proteína	Between Groups	1,044	1	1,044	12,722	,005
	Within Groups	,821	10	,082		
	Total	1,865	11			
pH	Between Groups	,001	1	,001	,458	,514

	Within Groups	,015	10	,001		
	Total	,015	11			
Acidez	Between Groups	42,278	1	42,278	389,771	,000
	Within Groups	1,085	10	,108		
	Total	43,362	11			
MDH	Between Groups	60,768	1	60,768	11,048	,008
	Within Groups	55,005	10	5,501		
	Total	115,773	11			
Peróxidase	Between Groups	11,045	1	11,045	44,841	,000
	Within Groups	2,463	10	,246		
	Total	13,509	11			

*Laurus novocanariensis*

ANOVA - parâmetros bioquímicos

parâmetros bioquímicos by lote		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cinzas	Between Groups	,662	2	,331	6,951	,007
	Within Groups	,714	15	,048		
	Total	1,376	17			
Azoto	Between Groups	,009	2	,005	,453	,644
	Within Groups	,154	15	,010		
	Total	,164	17			
Fósforo	Between Groups	,014	2	,007	10,987	,001
	Within Groups	,009	15	,001		
	Total	,023	17			
Potássio	Between Groups	,212	2	,106	3,143	,072
	Within Groups	,507	15	,034		
	Total	,720	17			
Cálcio	Between Groups	,002	2	,001	,962	,404
	Within Groups	,016	15	,001		
	Total	,018	17			
Magnésio	Between Groups	,005	2	,002	20,874	,000
	Within Groups	,002	15	,000		
	Total	,007	17			
Ferro	Between Groups	,000	2	,000	2,764	,095
	Within Groups	,000	15	,000		
	Total	,001	17			

Cobre	Between Groups	,000	2	,000	7,944	,004
	Within Groups	,000	15	,000		
	Total	,000	17			
Zinco	Between Groups	,000	2	,000	3,025	,079
	Within Groups	,000	15	,000		
	Total	,000	17			
Manganês	Between Groups	,000	2	,000	30,120	,000
	Within Groups	,000	15	,000		
	Total	,000	17			
Açúcares	Between Groups	18,916	2	9,458	,466	,637
	Within Groups	304,693	15	20,313		
	Total	323,609	17			
Amido	Between Groups	42,216	2	21,108	6,447	,010
	Within Groups	49,108	15	3,274		
	Total	91,324	17			
Lípidos	Between Groups	56,994	2	28,497	11,182	,001
	Within Groups	38,227	15	2,548		
	Total	95,221	17			
Proteína	Between Groups	1,658	2	,829	2,045	,164
	Within Groups	6,081	15	,405		
	Total	7,739	17			
pH	Between Groups	,082	2	,041	,196	,824
	Within Groups	3,134	15	,209		
	Total	3,216	17			
Acidez	Between Groups	25,365	2	12,682	53,948	,000
	Within Groups	3,526	15	,235		
	Total	28,891	17			
MDH	Between Groups	216,744	2	108,372	26,217	,000
	Within Groups	62,004	15	4,134		
	Total	278,748	17			
Peróxidase	Between Groups	,120	2	,060	95,318	,000
	Within Groups	,006	9	,001		
	Total	,125	11			

parâmetros bioquímicos by tempo germinativo		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cinzas	Between Groups	,491	1	,491	8,872	,009
	Within Groups	,885	16	,055		
	Total	1,376	17			
Azoto	Between Groups	,013	1	,013	1,359	,261
	Within Groups	,151	16	,009		
	Total	,164	17			
Fósforo	Between Groups	,008	1	,008	8,091	,012
	Within Groups	,015	16	,001		
	Total	,023	17			
Potássio	Between Groups	,366	1	,366	16,520	,001
	Within Groups	,354	16	,022		
	Total	,720	17			
Cálcio	Between Groups	,012	1	,012	33,138	,000
	Within Groups	,006	16	,000		
	Total	,018	17			
Magnésio	Between Groups	,001	1	,001	2,817	,113
	Within Groups	,006	16	,000		
	Total	,007	17			
Ferro	Between Groups	,000	1	,000	20,323	,000
	Within Groups	,000	16	,000		
	Total	,001	17			
Cobre	Between Groups	,000	1	,000	9,138	,008
	Within Groups	,000	16	,000		
	Total	,000	17			
Zinco	Between Groups	,000	1	,000	,434	,520
	Within Groups	,000	16	,000		
	Total	,000	17			
Manganês	Between Groups	,000	1	,000	1,209	,288
	Within Groups	,000	16	,000		
	Total	,000	17			
Açúcares	Between Groups	213,376	1	213,376	30,971	,000
	Within Groups	110,233	16	6,890		
	Total	323,609	17			
Amido	Between Groups	20,553	1	20,553	4,647	,047
	Within Groups					

	Within Groups	70,771	16	4,423		
	Total	91,324	17			
Lípidos	Between Groups	7,271	1	7,271	1,323	,267
	Within Groups	87,950	16	5,497		
	Total	95,221	17			
Proteína	Between Groups	4,249	1	4,249	19,475	,000
	Within Groups	3,490	16	,218		
	Total	7,739	17			
pH	Between Groups	2,376	1	2,376	45,288	,000
	Within Groups	,839	16	,052		
	Total	3,216	17			
Acidez	Between Groups	,643	1	,643	,364	,555
	Within Groups	28,248	16	1,765		
	Total	28,891	17			
MDH	Between Groups	36,571	1	36,571	2,416	,140
	Within Groups	242,177	16	15,136		
	Total	278,748	17			
Peróxidase	Between Groups	,058	1	,058	8,570	,015
	Within Groups	,067	10	,007		
	Total	,125	11			

Tukey HSD<sub>a</sub> Cinzas

Lote	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
L1	6	1,905745673416710	
L2	6	1,908007028666660	
L3	6		2,313607743517000
Sig.		1,000	1,000

Tukey HSD<sub>a</sub> Manganês

Lote	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
L1	6	,001425	
L2	6	,001475	
L3	6		,005150
Sig.		,995	1,000

Tukey HSD<sub>a</sub> Fósforo

Lote	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
L1	6	,1100000000000000	
L2	6	,1125000000000000	
L3	6		,1700000000000000
Sig.		,984	1,000

Tukey HSD<sub>a</sub> Cobre

Lote	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
L3	6	,001500	
L1	6		,003375
L2	6		,003450
Sig.		1,000	,990

Tukey HSD<sub>a</sub> Magnésio

Lote	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
L1	6	,0500000000000000	
L2	6	,0550000000000000	
L3	6		,0875000000000000
Sig.		,713	1,000

Tukey HSD<sub>a</sub> Amido

Lote	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
L3	6	33,876249856380000	
L1	6		36,977509732373900
L2	6		37,254614453888700
Sig.		1,000	,962

Tukey HSD<sub>a</sub> Lipidos

Lote	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
L3	6	10,868562430929800	
L1	6	12,689271559795300	
L2	6		15,208548710042800
Sig.		,153	1,000

Tukey HSD<sub>a</sub> Acidez

Lote	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
L3	6	4,060418157000000	
L2	6		6,156118386000000
L1	6		6,853882405500000
Sig.		1,000	,061

Tukey HSD<sub>a</sub> MDH

Lote	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
L2	6	3,187627	
L1	6	3,357733	
L3	6		10,632318
Sig.		,988	1,000

Tukey HSD<sub>a</sub> Peroxidase

Lote	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
L2	3	,049464	
L1	3	,049816	
L3	6		,249308
Sig.		1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,600.

# A Nossa Universidade

Colégio dos Jesuítas  
Rua dos Ferreiros - 9000-082, Funchal

Tel: +351 291 209400

Fax: +351 291 209410

Email: [gabinetedareitoria@uma.pt](mailto:gabinetedareitoria@uma.pt)