

MESTRADO EM RECURSOS FLORESTAIS

Ana Luísa Jogundo da Costa Pereira

Medronheiro, casos de estudo: avaliação da eficácia de tratamentos de pré-germinativos de semente (colheita de 2018 a 2023) e avaliação da eficácia de diferentes substratos e adição de nutrientes no enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a aclimatização.



Orientador: Professora Doutora Maria Filomena Figueiredo Nazaré Gomes

Coimbra, 2025

MESTRADO EM RECURSOS FLORESTAIS

Ana Luísa Jogundo da Costa Pereira

Medronheiro, casos de estudo: avaliação da eficácia de tratamentos de pré-germinativos de semente (colheita de 2018 a 2023) e avaliação da eficácia de diferentes substratos e adição de nutrientes no enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a aclimatização

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Recursos Florestais

Orientador: Professora Doutora Maria Filomena Figueiredo Nazaré Gomes

Coimbra, 2025

ÍNDICE

Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	vi
Financiamento	vii
Agradecimentos	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. Introdução e contextualização do trabalho	1
2. Medronheiro	3
2.1. Caraterização da espécie	3
2.2. Valor cultural, económico e ambiental	5
3. Métodos de propagação	6
3.1. Substratos	7
3.2. Propagação seminal	9
3.2.1. Extração e conservação das sementes	10
3.2.2. Caraterização de lotes de sementes e material florestal de reprodução	12
3.2.2.1. Pomar produtor de semente de medronheiro	13
3.2.3. Germinação e dormência de sementes	14
3.3. Propagação vegetativa - Micropropagação	17
3.3.1. Enraizamento ex vitro e aclimatização	18
4. Associações simbióticas- Micorrizas	19
5. Objetivos	21
6. Material e Métodos	22
I- Ensaio de tratamentos pré-germinativos	22
6.1. Material seminal	22
6.2. Metodologia para caraterização dos lotes de semente	24
6.3. Caraterização dos tratamentos pré-germinativos e condições de germinação	25
6.4. Delineamento experimental e trabalhos prévios à sementeira	30
6.5. Instalação e local do ensaio	34
6.5.1. Medições de temperatura e humidade	35
6.6. Análise estatística dos resultados	36
II- Ensaio de enraizamento ex vitro e aclimatização	37
6.7. Material vegetal	37
6.8. Análise aos substratos	38
6.9. Caraterização dos tratamentos	39
6.10. Enraizamento ex vitro e aclimatização	43

6.11.	Delineamento experimental e análise de resultados	47
7.	Resultados e Discussão	49
I-	Ensaio de tratamentos pré-germinativos	49
7.1.	Caraterização dos lotes de sementes	49
7.2.	Taxa de germinação	53
7.2.1.	Taxa de germinação condição, família/acesso, ano e tratamento	53
7.2.2.	Taxa de germinação por tratamento e condição	55
7.2.3.	Taxa de germinação por condição e família/acesso	56
7.2.4.	Taxa de germinação por condição de sementeira e ano de processamento da semente	59
7.2.4.1.	Medições de temperatura (°C) e humidade (%)	62
7.2.5.	Análise de componentes principais	63
II-	Ensaio de enraizamento ex vitro e aclimatização	64
7.3.	Taxa de sobrevivência	64
7.4.	Avaliação dos parâmetros de crescimento vegetal e do estabelecimento de micorrizas	69
7.5.	Regressão linear	77
7.6.	Análise de componentes principais	78
7.7.	Análise dos substratos	79
8.	Conclusões e perspetivas futuras	81
I-	Ensaio de tratamento pré-germinativos	81
II-	Ensaio de enraizamento ex vitro e aclimatização	82
9.	BIBLIOGRAFIA	83
	ANEXOS	91

Lista de Figuras

Figura 1 - Exemplo de medronheiro do banco clonal novo (instalado em 2020).....	3
Figura 2 - Figura ilustrativa de interior do fruto do género <i>Arbutus</i> . No caso da espécie <i>Arbutus menziesii</i> (retirado de Schopmeyer, 1974).....	4
Figura 3 - <i>Arbutus unedo</i> (Fruto e flor).....	4
Figura 4 - Observação de torrão coeso em contentor com alvéolo de 35 ml e em tubete de 250 ml na produção de medronheiro.....	9
Figura 5 - Esquematização das fases da micropropagação desde o estabelecimento (Fase 1) à aclimatização (fase 4), retirado de (Beltrame, 2013).....	17
Figura 6 - Conservação de sementes desde 2018 a 2021, armazenadas em contentores de vidro ou plástico hermeticamente fechados com película aderente conservados a frio (4°C).....	23
Figura 7 - Separação da semente do que não é semente.....	24
Figura 8 - Preparação da mistura perlite:vermiculite (50:50; v/v).....	27
Figura 9 - Condição 1, caixas, pormenor do papel em "harmónica" para individualização da sementeira.....	27
Figura 10 - Exemplo de duas caixas preparadas já com as sementes em tabuleiro de plástico.....	27
Figura 11 - Exemplo de garrafão preparado, condição 2 (sementeira em alfobre).....	28
Figura 12 - Condição 3, sementeira direta em contentores, preparação dos tabuleiros de sementeira.....	29
Figura 13 - Trabalho prévio de separação de 15 ou 30 sementes em "unidades" individuais por família e ano e tratamento.....	32
Figura 14 - Trabalho prévio de separação de 15 sementes em "unidades" individuais por acesso e tratamento.....	33
Figura 15 - Trabalho prévio de separação das sementes para os tratamentos com GA ₃ (por família/acesso/anos).....	33
Figura 16 - Caixas de germinação, garrafões para sementeira em alfobre e contentores de sementeira direta acondicionados na câmara e vedadas com película aderente durante o período de estratificação húmida a frio.....	35
Figura 17 - Aspeto geral do substrato comercial BioBizz.....	40
Figura 18 - Aspeto geral do substrato comercial SiroFlorestal.....	40
Figura 19 - Aspeto geral da mistura de Turfa:Perlite (50:50, v/v).....	41
Figura 20 - Aspeto geral do tratamento S4 (Substrato S3 com adição de adubo de libertação controlada).....	42
Figura 21 - Aspeto geral dos tratamentos S5 em a) adição de adubo de libertação controlada e fósforo; S6 em b) adição de fósforo e calcário e S7 em c) adição dos três compostos sendo em todos os tratamentos o substrato base S3 (Turfa:Perlite, 50:50).....	42
Figura 22 - Embalagem das pastilhas de ectomicorrizas testadas no ensaio.....	43
Figura 23 - Preparação e colocação de substrato para ensaio de climatização e enraizamento <i>ex vitro</i> , como camadas inferior e superior de perlite.....	44
Figura 24 - Exemplo de plântulas multiplicadas em meio KNOP adicionado de carbono ativo (CA).....	45
Figura 25 - a) Base do rebento em contato com a hormona de enraizamento. b) Base de rebento depois de estar em contato com a hormona é passada no pó talco.....	46
Figura 26 - Grau de pureza por Famílias/Acesso e ano.....	49
Figura 27 - Taxa de viabilidade (%) observada através do teste tetrazólio por famílias/acesso e ano.....	50
Figura 28 - Sementes observadas com coloração vermelha após sujeitas a solução de cloreto de 2,3,5 - trifeniltetrazólio preparada a 0,25%.....	50
Figura 29 - Peso de 1000 sementes (g) por famílias/acesso e ano.....	51
Figura 30 - N ^o de sementes/kg por famílias/acesso e ano.....	51
Figura 31 - Taxa de germinação (%) por condição e tratamento.....	55
Figura 32 - Taxa de germinação (%) por família/acesso, condição e tratamento.....	57
Figura 33 - Taxa de germinação (%) por condição, ano e tratamento.....	60
Figura 34 - Análise de componentes principais ensaio de tratamentos pré-germinativos (Ensaio I).....	63
Figura 35 - Aspeto geral dos tratamentos ao fim de 2 meses e 5 dias: a) S1.0 (mais à esquerda) e S1.1 (mais à direita), em b) S2.0 (mais à direita) e S2.1 (mais à esquerda), em c) S3.1 (mais à direita) e S3.0 (mais à esquerda); d) S9 (à direita) e S8 (à esquerda); e) S4; f) S5; g) S6 e h) S7.....	66
Figura 36 - Presença de <i>callus</i> (indicados pelas setas amarelas).....	70
Figura 37 - Presença de microrrizas nas raízes no tratamento S9.....	72
Figura 38 - Presença de microrrizas nas raízes do tratamento S9, ampliado.....	73
Figura 39 - Relação do comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR) e número de raízes principais (NPR) em função dos clones testados.....	77

Figura 40 - Análise de componentes principais (PCA) ensaio II.	78
Figura 41 - Taxa de germinação por família/acesso e condição.	93
Figura 42 - Observação da germinação no tratamento 6 na condição 1 (caixa de germinação) ao fim de cerca de 5 semanas (11 de março de 2024).	95
Figura 43 - Observação da germinação na condição 1 (caixa de germinação) ao fim de cerca de 6 semanas (11 de março de 2024).	95
Figura 44 - Observação da germinação na condição 2 (sementeira em alfobre) ao fim de cerca de 4 semanas (29 de fevereiro de 2024).	97
Figura 45 - Observação da germinação na condição 3 (sementeira direta) ao fim de cerca de 5 semanas (7 de março de 2024).	99

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização das famílias/acesso dos lotes de sementes testados, relativos à colheita de fruto e posterior processamento desde 2018 a 2023. Condição 1- Caixas; Condição 2- Alfobre e Condição 3- Sementeira direta.	23
Tabela 2 - Caracterização dos tratamentos pré-germinativos testados, nº de semanas de estratificação a frio e descrição do tratamento (nº de dias de estratificação/ com e sem aplicação prévia de GA ₃).....	25
Tabela 3 - Distribuição das sementes nas condições 1 e 2 caixas / garrafão por tratamento pré-germinativo... 30	
Tabela 4 - Distribuição da famílias e acesso por ano nas repetições e para o tratamento C (controlo).	31
Tabela 5 - Distribuição da famílias e acesso por ano nas repetições por tratamento (com exceção do controlo).	31
Tabela 6 - Calendarização da instalação do ensaio em 4 dias e respetivos tratamentos e condições de germinação.	34
Tabela 7 -Registo da origem dos clones testados, bem como as respetivas designações testadas em laboratório e em campo, litologia e solos e objetivo geral.	37
Tabela 8 - Caracterização dos tratamentos estabelecidos no ensaio de enraizamento <i>ex vitro</i> e aclimatização descritos por substratos, adição ou não de Rhizotonic e adição de outros componentes (adubo de libertação controlada, fósforo e calcário).....	39
Tabela 9 - Caracterização dos lotes de sementes por família/acesso e ano relativa relativamente a grau de pureza (%), peso de 1000 sementes (g), nº de sementes/kg, nº de sementes/L, teor de humidade (%) e viabilidade (%).	52
Tabela 10 -Taxa de germinação (%) por condição de germinação, família/acesso, ano (de colheita) e tratamentos (pré-germinativos (1 a 9 e C) e respetivo período de germinação.	53
Tabela 11 - Temperatura (°C) média, máxima e mínima e Humidade (%) média máxima e mínima.	62
Tabela 12 - Valor da sobrevivência média (%) em função do clone.	64
Tabela 13 -Taxa de sobrevivência média (%) em função do tratamento testado.	65
Tabela 14 - Clone 1001 e 8001 valor da sobrevivência média (%) em função do tratamento.	68
Tabela 15 - Valores médios do comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), <i>callus</i> e presença de micorrizas em função do clone.	69
Tabela 16 -Valores médios do comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), <i>callus</i> e presença de micorrizas em função dos tratamentos testados.	71
Tabela 17 -Clone 1001 valores médios do comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), <i>callus</i> e presença de micorrizas em função dos tratamentos testados.....	74
Tabela 18 - Clone 8001 valores médios do comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), <i>callus</i> e desenvolvimento de micorrizas em função dos tratamentos testados.	76
Tabela 19 - Resultados da condutividade elétrica observados nos diferentes tratamentos testados (tipo de substrato).	79
Tabela 20 - Taxa de germinação (%) na condição 1 por acesso/família, ano (negrito) e tratamentos (escala colorida).....	94
Tabela 21 - Taxa de germinação (%) na condição 2 por acesso/família, ano (negrito) e tratamentos (escala colorida).....	96
Tabela 22 - Taxa de germinação (%) na condição 3 por acesso/família, ano (negrito) e tratamentos (escala colorida).....	98

Financiamento

Este trabalho teve o apoio financeiro de:

- União Europeia – NextGenerationEU, no âmbito do PRR – Plano de Recuperação e Resiliência, AAC n.º 01/C05-i01/2021 - Agendas para a Inovação Empresarial, projeto n.º 34 TRANSFORM - Transformação digital do setor florestal para uma economia mais resiliente e hipocarbónica - WP1-P1.1. Melhoramento genético e materiais florestais de reprodução.
- Programa PDR2020, Operação 7.8.4 – Recursos Genéticos - Conservação e melhoramento de recursos genéticos vegetais, realizado no âmbito da operação PDR2020-784-042742 RG-PCMG, cofinanciado pelo FEADER – Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural, através do Acordo de Parceria Portugal 2020.

Os ensaios foram realizados na ESAC em colaboração com o CERNAS (Centro de Estudos em Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade).



Agradecimentos

Na presente tese de Mestrado em Recursos Florestais, quase na reta final de concluir mais uma etapa no meu percurso acadêmico, não posso deixar de agradecer às várias pessoas que por diversas razões tornaram possível a sua concretização.

À professora Filomena Gomes, pela orientação, disponibilidade, apoio, ajuda e ensinamentos ao longo do meu estágio e realização da tese.

Aos meus colegas Luciano, André e António pelos ensinamentos, tempo, paciência e principalmente por toda a ajuda ao longo da realização do estágio e de todas as atividades envolvidas nos ensaios.

Agradeço também pela disponibilidade e ajuda da professora Maria Vidal na instalação do ensaio de tratamentos pré-germinativos de sementes de medronheiro.

Por fim agradeço à minha família pelo apoio.

RESUMO

Neste trabalho foram realizados dois ensaios no âmbito do programa de melhoramento do medronheiro, espécie autóctone e resiliente a diversas condições edafoclimáticas. No primeiro ensaio, tendo como objetivo avaliar tratamentos pré-germinativos para a comercialização de semente do pomar produtor de sementes certificado pelo ICNF, na categoria de material qualificado e registado com o código ARBUQ001, foi instalado um ensaio (I) para avaliar o efeito de diferentes tratamentos pré-germinativos na germinação de semente (lotes de 2018 a 2023). Os tratamentos consistiram em diferentes períodos de estratificação húmida a frio (4°C), adição de ácido giberélico (GA₃, em diferentes concentrações) e a combinação de ambos. Testou-se ainda três condições de sementeira, 1- caixas de germinação, 2- sementeira em alfobre e 3- sementeira direta. No segundo ensaio (II) tendo como objetivo melhorar o processo de enraizamento *ex vitro* e aclimatização, para aplicação em larga escala, redução do período de tempo, custos e obtenção de melhores taxas de sobrevivência foram testados diferentes substratos, BioBizz (S1), SiroFlorestal (S2), mistura de Turfa:Perlite (S3) e, ainda, a adição de um estimulante radicular (Rhizotonic) ou ectomicorrizas (Micofora) em S2 e S3 e em S3 adição de fósforo, calcário e adubo de libertação controlada em diferentes combinações.

As melhores taxas de germinação foram observadas nas condições 2 e 3 e foram dependentes do genótipo (família/acesso). As sementes de 2020 e 2021 obtiveram melhores taxas de germinação. Os melhores tratamentos para promover a germinação foram o tratamento 1, 1 semana de estratificação, na condição 2. E na condição 3 os tratamentos 7 com 100 % germinação e os tratamentos 8, 9 e C respetivamente, 7 e 8 são tratamentos com combinação de adição de GA₃ nas concentrações de 1000 mg/L e 2000 mg/L e 30 dias estratificação; tratamento 9, adição de GA₃ na concentração de 2000 mg/L sem estratificação e por último o controlo (sem qualquer tratamento pré-germinativo).

Os resultados para o ensaio de aclimatização mostram que os melhores substratos são o BioBizz e a SiroFlorestal. A adição de Rhizotonic não foi relevante. A sobrevivência foi dependente do tratamento. O clone 1001 apresentou melhor sobrevivência comparativamente a 8001. No entanto, este apresentou melhor desenvolvimento vegetativo e radicular. O fósforo foi um elemento adicionado em excesso no ensaio e foi prejudicial à sobrevivência. A adição de micorrizas no substrato SiroFlorestal melhorou significativamente a sobrevivência e desenvolvimento vegetativo.

Palavras chave: Ácido giberélico, clones, estratificação a frio, produção de plantas.

ABSTRACT

In this work, two tests were carried out under the breeding program of the strawberry tree, an autochthonous species that is resilient to various edaphoclimatic conditions. In the first test, with the objective of evaluating pre-germination treatments for the commercialization of seed from the seed producing orchard certified by the ICNF, in the category of qualified material and registered with the ARBUQ001 code, a test (I) was installed to evaluate the effect of different pre-germination treatments on seed germination (lots from 2018 to 2023). The treatments consisted of different periods of wet to cold stratification (4°C), addition of gibberellic acid (GA₃, in different concentrations) and the combination of both. Three sowing conditions were also tested, 1-germination boxes, 2-sowing in alfobre and 3-direct sowing. In the second test (II), with the objective of improving the process of ex vitro rooting and acclimatization, for large-scale application, reduction of time, costs and obtaining better survival rates, different substrates were tested, BioBizz (S1), SiroFlorestal (S2), mix de Turfa:Perlite (S3) and, also, the addition of a root stimulant (Rhizotonic) or ectomycorrhizae (Micofora) in S2 and S3 and in S3 addition of phosphorus, limestone and controlled-release fertilizer in different combinations.

The best germination rates were observed under conditions 2 and 3 and were genotype-dependent (family/accession). The 2020 and 2021 seeds obtained higher germination rates. The best treatments to promote germination were treatment 1, 1 week of stratification in condition 2. And in condition 3, treatment 7 with 100% germination and treatments 8, 9 and C respectively, 7 and 8 are treatments with combination of addition of GA₃ at concentrations of 1000 mg/L and 2000 mg/L and 30 days stratification; treatment 9, addition of GA₃ at concentration of 2000 mg/L without stratification and finally C, the control (without any pre-germinative treatment).

The results for the acclimatization test show that the best substrates are BioBizz and SiroFlorestal. The addition of Rhizotonic was not relevant. Survival was dependent on treatment. Clone 1001 showed better survival compared to 8001. However, it showed better vegetative and root development. Phosphorus was an element added in excess in the trial and was detrimental to survival. The addition of mycorrhizae to SiroForestal significantly improved survival and vegetative development.

Key word: Cold stratification, clone, gibberellic acid, plant production.

1. Introdução e contextualização do trabalho

O medronheiro é uma espécie originária da zona mediterrânica que ocorre naturalmente por todo o país com maior distribuição e relevância no sul e centro do país. A sua morfologia, fisiologia e ecologia torna a espécie interessante nas suas características de adaptação, resiliência e produção de fruto. O medronheiro tolera a secura e vegeta em quase todos os solos até nos delgados e com baixa fertilidade. É também resiliente pela sua capacidade de regeneração após os incêndios em comparação com outras espécies autóctones. O fruto que produz, o medronho, desde a flor é um importante alimento para fauna e produto para a produção de subprodutos com valor económico.

O medronho é o principal motivo de interesse em diversas áreas desde a agricultura, floresta, doçaria, destilaria, saúde e ecologia. O medronheiro é muitas vezes conduzido como uma espécie fruteira num pomar com o objetivo de produção de fruto. O fruto poderá ser consumido fresco ou transformado em outros subprodutos como aguardente, licores, geleias e bolos. Indiretamente ou como complemento à produção do fruto poderão ainda ser explorados outros produtos como o mel e cogumelos. Na floresta o medronheiro é uma espécie com interesse em manter ou arborizar uma vez que promove a biodiversidade, proteção dos solos e ecossistemas (Gomes et al., 2009; Piotto et al., 2001).

Os dois ensaios realizados na presente tese surgem na continuação de todos os trabalhos já realizados para contribuir com o melhoramento e valorização do medronheiro. O primeiro ensaio (I) consistiu em avaliar diferentes tratamentos pré-germinativos em lotes de sementes desde 2018 a 2023 e o segundo ensaio (II) foi realizado com o objetivo de melhorar o enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a aclimatização. O objetivo geral dos ensaios realizados está direcionado para o melhoramento de processos envolvidos na produção de plantas de origem seminal (ensaio I) ou micropropagadas (ensaio II) aptas a sobreviver em campo.

O primeiro ensaio surge perante o conhecimento da dormência e dificuldade de germinação da semente de medronheiro e com base em trabalhos realizados sobre este assunto. A possível comercialização da semente como material florestal de reprodução (MFR) proveniente do pomar produtor de sementes instalado na Escola Agrária de Coimbra certificado pelo ICNF, na categoria de material qualificado e registado com o código ARBUQ001, é outro motivo da realização deste ensaio. Pretendeu-se neste ensaio avaliar os lotes e a capacidade germinativa de sementes armazenadas desde 2018, após a aplicação de diferentes tratamentos pré-germinativos.

O segundo ensaio surgiu com base no conhecimento da importância e necessidade de nutrientes importantes como o fósforo para o desenvolvimento das raízes, do calcário para correção do pH dos substratos e outros nutrientes para o desenvolvimento da parte aérea e radicular das plantas. Assim, numa fase tão sensível que é o enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a aclimatização testaram-se diferentes substratos, adição de um estimulante radicular, em dois dos substratos adicionou-se ectomicorrizas (pastilha comercial) e no substrato com menor teor de nutrientes e mais ácido corrigiu-se o pH com adição de calcário e adicionaram-se nutrientes com os objetivos de reduzir o tempo de aclimatização, aumentar a sobrevivência, reduzir o stresse, promover o desenvolvimento vegetativo e radicular. Dois dos três substratos utilizados foram substratos comerciais, um dos substratos continha turfa, perlite e adubo, o substrato BioBizz, com bons resultados de crescimento em viveiro para o medronheiro e eucalipto em trabalhos anteriores e o outro substrato, a SiroFlorestal contém em sua constituição maior proporção de casca de pinho compostada, turfa, argila e adubo. O último substrato testado é composto apenas por uma mistura de turfa e perlite na mesma proporção de volume, uma opção de substrato mais barata e pobre em nutrientes.

2. Medronheiro

2.1. Caracterização da espécie

O *Arbutus unedo* L., medronheiro (Figura 1) pertence à família *Ericaceae* e ao género *Arbutus*. Da mesma família em Portugal continental existem outras espécies autóctones interessantes como o mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), urze (a *Erica arborea*) e a camarinha (*Corema album*). O medronheiro é uma espécie espontânea da Região Mediterrânica, surgindo em Portugal, Espanha, sul de Itália, sul da Grécia, Irlanda, ilhas Canárias e Israel (Correia, 2002).

Os fatores limitantes da distribuição da espécie estão relacionados com habitats frios com ocorrência frequente de geadas e ventos fortes, altitudes superiores a 900 m, verões longos e muito secos com precipitação inferior a 500 mm (Freire, 2017). Em Portugal continental ocorre naturalmente por todo o país com mais expressão no Sul do país, Algarve e na zona centro.

Nas características edáficas, o medronheiro é indiferente não apresentando exigências específicas. Vegeta bem em diferentes solos e tipo de rocha-mãe como xistos, granitos e areias. Com preferências em solos siliciosos ácidos, mesmo podendo desenvolver-se em solos com calcário (Gomes et al., 2019; Correia et al., 2002).



Figura 1 - Exemplo de medronheiro do banco clonal novo (instalado em 2020).

O medronheiro é uma espécie com características morfológicas específicas que tornam uma espécie fácil de identificar em campo e apresenta características fisiológicas interessantes. É

uma espécie lenhosa de porte arbustivo, por vezes podendo atingir porte arbóreo, até aos 12 metros. A sua folha é perene, oblongo-lanceoladas geralmente serradas, de cor verde lustrosa. As folhas pelas suas características morfológicas e fisiológicas são adaptadas a temperaturas altas, humidade alta na atmosfera e menos resistentes às geadas (Gomes et al., 2019). O tronco é fendilhado e com tons castanho-avermelhado. Por vezes os ramos jovens apresentam uma cor característica avermelhada. As flores são hermafroditas, surgem em cachos terminais e apresentam forma de campânula com uma cor esbranquiçadas a levemente rosadas (Martins, 2012). O fruto é o medronho, uma baga globosa e rugosa caracterizado por apresentar 5 lóbulos (figura 2) com sementes pequenas com cerca de 2 a 3 mm e tegumento castanho a cinzento (Tapum, 1980; Navarro Cerrillo y Gálvez, 2001).

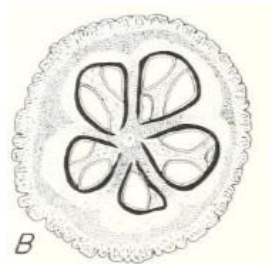


Figura 2 - Figura ilustrativa de interior do fruto do género *Arbutus*. No caso da espécie *Arbutus menziesii* (retirado de Schopmeyer, 1974).

Fonte: <https://archive.org/details/seedsofwoodyplan00fore/page/n11/mode/2up>

O fruto maduro apresenta tons vermelhados. No outono é a época em que ocorre a maturação do fruto. Mesmo na época de maturação o amadurecimento do fruto não é homogéneo na árvore, sendo observados frutos que vão de um verde passando por amarelo a vermelho vivo durante o amadurecimento. Esta característica exige que a apanha do fruto seja realizada em diferentes ações regulares no tempo. Uma particularidade interessante é que devido ao seu ciclo fenológico longo, é possível encontrar flores e frutos ao mesmo tempo na árvore (Figura 3).



Figura 3 - *Arbutus unedo* (Fruto e flor).

Fonte: <https://www.jardineiro.net/plantas/medronheiro-arbutus-unedo.html>

As flores observadas na árvore apenas dão origem ao fruto no ano seguinte após cerca de 12 meses desde a polinização, fruto vingado, crescimento até ao fruto maduro (Gomes et al., 2019).

2.2. Valor cultural, económico e ambiental

A cultura do medronho tem uma longa tradição no contexto sociocultural em Portugal continental, em particular no Algarve. O seu valor cultura está muito ligado à produção de aguardente de medronho, muitas vezes um complemento económico de muitos agricultores. O fruto é o centro do interesse económico pela sua utilização não só na aguarente, mas em produtos inovadores como doces, geleias, iogurtes, entre outros. Um trabalho, entre muitos outros desenvolvidos, foi a utilização de um corante natural feito a partir do medronho numa receita de waffles (López et al., 2018).

Em Portugal é uma espécie adaptada ao clima, encontrando-se no país em zonas com influência atlântica e mediterrânea, naturalmente no subcoberto de outras espécies florestais, como o pinheiro bravo e carvalhos (Correia et al., 2002). O medronheiro é uma espécie rústica que permite a recuperação dos solos com contributo em matéria orgânica através da folhada, ainda para o sequestro de carbono, fixação dos solos e redução da erosão. É uma espécie resiliente ao stresse hídrico, tolerância a temperaturas altas e desenvolve-se em solos pobres (Gomes & Canhoto, 2009). A sua presença diminui o aparecimento de outras espécies como a acácia, devido ao ensombramento que cria. O seu fruto, que amadurece principalmente no outono, torna-se uma fonte de alimento importante para a fauna, numa altura em que começa a diminuir a disponibilidade de alimento. Povoamentos de medronheiro são ainda áreas importantes para a produção de subprodutos como o mel e cogumelos.

Na floresta o medronheiro após a ocorrência dos incêndios florestais nos últimos anos despertou interesse pela sua capacidade de regenerar e recuperar após a passagem de um incêndio. Esta regeneração é assegurada pelo *lignotuber* composto por reservas de amido e gomos, que posteriormente estimulam o abrolhamento de gomos dormentes (Mesléard & Lepart, 1989). O medronheiro tem vindo a ser utilizado em plantações em baixo de linhas de alta tensão (Gomes et al., 2019), zonas sob a gestão da REN devido ao seu porte arbustivo. Debaxo das linhas de alta tensão não devem existir árvores e é obrigatória a limpeza de matos constante. Assim, o medronheiro é uma ótima opção reduzindo o aparecimento de matos e consequente necessidade de limpezas promovendo valor ambiental e económico nestas áreas.

3. Métodos de propagação

O medronheiro é uma espécie cuja procura no mercado tem vindo a aumentar em quantidade e qualidade para plantações com objetivos diversos. A sua produção, à semelhança de outras espécies, é principalmente obtida através de regeneração artificial em laboratório e/ou viveiro para permitir qualidade e quantidade das plântulas. Os métodos de propagação de plantas são a propagação seminal e propagação vegetativa (Ribeiro et al., 2001).

O método de propagar plântulas mais simples e em geral mais barato é a propagação seminal. Neste método existem trabalhos prévios à sementeira dependendo da espécie em causa com tarefas de colheita dos frutos, processamento do fruto e a extração da semente poderão encarecer o preço final das sementes. A sementeira (mecanizada ou manual) poderá ser mais minuciosa conforme o tamanho da semente e método de sementeira aplicado. Dependendo da espécie poderá ser necessário aplicar tratamentos pré-germinativos antes ou durante a sementeira para quebrar a dormência ou ultrapassar a dificuldade da germinação das sementes. Os métodos de propagação vegetativa aplicados às espécies lenhosas, são essencialmente a enxertia, estacaria e a micropropagação onde se consegue obter indivíduos geneticamente iguais às plantas-mãe selecionadas, obtendo-se clones. Estes métodos permitem propagar indivíduos com características específicas e interessantes, por exemplo, um indivíduo resistente à geadas no caso do eucalipto (Alves et al., 2007; Hartmann et al., 2011) algo que não é totalmente possível com a propagação seminal. Na propagação seminal há cruzamento de gâmetas, que desse modo garantem a variabilidade genética.

A propagação vegetativa através de estacaria ou enxertia convencional para o medronheiro não oferecem resultados promissores, no entanto a micropropagação *in vitro* apresenta bons resultados (Correia et al., 2002). A utilização de clones no caso do medronheiro permite principalmente propagar um indivíduo previamente selecionado pelas suas boas características produtoras de fruto ou adaptados a condições climáticas específicas (Gomes, 2011). O método de micropropagação exige mão de obra qualificada e passa por diferentes etapas desde o laboratório até ao viveiro que no final irão encarecer o preço da planta em comparação com uma planta obtida por via seminal. No entanto, o potencial produtivo e/ou adaptação a diferentes condições edafoclimáticas justifica o investimento.

3.1. Substratos

Na produção seminal as características físicas e químicas adequadas do substrato são essenciais para garantir o futuro desenvolvimento das plântulas que estão sujeitas a um espaço limitado e volume reduzido de substrato em viveiro.

Na propagação vegetativa na fase de viveiro ou aclimatização em laboratório, à semelhança da produção seminal, as plântulas estarão sujeitas a um espaço confinado e são dependentes das características do substrato. Assim, o substrato necessita de ser adequado às necessidades das plântulas e etapa de produção permitindo o crescimento e desenvolvimento vegetativo e radicular.

Um substrato é constituído por elementos sólidos minerais e orgânicos onde existem espaços entre esses elementos, denominados de poros, onde a água e gases circulam. A porosidade do substrato é o espaço que esses poros representam em relação ao volume total da parte sólida do substrato. Assim, um substrato poderá ter maior ou menor porosidade de acordo com os materiais orgânico ou mineral constituintes. Esta característica física do substrato é importante para garantir que existe espaço para o desenvolvimento das raízes, circulação da água e gases. Uma elevada porosidade do substrato (macroporosidade) garante um bom arejamento e drenagem do excesso de água evitando a asfixia e apodrecimento das raízes. Água retida no substrato através da microporosidade é importante para as necessidades fisiológicas das plantas e absorção de nutrientes (Coelhos, 2010; Ribeiro et al.,2001).

Um substrato para o desenvolvimento de plantas em Portugal é em geral composto por turfa de *Sphagnum*, casca de pinho compostada ou perlite e adubo (Ribeiro et al.,2001). A casca de pinho é um subproduto da exploração florestal que oferece macroporosidade e matéria orgânica ao substrato. A perlite é um material mineral de baixa capacidade de troca catiónica a sua função no substrato é promover a macroporosidade. A perlite é constituída por silicatos de origem vulcânica. A turfa é um recurso não renovável devido ao processo lento de formação das turfeiras, mas ainda continua a ser utilizado pela capacidade interessante de retenção de água (microporosidade). Contrariamente à perlite, a turfa e a casca de pinho compostada apresentam uma capacidade de troca catiónica elevada, em particular a turfa. A capacidade de reter água da turfa pode, no entanto, ser desfavorável quando ocorre encharcamento do substrato com efeito nefasto sobre as raízes. O pH baixo é uma característica da turfa que na produção de plantas, aqui dependendo muito da espécie, mas em geral o pH ácido poderá não ser favorável ao desenvolvimento radicular e vegetativo, o fósforo, um macronutriente importante principalmente no desenvolvimento radicular, quando o pH é ácido torna-se menos

solúvel ficando menos disponível para as plantas (Chaves & de Azevedo Farias, 2008). De acordo com Schmilewski (2008), os valores de macronutrientes NPK presentes na turfa de *Sphagnum* são até 50 mg/L, considerado moderado. Assim, a turfa usada como substrato para plantas é usualmente misturada com outros compostos, minerais ou orgânicos como adubo, carbonato de cálcio, argila, perlite e casca de pinho compostada, para melhorar as suas características físicas (arejamento/macroporosidade) e químicas (pH; disponibilidade de nutrientes). Em substituição ou na tentativa de reduzir o uso da turfa tem vindo a ser utilizada fibra de coco.

O adubo nos substratos é fundamental devido ao espaço limitado a que as plântulas estão sujeitas e à sua pouca disponibilidade no substrato. Os compostos que constituem os substratos podem não apresentar a quantidade de nutrientes necessária para o desenvolvimento das plântulas. Substratos comerciais com turfa, que apresenta elevada capacidade de troca catiónica, são mais eficientes se forem adicionados adubos de libertação controlada (Raviv et al., 1986). Assim, os adubos adicionados ao substrato para produção de plântulas são compostos por os macronutrientes e micronutrientes considerados essenciais para o desenvolvimento das plantas. Os macronutrientes principais identificados por NPK, correspondem às concentrações de azoto, fósforo e potássio, respetivamente. O azoto (N) é nutriente essencial à síntese de proteínas, crescimento celular e é um constituinte da clorofila. No medronheiro é essencial e à semelhança de outras espécies vegetais, no substrato em concentrações mais elevadas promove em excesso o desenvolvimento vegetativo, que induz a formação de folhas mais sensíveis a pragas, a doenças e, ainda ao stresse (Huber et al., 2012; Singh & Sood, 2017). O fósforo é um elemento constituinte de compostos que atuam ao nível da fotossíntese, respiração e divisão celular. Ajuda o crescimento das raízes, um desenvolvimento importante para garantir posterior sucesso na plantação em campo das plântulas (DSVVF, 2003; Gomes F. et al., 2019). Para o medronheiro adubos ricos em fósforo, potássio com adição de cálcio, magnésio e boro, poderão ser aconselhados à plantação por estimular o crescimento das raízes e aumentar a tolerância ao stresse hídrico no verão (Curado, et al., 2015). O potássio oferece rigidez aos tecidos reduzindo a suscetibilidade a doenças (Barros, 2020). Outros nutrientes importantes, considerados micronutrientes para as plantas são o magnésio (Mg), boro (B), zinco (Zn), enxofre (S) e cobre (Cu). A carência em nutrientes nas plantas muitas vezes é visível nas folhas com o surgimento de cloroses específicas.

3.2. Propagação seminal

A propagação seminal é obtida através da germinação de sementes, material de reprodução das plantas. A semente é um óvulo maduro, resultado da união do gâmeta feminino (o óvulo) e gâmeta masculino (o pólen), inerente à reprodução sexual/seminal de algumas plantas. Uma semente é constituída pelo embrião e reservas que são revestidas externamente por uma proteção denominada de tegumento (Hartmann et al. 2011).

A sementeira como método de propagação poderá ser realizada em alfobre ou sementeira direta em contentores (Gomes, 2021). Na sementeira em alfobre as sementes são dispostas aleatoriamente num substrato e cobertas posteriormente com o mesmo substrato ou vermiculite. Este tipo de sementeira exige posteriormente uma “repicagem” das plântulas geminadas que requer cuidados, uma vez que as plântulas são transplantadas manualmente em “raiz nua” para contentores/tubetes/vasos definitivo com o objetivo de continuar o seu desenvolvimento individual em viveiro até à plantação.

A sementeira direta consiste na colocação de uma a duas sementes individualmente em contentores com separação em alvéolos. A germinação das sementes em alvéolos individualizados permite o desenvolvimento individual das raízes e formação de um torrão coeso de substrato a envolver a parte radicular. Na figura 4 é visível um torrão coeso num contentor com alvéolo de 35 ml (à esquerda) e em tubete de 250 ml (à direita), na produção de medronheiro.



Figura 4 - Observação de torrão coeso em contentor com alvéolo de 35 ml e em tubete de 250 ml na produção de medronheiro.

O torrão coeso de substrato garante menos danos, stresse e mortalidade na transplantação para os contentores/tubetes/vasos de maiores dimensões e definitivos no período em que as plantas estão em viveiro. Em ambos os métodos de sementeira, a cobertura da semente não

deve ser superior duas vezes à sua dimensão porque poderá comprometer a sua germinação pela dificuldade que a plântula terá em emergir.

Na natureza as sementes de medronheiro não germinam facilmente (Passarinho et al., 2017), vários autores referem que a semente apresenta dormência (Karam & Al-Salem 2001; Tilki, 2004; Smiris et al., 2006; Demirsoy et al., 2010; Ertekin & Kirdar, 2010). A propagação seminal do medronheiro, à semelhança de outras espécies é relevante pela sua aplicação simples e com menos custos associados em comparação com métodos de propagação vegetativa. A propagação seminal, na produção de plantas para regeneração artificial, é relevante por garantir variabilidade genética e em combinação com a propagação vegetativa são métodos de propagação importante no processo de melhoramento das espécies.

3.2.1. Extração e conservação das sementes

As técnicas de extração/processamento e condições de conservação de uma semente devem ser adequadas às características do fruto e/ou tipo de sementes.

Sementes provenientes de frutos carnudos (como bagas e drupas) ou cones e cápsulas exigem técnicas de extração/processamento das sementes diferentes. Em frutos carnudos é necessário remover a totalidade da casca e polpa, normalmente com recurso a maceração do fruto, descasque manual ou mecânica e lavagem da semente em água corrente. Estes frutos devem ser colhidos maduros garantindo a completa formação das sementes. A conservação de sementes provenientes de frutos carnudos deve ser realizada depois da secagem natural da semente e livre de qualquer vestígio do fruto evitando o aparecimento de fungos. Cones, como pinhas ou cápsulas da espécie *Eucalyptus* sp. devem ser colhidos antes do seu completo amadurecimento, ainda fechados garantido que não houve libertação das sementes. Posteriormente as pinhas ou cápsulas são colocados em estufas garantindo temperatura para “abrir” e haver libertação das sementes. Sementes do género *Quercus* sp. são um tipo de sementes que não exigem técnicas de extração. Os frutos são apenas colhidos quando maduros e colocados para germinar depois de uma seleção de qualidade simples.

Na conservação, o tipo de semente é um fator importante que irá determinar o período e modo de conservação. O objetivo da conservação é manter a viabilidade da semente. Uma extração/processamento e conservação adequada são fatores muito importantes na germinação de sementes conservadas. Existem dois tipos de sementes classificadas segundo o maior ou menor capacidade de suportar a perda de humidade. Sementes grandes (castanha, lande) não toleram perdas elevadas de humidade nem arrefecimento, são classificadas como sementes

recalcitrantes. A sua conservação deve ser a temperaturas frias (2°C a 4°C) e o período de conservação é no máximo um ano. A recomendação é utilizar a semente no ano em que é colhida (CENASEF, 2017). Contrariamente sementes ortodoxas são sementes que toleram perda de 5% a 10% da sua humidade e uma temperatura de conservação a 18°C (Azarkovich, 2020; Gomes, 2020). Na conservação, as sementes são guardadas e identificadas em lotes, onde um conjunto de sementes tem características em comum como a densidade e origem do local de colheita do fruto, por exemplo.

O fruto do medronheiro, medronho, é uma baga (fruto carnudo com presença de polpa e várias sementes). É recomendado após a colheita a maceração dos frutos em água com o objetivo de amolecer todo o fruto e facilitar a separação da polpa das sementes. Em CENASEF (2017), após maceração dos frutos recorre-se a um descascador industrial de batatas com adição constante de água para remoção da polpa. Este método tem o objetivo de abrir e “lavar” os frutos até sair a polpa. Tapum (1980) descreve o procedimento de extração das sementes de forma mais manual, os frutos são igualmente macerados, no entanto para separar a semente utiliza um crivo de malha mais pequena que o tamanho das sementes e água corrente para lavar a polpa. O resultado de ambas as técnicas não é 100% eficaz porque além das sementes existe restos de casca e esclerênquima de dimensões semelhantes às das sementes que são deixados no descascador industrial ou no crivo. No CENASEF, após o processo de secagem, é utilizado ainda um separador por densidade que permite separar o esclerênquima e as sementes vazias (com menor densidade) da semente. O esclerênquima é um tecido simples vegetal adulto normalmente dividido em dois tipos, os escleritos e fibras com funções de proteção e sustentação, caracterizado por ser um tecido lenhificado ou não, presentes nas folhas, raízes, caule, sementes e frutos (da Glória, 1992; De Barros Martins, 2010). Com o descascador de batata industrial e o separador de densidade é possível obter um lote limpo (grau de pureza elevada) com apenas semente para comercialização. A desvantagem de um processo manual é que o lote de semente não será limpo (grau de pureza baixo) ou seja, o lote não será composto apenas por semente, a quantidade a adquirir deve ser feita tendo em conta essa condição.

Na ESAC, até à data da presente tese, a extração da semente é realizada de forma manual. A extração é semelhante ao descrita por Tapum (1980), no entanto, após maceração do fruto o fruto é descascado manualmente antes da lavagem e separação da semente em crivos. O descasque da fruta permite diminuir o resíduo consequente da extração manual da semente, neste caso, o que fica posteriormente a todo o processo incluindo a secagem é apenas semente e esclerênquima.

É importante neste tipo de fruto garantir que a polpa é retirada completamente para evitar o aparecimento de fungos que comprometem a conservação, viabilidade e taxa de germinação. As sementes posteriormente devem secar naturalmente. A sua conservação deve ser no frio, de 2°C a 4°C, num frigorífico (Piotto et al., 2001).

3.2.2. Caracterização de lotes de sementes e material florestal de reprodução

Os lotes de sementes como material de reprodução são identificados como material de florestal de reprodução (MFR) pelo ICNF para efeitos de controlo dos lotes de sementes e qualidade das plantas em viveiro. Para sua comercialização devem ser analisados em laboratório para avaliação e caracterização da qualidade, quantidade e capacidade germinativa da semente. Os parâmetros que se deve analisar em laboratório são no mínimo, o grau de pureza, número de sementes por quilo, teor de humidade, viabilidade e capacidade germinativa (ICNF, 2022).

O grau de pureza (%) determina a proporção de sementes presentes numa amostra. Após a extração/processamento da semente poderá não se conseguir limpar totalmente a semente de impurezas, como mencionado em Ribeiro et al. (2001). No caso do medronho, quando processado manualmente não se consegue limpar a semente de impurezas (esclerênquima e casca).

O teor de humidade (%) é avaliado pelo peso da semente inicial em comparação com o peso da semente após ser sujeita a temperatura de 105 °C por 24 horas, com base em Bender et al. (2015) e Ribeiro et al. (2001). A humidade da semente poderá influenciar a viabilidade e germinação, em particular para as sementes grandes (castanha, lande) e, ainda, poderá ser um indicador das condições de conservação. Se a semente for ortodoxa tolera alguma dessecação ao conservar a baixas temperaturas por longos períodos sem perder a viabilidade (Azarkovich, 2020).

A viabilidade das sementes é testada através do teste bioquímico tetrazólio. O indicador de viabilidade é apresentado por coloração vermelha na semente após corte e imersão das sementes em uma solução de cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio. O teste de tetrazólio demarca com a coloração zonas em que a atividade das desidrogenases envolvidas no processo de respiração nos tecidos vivos está presente (Soares et al., 2014; Hartmann. et al., 2011). Durante a respiração ocorre a liberação de iões de hidrogénio, com os quais o cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio reage. Assim, a coloração da semente significa atividade respiratória e a

inerente viabilidade (Neto et al., 1998). Este teste é de fácil execução, no entanto exige conhecimento das estruturas embrionárias das sementes.

No medronheiro o autor Smiris et al. (2006) obteve viabilidade de 88% e Narbona et al. (2003) o resultado foi de cerca de 62% com o teste de tetrazólio.

Em Portugal de acordo com o Decreto-Lei nº 205/2003, de 12 de setembro, alterado pelo Decreto-lei nº 13/2019, de 21 de janeiro a comercialização de materiais florestais de reprodução (MFR) como as sementes são obrigatórias a certificação para 48 espécies. O MFR é categorizado em 4 categorias (ICNF; 2022) presente no Catálogo Nacional de Materiais de Base (CNMB):

- Material de fonte identificada: é conhecido o bosque ou povoamento onde foi colhido o material numa única região de proveniência com características fenotípicas ou genéticas semelhantes;
- Material selecionado: material de povoamento numa única região de proveniência selecionado fenotipicamente ao nível da população;
- Material qualificado: material de povoamentos, pomares de sementes, progenitores familiares, clones em que houve uma seleção fenotípica, mas ainda sem resultados inerentes à instalação de ensaios em campo de descendência ou clonais;
- Material testado: material de povoamentos, pomares de sementes, progenitores familiares, clones que foi testado e com resultados em ensaios de campo.

A origem do material vegetal de reprodução, ainda que não seja obrigatório para algumas espécies, é importante essa informação de modo a ser usado material vegetal de uma região com as mesmas características edafoclimáticas, garantindo um melhor desempenho e sobrevivência das plantas.

3.2.2.1. Pomar produtor de semente de medronheiro

Um pomar produtor de sementes é um pomar de árvores clonais de indivíduos selecionados pelas características superiores desejadas para uma determinada espécie e objetivos. O pomar produtor de sementes precisa ser isolado de outros povoamentos da mesma espécie, de modo a evitar a contaminação por pólen de indivíduos não selecionados (Dorman, 1976, citado por Mori et al, 1988). Os pomares produtores de sementes são importantes fornecedores de material de reprodução para a produção de plantas em quantidade e qualidade. Por consequência da seleção previa dos indivíduos do pomar, a semente poderá ser catalogada com a informação da melhor condição edafoclimática (região de proveniência) para o desenvolvimento de

determinado lote de sementes. Os pomares produtores de semente são cada vez mais importantes para o melhoramento genético das espécies florestais. Em Portugal Continental as espécies florestais com pomares produtores de semente, material de reprodução (semente) classificado como qualificado são apenas para o eucalipto e o pinheiro bravo.

Um pomar produtor de semente de medronheiro foi instalado em 2015 na Escola Agrária de Coimbra constituído atualmente por 50 indivíduos (genótipos). Os indivíduos do pomar foram selecionados em campo pela produção do fruto (peso de frutos por planta) e pela qualidade do fruto testada em laboratório (teor de sólidos solúveis; teor de açúcares; teor de esclerênquima no fruto; calibre e dureza do fruto). Na categoria de material de reprodução florestal, pelo ICNF, o pomar produtor de semente de medronheiro foi classificado como material qualificado, registado no Registo Nacional de Materiais de Base (RNMB) com o código de inscrição ARBUQ001. Atualmente está em curso a instalação de ensaios em campo de descendência e clonais do pomar produtor de sementes de medronheiro.

3.2.3. Germinação e dormência de sementes

A semente, resultado da reprodução sexual de algumas plantas, no final do seu desenvolvimento atinge a maturidade fisiológica e entra num “repouso” com redução das atividades metabólicas e diminuição da água nos tecidos. Esse “repouso” é denominado de quiescência (M. J. Considine & J. A. Considine, 2016), as sementes não encontram condições exteriores favoráveis à sua germinação e entram num período de pausa. O estado de quiescência é observado ao nível celular, tecidos, órgãos e organismos em que a atividade metabólica é reduzida ao mínimo possível necessário à sobrevivência até existirem condições favoráveis (O’Farrell, 2011).

A germinação corresponde a um conjunto de processos onde o embrião desenvolve-se até dar origem a uma plântula. O primeiro sinal visual de germinação de uma semente é a rutura da radícula (raiz embrionária) para fora do tegumento. O processo de germinação acontece em três fases principais, a (I) absorção de água, (II) redução da absorção de água e atividade metabólica ativa e por fim (III) o surgir da radícula. Após surgir a radícula inicia-se o desenvolvimento da parte radicular e área da plântula (Hartman et al., 2002). Fatores com a água, luz, temperatura e gases (oxigénio) condicionam a germinação. A idade da semente, reservas, vigor da planta mãe e condições de conservação serão outros fatores a condicionar na germinação das sementes. Em geral sementes não germinam dentro dos frutos devido à dificuldade em realizar trocas gasosas ou devido à presença de substâncias inibidoras da

germinação (Hartman et al., 2002; Barh et al., 2008). Vários estudos demonstram a importância de hormonas dentro da semente de diferentes espécies, responsáveis por regular e promover a germinação, além de quebrar a dormência com as giberelinas, citocinas entre outras (Hartman, 1997; Dayking et al., 1997; Picolotto et al., 2007).

A dormência nas sementes é difícil de definir, caracterizar ou avaliar por existirem diversos fatores que poderão impor ou influenciar internamente, externamente ou ambos a germinação das sementes. De forma simples, uma semente viável apresenta dormência quando, em condições favoráveis de germinação, as sementes não germinam (Hilhorst, 1995; Hartman, 1997), termo contrário ao estado de quiescência. A dormência nas sementes pode ser uma adaptação da própria semente para controlar o tempo e condições em que germina ou uma adaptação adicional para evitar germinar em condições desfavoráveis ou de stresse ambiental.

Existem dois tipos de dormência. A dormência primária é o tipo de dormência que afeta a semente na altura da sua maturação quando ainda está na planta-mãe e é uma característica específica das sementes de algumas espécies. Normalmente esta dormência permanece após dispersão. Existem causas exógenas que estão relacionadas com a impermeabilidade do tegumento ou revestimento relacionado com a própria fisiologia da semente. Causas endógenas estão associadas a fatores fisiológicos ou morfológicos relacionadas como o desenvolvimento do embrião (embrião imaturo). Por Baskin C. C. & Baskin, J. M. (2001) a dormência pode ser dividida em cinco tipos, de acordo com os mecanismos de dormência, são a dormência física, dormência fisiológica, dormência morfológica, dormência morfofisiológica e dormência combinada (física + fisiológica). A dormência secundária é induzida quando as condições ambientais são desfavoráveis ou situações de stresse relacionadas com a água, luz e temperatura (Lopes, 2012; Hartman, 1997). Perceber os mecanismos de dormência ou tipo de dormência são essenciais para aplicar o melhor método de quebra da dormência com objetivo de aumentar a taxa e uniformidade da germinação.

Os métodos para ultrapassar a dormência são tratamentos pré-germinativos como escarificação mecânica, escarificação química com ácido, estratificação a frio ou a quente, escaldão ou imersão em solução de nitrato de potássio, etileno ou ácido giberélico. Se a dormência for relacionada com a dureza do tegumento poderá aplicar-se escarificação mecânica, escarificação química com ácido sulfúrico, imersão em água quente ou fria com variações nas temperaturas e tempo de contato/imersão (Gomes, 2020). Nas espécies *Acacia dealbata* Link. e *Acacia longifolia* (Andrews) Willd. no trabalho de Marques (2014) foi aplicado um escaldão em água quente como método de quebra de dormência, um método adequado uma vez que são espécies conhecidas como pirófilas, com dormência associada à

dureza do tegumento. Por outro lado, se a dormência for do embrião deverá aplicar-se como tratamento pré-germinativo a estratificação a frio, a quente ou a combinação de ambas. As combinações de diferentes tratamentos pré-germinativos poderão ser necessárias para algumas espécies com o objetivo de obter maior taxa e uniformidade na germinação.

No género *Arbutus* é conhecida dormência endógena da semente devido ao embrião considerada dormência primária (Tilki, 2004; Smiris et al., 2006). Diversos trabalho tem sido desenvolvidos para a quebra da dormência principalmente recorrendo a tratamentos de estratificação a frio e adição de ácido giberélico em diferentes concentrações (Karam e Al-Salem, 2001; Tilki et al., 2004; Smiris et al., 2006; Demirsoy et al., 2010, Ertekin e Kirdar, 2010; Martins, 2012; Pinis et al., 2017). Resultados demonstram que estratificação a frio por 30 e superior a 60 dias são os tempos de estratificação com melhores resultados para a germinação (Tilki, 2004; Ertekin e Kirdar, 2010; Pipinis et al., 2017; Vilhena, 2019). A adição de ácido giberélico nas concentrações de 500 mg/L (Tilki, 2004) e 2000 mg/L (Pipinis et al., 2017) apresentam os melhores resultados. A combinação de estratificação a frio e adição de ácido giberélico testado por Pipinis et al., (2017) com 30 dias de estratificação e as concentrações de GA₃ de 2000 mg/L, 1000 mg/L e 500 mg/L proporcionou germinações entre 82 % e 98%. O ácido giberélico é uma hormona vegetal descoberto em meados dos anos 1930 que atua como um regulador natural do crescimento das plantas para o alongamento do caule, germinação de sementes (simulando as condições de frio), aumento do tamanho dos frutos e efeitos na resposta ao stresse (Palmer, 1974; Taiz et al., 2007; Camara et al., 2018; Shah et al., 2023).

A temperatura, à semelhança de outras espécies mediterrânicas, influencia a germinação do medronheiro. Ricardo et al. (1987) obteve boas taxas de germinação para sementes de medronheiro a temperaturas entre os 15 °C e os 20°C. Hammami et al., (2005) refere que a temperatura ideal para a germinação é 20°C, e Simiris et al., (2006) refere também que acima desse valor não existe germinação.

No “Manual Boas Práticas para Culturas Emergentes. A cultura do medronho” elaborada pela Associação de Jovens Produtores (AJAP) a percentagem germinação para o medronheiro varia entre 60% e 90% (AJAP, 2017), já para o CENASEF (2022) é considerada uma taxa de germinação entre 50% e 60%.

3.3. Propagação vegetativa - Micropropagação

A micropropagação permite obter plantas geneticamente iguais, clones, assegurando uma ou várias características desejadas. A micropropagação envolve diversos processos e técnicas de seleção, desinfecção, estabelecimento, preparação e propagação em ambiente livre de doenças, fungos e bactérias num suporte físico de meio de cultura (líquido ou sólido) com nutrientes, açúcares, vitaminas e hormonas essenciais ao desenvolvimento vegetativo e sujeitas a condições de temperatura e luz controlada (Canhoto, 2010; Trigiano e Gray, 2004). A micropropagação permite produzir clones de células somáticas ou de um pedaço de tecido vegetal, como rebentos e ápices (micropropagação por gomos axilares). Em plantas lenhosas os métodos de micropropagação usualmente utilizados são vários, alguns dos mais utilizados são a proliferação de rebentos obtidos de ápices ou segmentos nodais (Gomes & Canhoto, 2009). A figura 5 mostra o método de micropropagação por multiplicação de gomos axilares, apresentando as fases de estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização.

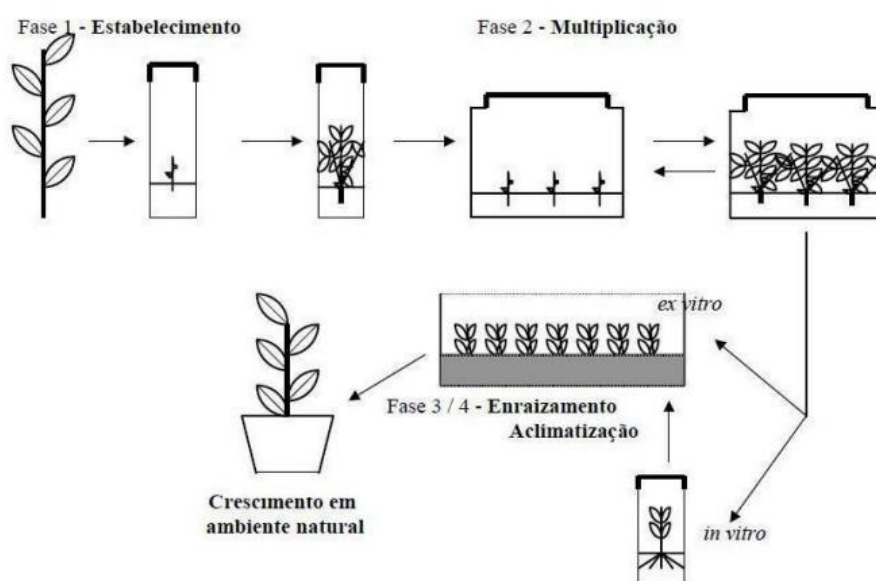


Figura 5 - Esquematização das fases da micropropagação desde o estabelecimento (Fase 1) à aclimatização (fase 4), retirado de (Beltrame, 2013).

Fonte: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/26024/2/Tese%20de%20MBBV%20-%20Micropropaga%C3%A7%C3%A3o-%20Helen.pdf>

As vantagens da micropropagação são várias desde a seleção e propagação de características desejadas como a resistência a uma doença ou a característica de dominância apical, produção livre de doenças e antecipação da produção de fruto (Aljane et al., 2018) em relação a plântulas

obtidas de semente. Esta técnica tem desvantagem relacionada com os custos e a especialização de mão de obra.

Na fase de estabelecimento, apresentado na figura acima, existem diferentes técnicas para conseguir o material vegetal necessário, uma das opções é realizar o corte em campo de ramos lenhoso adultos/jovens, desinfetar e colocar em água de modo a criar condições/promover o abrolhamento de gomos. Esses gomos poderão ser utilizados para estabelecer rebentos e ápices. Outra técnica, menos usual, mas utilizada quando existe proximidade à árvore de colheita e condições climáticas adequadas (primavera), é a colheita de rebentos diretamente da árvore, desinfecção e estabelecimento dos rebentos ou de ramos mais jovens com gomos dormentes diretamente no meio de cultura para posterior abrolhamento.

A fase de multiplicação ocorre no laboratório (*in vitro*) em zona com temperatura e luz controlada em que os rebentos são multiplicados em meio de cultura (líquido ou sólido) composto essencialmente por com nutrientes, açúcares, vitaminas e hormonas vegetais em quantidades adequadas às espécies.

A fase de enraizamento e aclimatização, são fases que poderão ser realizadas em simultâneo, no entanto poderá se estimular a produção radicular ainda numa fase *in vitro*. A escolha do tipo de enraizamento é sempre aplicada de acordo com os resultados mais satisfatórios para uma espécie ou família. A aclimatização é uma fase crucial de passagem e adaptação das plântulas em condições *in vitro* para condições *ex vitro*, fora do laboratório.

3.3.1. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização

O enraizamento na micropropagação poderá ser feito em condições *in vitro* ou *ex vitro* (Canhoto, 2010). Em condições *in vitro*, o enraizamento é estimulado ainda no meio de cultura (líquido ou sólido) de multiplicação. Por vezes as raízes formadas no enraizamento *in vitro* podem ter alguma dificuldade de eficiência e sobrevivência na fase de aclimatização referido por diferentes autores para diferentes espécies (McClelland et al., 1990; Augusto, 2006). Raízes formadas *in vitro* devem ser lavadas para limpar o meio (normalmente com açúcares) e evitar contaminações principalmente por fungos. Para promover o enraizamento tanto em *in vitro* como *ex vitro* utilizam-se auxinas (Gonçalves, 1998; Canhoto, 2010; Beltrame, 2013).

A aclimatização é na micropropagação o processo intermédio da produção em laboratório e a passagem das plântulas para condições de viveiro. É a fase entre a produção *in vitro* e a sua transferência para condições *ex vitro* de plantas micropropagadas. Este processo de passagem

de condições controladas em laboratório para condições externas é muito stressante para as plântulas por isso exige cuidados e tempo. Nesta fase ocorrem por vezes perdas elevadas que causam prejuízos económicos. Em condições *in vitro* as plântulas apresentam características fisiológicas e morfológicas alteradas ou atrofiadas como a ausência de estomas funcionais, presença de uma cutícula fina (que não impede a dessecação) nas folhas e pouca eficiência fotossintética (Pospíšilová et al., 1999; Sutter, 1984). Assim, as plântulas têm de ser expostas a luz, humidade e temperatura igual às condições exteriores de forma gradual de modo a permitir a sua adaptação, promover o seu desenvolvimento e reduzir a mortalidade (Bolar et al., 1998). Para o castanheiro, Gonçalves (1991) refere que é importante tratamento com fungicida antes de colocar as plântulas em condições de aclimatização e deve haver rega por nebulização para garantir humidade relativa alta semelhante há que existe em condições *in vitro*.

Para o medronheiro o enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a aclimatização é a alternativa mais fácil e barata de aplicar com resultados semelhantes e positivos em relação ao enraizamento *in vitro* (Martins, 2015; Canhoto, 2010; Figueiredo et al., 2013; Gomes & Canhoto, 2019). O enraizamento *ex vitro* é diferente do *in vitro* por permitir obter raízes funcionais que se desenvolvem e proliferam num substrato semelhante ao solo em campo.

4. Associações simbióticas- Micorrizas

As micorrizas são associações simbióticas entre as raízes das plantas e os fungos de algumas espécies com benefícios no crescimento e desenvolvimento para ambos. Nesta associação os fungos ajudam na absorção de água e nutrientes como o fósforo e as plantas em troca fornecem fotoassimilados (como hidratos de carbono).

Existem diferentes tipos de micorrizas, caracterizadas pela associação que estabelecem, morfologia, características do fungo e da planta. As ectomicorrizas são o tipo de fungos micorrízicos mais comuns a estabelecer relação com as raízes de árvores florestais (Richard et al., 2005), como o castanheiro, sobreiro e pinheiros. As ectomicorrizas caracterizam-se pela presença de micélio junto às raízes muitas vezes possível de observar a olho nu no torrão das plantas em viveiro. O fungo desenvolve-se junto à raiz formando um manto e as hifas penetram entre os espaços intercelulares (Machado et al., 2011). Este tipo de micorrizas, as ectomicorrizas são importantes em solos pobres ao nível da disponibilidade de água e nutrientes para a planta. Assim, pelo manto e micélio exterior no solo que formam são capazes de oferecer

maior área de absorção de água e facilitar a absorção de certos nutrientes no solo garantindo a sobrevivência e melhor crescimento da planta (Smith & Read, 1997).

As espécies mais conhecidas de fungos que formam ectomicorrizas são o *Pisolithus tinctorius*, *Lactarius delectiosus* e *Boletus* sp. São essencialmente conhecidos o *Lactarius delectiosus* e *Boletus* sp. pelas suas frutificações (carpóforos) com valor gastronómico e económico. Assim, as micorrizas além de oferecerem benefícios às plantas representam também um acréscimo de valor económico para os produtores.

No medronheiro diversos trabalhos têm sido desenvolvidos no âmbito do estabelecimento de micorrizas com as raízes do medronheiro com importantes benefícios de sobrevivência e desenvolvimento para as plantas, nomeadamente com o *Lactarius delectiosus* e *Tuber borchii* (Gomes et al., 2016; Gomes et al., 2021).

5. Objetivos

O ensaio de germinação teve como objetivo avaliar a germinação de sementes de medronheiro armazenadas de frutos colhidos desde os anos 2018 a 2023 sujeitas a diferentes tratamentos pré-germinativos. Os tratamentos pré-germinativos consistiram na estratificação húmida a frio (4°C) durante diferentes períodos de tempo, comparativamente com o controlo (sem aplicação de estratificação húmida a frio) e, ainda, a adição de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) vs sem vs juntamente com estratificação húmida a frio (4°C) durante 30 dias. Foram ainda testadas três condições de sementeira diferentes para avaliação da capacidade germinativa e, em particular para aplicação em viveiro.

Com este ensaio pretende-se avaliar o melhor tratamento pré-germinativo, para quebrar a dormência da semente de medronheiro para comercialização de sementes armazenada desde 2018, proveniente do pomar produtor de semente, instalado na ESAC e ainda, com possíveis sugestões para aumentar a taxa e uniformidade da germinação do medronheiro com perspectiva de praticidade (aplicação em viveiro).

O ensaio do enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a aclimatização teve como objetivo melhorar o enraizamento e a aclimatização de plântulas de medronheiro obtidas por micropropagação com a perspectiva de aplicação em larga escala, a redução do período de tempo e obtenção de maiores taxas de sobrevivência e enraizamento. Para este objetivo testaram-se diferentes substratos com e sem aplicação de um estimulante radicular. Em dois tipos de substratos foi testada a adição de ectomicorrizas (pastilha comercial). No substrato com menor teor de nutrientes e pH mais baixo (ácido), foi testado a adição de corretivo (calcário), fósforo e adubo de libertação controlada, em concentrações diferentes.

6. Material e Métodos

O presente relatório apresenta dois ensaios com objetivos de avaliação distintos, ambos relevantes para o programa de melhoramento do medronheiro. Nos ensaios realizados o objetivo geral em ambos coincide com o melhoramento de processos envolvidos na produção de plantas de origem seminal (provenientes do pomar produtor de sementes) ou de propagação vegetativa, micropropagação de clones selecionados, para a instalação de ensaios de progénie/descendência e ensaios clonais respetivamente, para avaliação dos progenitores e clones da sua interação com o meio ambiente.

I- Ensaio de tratamentos pré-germinativos

6.1. Material seminal

O material de origem seminal utilizado no ensaio foram sementes de duas famílias e um acesso, as famílias AL3 e AL6 e o acesso PEN. No acesso PEN foram testadas sementes de dois acessos diferentes o PEN 22 e PEN 17. Estes acessos foram anteriormente avaliados no programa de conservação e melhoramento do medronheiro (Francisco, 2021). O acesso PEN 17 foi integrado no programa de conservação na reserva *ex situ* na Lousã e, ambos incluídos em 2020 no banco clonal da Escola Superior Agrária de Coimbra para programa de melhoramento, em função das características do fruto (teor de sólidos solúveis; teor de açúcares; teor de esclerênquima; calibre e dureza do fruto). Das famílias AL3 e AL6 as sementes testadas no ensaio são sementes de frutos colhidos dos anos 2019 a 2023 no pomar produtor de sementes (instalado em 2015 na ESAC). As árvores das famílias AL3 e AL6 presentes no pomar produtor de sementes são clones de árvores selecionadas em campo localizadas em Oleiros, concelho de Castelo Branco. Do acesso PEN foram testadas sementes extraídas de frutos colhidos no campo em 2018 em árvores selecionadas localizadas em Penamacor, distrito de Castelo Branco.

No ensaio as sementes testadas foram das famílias AL3 e AL6 do ano 2019 a 2023 e do acesso PEN do ano 2018 correspondendo a um total de 11 modalidades (*) (2 famílias x 5 anos + 1 acesso x 1 ano) nas condições de sementeira 1 e 2 ou na condição de sementeira 3 com individualização do acesso PEN em PEN 22 e PEN 17, corresponde a um total de 12 modalidades (**) (2 famílias x 5 anos + 2 acessos x 1 ano) como mostra de forma resumida e esquematizada a tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização das famílias/acesso dos lotes de sementes testados, relativos à colheita de fruto e posterior processamento desde 2018 a 2023. Condição 1- Caixas; Condição 2- Alfobre e Condição 3- Sementeira direta.

Família/Acesso	Ano	Condição
AL3	2023	1, 2 e 3
AL6		
AL3	2022	
AL6		
AL3	2021	
AL6		
AL3	2020	
AL6		
AL3	2019	
AL6		
PEN22/17	2018	1 e 2 *
PEN22	2018	3 **
PEN17		

A quantidade de semente das famílias ou acesso não é igual de 2018 a 2023, uma vez que em 2018 a quantidade de fruto colhido seja em campo ou no pomar foi escassa. Desde 2019 as sementes armazenadas e conservadas são provenientes das árvores do pomar produtor de semente instalado na ESAC.

As sementes testadas no ensaio estavam armazenadas em frascos de plástico ou vidro no frigorífico (figura 6) à temperatura de cerca de 4°C.



Figura 6 - Conservação de sementes desde 2018 a 2021, armazenadas em contentores de vidro ou plástico hermeticamente fechados com película aderente conservados a frio (4°C).

As sementes testadas no ensaio foram sementes sujeitas a todo o processo de extração, limpeza e secagem da semente no mínimo há mais de 3 meses e no máximo 5 anos para as sementes de 2018.

6.2. Metodologia para caracterização dos lotes de semente

Para a caracterização dos lotes de semente procedeu-se à semelhança do inumerado em Sementes de Árvores e Arbustos Florestais, Catálogo de sementes 2024/2025, na Análise Laboratorial (CENASEF, 2024) realizada aos lotes de sementes pelo ICNF, CENASEF foram avaliados o nº de sementes/kg, nº de semente/litro, peso de 1000 sementes, humidade (%), viabilidade (%) e grau pureza (%).

A viabilidade das sementes foi testada através do teste de tetrazólio. As sementes foram cortadas ao meio, mergulhadas numa solução de cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio preparada a 0,25% e deixadas dois dias numa estufa a cerca de 25°C. Posteriormente foram contadas as sementes coradas.

Para o cálculo do grau de pureza como amostra foi utilizado a medida de uma colher (figura 7 a). Primeiro pesou-se a amostra, posteriormente separou-se a semente do lixo e por último procedeu-se à avaliação apenas do peso das sementes na amostra (figura 7 b).

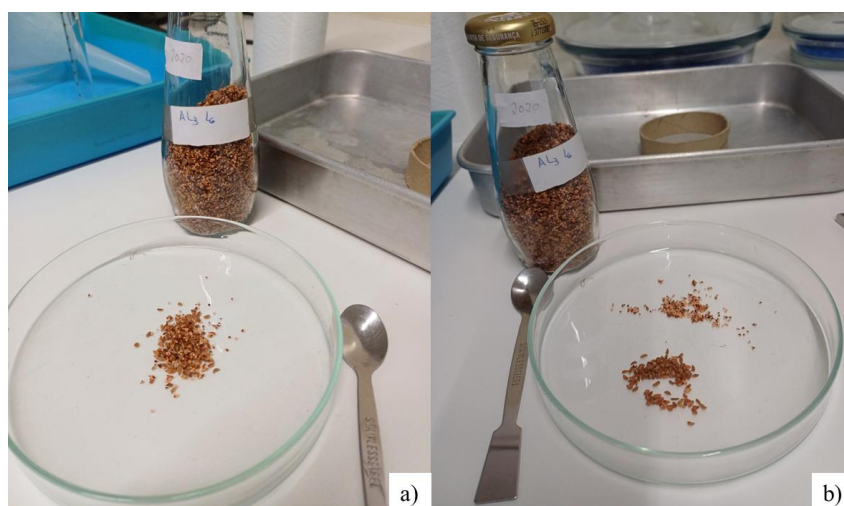


Figura 7 - Separação da semente do que não é semente.

No nosso caso, processamento manual do fruto (sem limpeza da semente por densidade), as impurezas são constituídas principalmente por partes duras da casca e o esclerênquima. O grau de pureza permite estimar a proporção de sementes no lote e conseqüentemente a quantidade necessária para a produção de um determinado número de plantas também em função da sua viabilidade.

Para determinar o peso de 1000 sementes, foi estimado por repetição de amostras individuais de 10 a 20 sementes.

6.3. Caraterização dos tratamentos pré-germinativos e condições de germinação

No total foram estabelecidos 10 tratamentos pré-germinativos em três condições diferentes de sementeira utilizando lotes de sementes de medronheiro dos anos de 2018 a 2023 de duas famílias (2019 a 2023) e acesso (2018). Para a quebra de dormência da semente de medronheiro vários autores testaram diversos tratamentos pré-germinativos com diferentes períodos de estratificação húmida a frio (4° C) e uso de ácido giberélico (GA₃) em diferentes concentrações (Martins, 2012; Karam e Al-Salem 2001; Tilki, 2004; Smiris et al., 2006; Demirsoy et al., 2010; Ertekin e Kirdar, 2010 e Vilhena, 2019). Os tratamentos pré-germinativos testados no ensaio consistiram em diferentes períodos de estratificação húmida a frio, adição de ácido giberélico em diferentes concentrações e a combinação de ambos. Na tabela 2 são identificados os tratamentos pré-germinativos testados no ensaio e sua descrição.

Tabela 2 - Caraterização dos tratamentos pré-germinativos testados, nº de semanas de estratificação a frio e descrição do tratamento (nº de dias de estratificação/ com e sem aplicação prévia de GA₃)

Tratamento	Nº de semanas	Descrição
C	0	Controlo, sem qualquer pré-tratamento;
1	1	1 semana de estratificação a 4 °C e selado com película aderente (recomendado - Altriflorestal);
2	2	15 dias de estratificação a 4 °C e selado com película aderente;
3	4	30 dias de estratificação a 4 °C e selado com película aderente;
4	6	45 dias de estratificação a 4 °C e selado com película aderente;
5	8	60 dias de estratificação a 4 °C e selado com película aderente (recomendado - ICNF);
6	4	30 dias de estratificação a 4 °C e selado com película aderente + 500 mg/L de GA ₃ durante 24 horas;
7	4	30 dias de estratificação a 4 °C e selado com película aderente + 1000 mg/L de GA ₃ durante 24 horas;
8	4	30 dias de estratificação a 4 °C e selado com película aderente + 2000 mg/L de GA ₃ durante 24 horas;
9	0	0 dias de estratificação + 2000 mg/L de GA ₃ durante 24 horas.

No tratamento C, considerado o controlo, as sementes foram semeadas sem aplicação de nenhum tratamento pré-germinativo. Este é o tratamento realizado na ESAC para obtenção de plantas de medronheiro de origem seminal, com recurso a sementes do ano (em geral) ou de anos recentes (e conservadas a frio). As sementes são semeadas no substrato e colocadas em condições ideais de germinação sem qualquer tratamento pré-germinativo.

Do tratamento 1 a 5, o tratamento pré-germinativo testado consistiu na estratificação húmida a frio de 1 semana, 15, 30, 45 e 60 dias respetivamente. Uma semana de estratificação húmida a frio é o tempo recomendado pelo Laboratório de Micropropagação- Protocolo de sementeira de medronheiro pela Altriflorestal (Altriflorestal, 2024). O período de 60 dias, cerca de 8 semanas, 2 meses é o tempo de estratificação recomendado em “Regras básicas para o manuseamento de sementes florestais. Guia técnico” do autor Divisão de Apoio à Produção Florestal e Valorização de Recursos Silvestres (CENASEF) pelo ICNF (CENASEF, 2014) e

no Catálogo de sementes de 2022 (ICNF, 2022). No ensaio o tempo mínimo de estratificação húmida a frio testado foi de 1 semana e o máximo foi de 60 dias, cerca de dois meses.

Dos tratamentos 6 a 8, o tratamento pré-germinativo testado foi a combinação da estratificação húmida a frio e adição de ácido giberélico. As sementes para estes tratamentos foram previamente mergulhadas numa solução de ácido giberélico em concentrações de 500 mg/L, 1000 mg/L e 2000 mg/L respetivamente durante 24 horas antes de se realizar a sementeira. Posteriormente aplicou-se a estratificação a frio por 30 dias (tratamentos 6 a 8). O tratamento 9, último tratamento do ensaio, é semelhante ao tratamento 8 (estratificação húmida a frio de 30 dias e ácido giberélico na concentração de 2000 mg/L) na concentração de GA₃ utilizada, mas sem aplicação de uma estratificação húmida a frio, as sementes, após tratamento com GA₃, foram colocadas em condições ideais de germinação. Em Pinis *et al.* (2017) a utilização do ácido giberélico mostra resultados interessantes com valores superiores a 80% de germinação nas concentrações de 2000 mg/L sem estratificação e nas concentrações 500 mg/L, 1000 mg/L e 2000 mg/L com 30 dias de estratificação. Perante estes resultados e do conhecimento da ação positiva do ácido giberélico na germinação (simulação do frio), foram testadas no presente ensaio estas concentrações e períodos de estratificação. O conjunto destes tratamentos pré-germinativos foram aplicados para as sementes de 2 famílias e 1 acesso dos anos de colheita 2018 a 2023 (em três condições de germinação- Tabela 1).

As três diferentes condições de sementeira testadas no ensaio foram condição 1, caixas de germinação, condição 2, sementeira em alfobre e a condição 3, a sementeira direta em contentores. Na condição 1 o objetivo seria simular a germinação nas condições semelhante ao que se faria numa placa de Petri em laboratório, corresponde ao método utilizado pelas empresas de celulose para a semente de eucalipto e híbridos. A condição 2 e 3 seriam as condições de germinação mais fáceis e práticas para testar fora de um laboratório, no caso de um produtor em viveiro.

Na condição 1, designada de caixas de germinação, foi utilizada uma caixa de plástico sem tampa onde se utilizou como substrato uma mistura de perlite e vermiculite na mesma proporção (50:50, v:v) humedecida com água (figura 8, a) a preencher parcialmente a caixa (figura 8, b) com o objetivo de manter a humidade, favorável à germinação.



Figura 8 - Preparação da mistura perlite:vermiculite (50:50; v/v).

Por cima da mistura de perlite e vermiculite foi colocado um papel em “harmónica” (figura 9) seguro por *clips*. A sementeira nesta condição foi realizada diretamente nas separações criadas pelo papel. Essas separações permitiram individualizar as sementes por família/acesso e ano. Posteriormente as sementes foram cobertas com vermiculite. A vermiculite colocada como cobertura das sementes teve como objetivo manter a humidade, durante o período de estratificação e posterior germinação.



Figura 9 - Condição 1, caixas, pormenor do papel em "harmónica" para individualização da sementeira.

As caixas foram colocadas aos pares em tabuleiros de plástico e as identificações colocadas individualmente dentro das caixas de lado (figura 10).



Figura 10 - Exemplo de duas caixas preparadas já com as sementes em tabuleiro de plástico.

A condição 2, sementeira em alfofre (figura 11) o suporte físico utilizado foi um garrafão de plástico de 5 litros lavado e desinfetado. Os garrafões em posição horizontal foram perfurados em baixo e no lado contrário cortados de forma a ficar com uma “tampa”. Os furos na parte de baixo dos garrafões são importantes na fase de germinação para permitir o escoamento do excesso de água. A “tampa” serviu na fase de estratificação juntamente com a película aderente para manter e reduzir perda de humidade. O substrato utilizado foi igual ao da condição 1, perlite e vermiculite (50:50, v:v). A separação entre sementes no garrafão foi estabelecida por etiquetas com a identificação da família/acesso por ano. No final da sementeira, as sementes foram cobertas com vermiculite com o objetivo de manter a humidade.



Figura 11 - Exemplo de garrafão preparado, condição 2 (sementeira em alfofre).

As etiquetas com a identificação do tratamento foram colocadas na alça de plástico junto à tampa de cada garrafão.

A condição 3 consistiu na sementeira direta (figura 12) em contentores de sementeira com alvéolos individuais de 35 ml de volume. Cada contentor tinha no total 160 alvéolos, 10 colunas de 16 alvéolos. O substrato utilizado foi um substrato comercial, o BioBizz Light-Mix (Anexo I). Em cada alvéolo foi colocado uma semente e posteriormente coberta com vermiculite. A vermiculite foi utilizada com o mesmo objetivo das condições anteriores (manutenção da humidade).



Figura 12 - Condição 3, sementeira direta em contentores, preparação dos tabuleiros de sementeira.

As etiquetas nesta condição foram presas ao contentor e cada etiqueta identificava o tratamento e a 1ª família/acesso por ano semeado para posterior monitorização da germinação.

Após a sementeira nas três condições e para todos os tratamentos pulverizou-se com Pomarsol¹ (substância ativa tirame) um fungicida preparado na concentração de 1,5 g por litro, com o objetivo proteger as sementes de fungos principalmente nos tratamentos sujeitos a estratificação húmida a frio.

¹) Ficha técnica do produto: https://cropscience.bayer.pt/internet/images/produtos/prod_file8_66.pdf

6.4. Delineamento experimental e trabalhos prévios à sementeira

No presente ensaio foram testados 10 tratamentos pré-germinativos em três condições de sementeira diferentes com duas repetições para cada tratamento, família/acesso e ano. No caso das condições 1 e 2 para cada tratamento pré-germinativo foram utilizados duas caixas/garrafões onde cada caixa/garrafão representa uma repetição (total duas repetições). Em cada caixa/garrafão continha todas as famílias/acesso por ano. Na condição 1 ou 2, foram utilizadas 15 sementes por repetição, 15 sementes por caixa/garrafão de todas as famílias/acesso por ano. No total num tratamento na condição 1 ou 2 foram utilizadas duas caixas/garrafões, 30 sementes por família/acesso e ano para as duas repetições. As famílias/acesso por ano foram distribuídas nas caixas/garrafões como é mostrado na tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição das sementes nas condições 1 e 2 caixas / garrafão por tratamento pré-germinativo.

Família/Acesso	Ano
AL3	2023
AL6	2023
AL3	2022
AL6	2022
AL3	2021
AL6	2021
AL3	2020
AL6	2020
AL3	2019
AL6	2019
PEN22/17	2018

Na condição 3, diferente das condições 1 e 2, o acesso PEN foi individualizado em PEN 17 e PEN 22 resultando em 12 modalidades (2 famílias x 5 anos + 2 acesso x 1 ano) como foi mostrado na tabela 1. Cada contentor tinha 10 colunas com 16 alvéolos e como foram utilizadas 15 sementes por repetição/tratamento pré-germinativo em 12 modalidades (família/acesso x ano) dando um total por tratamento de 2 repetições x 12 modalidades (= necessidade de 24 colunas com 15 alvéolos cada), assim, foram utilizados dois contentores completos (10 colunas x 2) e apenas 4 colunas de um terceiro contentor por tratamento, sem utilizar o último alvéolo de cada coluna. As sementes por família/acesso e ano na condição 3 foram distribuídas nos contentores para o tratamento C, controlo, como são mostradas na tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição da famílias e acesso por ano nas repetições e para o tratamento C (controle).

Contentor 1			Contentor 2			Contentor 3		
C1	AL3	2023	C1	PEN22	2018	C1	AL6	2019
C2	AL6	2023	C2	AL6	2019	C2	PEN22	2018
C3	AL3	2022	C3	AL3	2019	C3	AL6	2023
C4	AL6	2022	C4	AL6	2020	C4	AL3	2023
C5	AL3	2021	C5	AL3	2020			
C6	AL6	2021	C6	AL6	2021			
C7	PEN17	2018	C7	AL3	2021			
C8	AL3	2020	C8	PEN17	2018			
C9	AL6	2020	C9	AL6	2022			
C10	AL3	2022	C10	AL3	2022			

Para os restantes 9 tratamentos, incluído os tratamentos com GA₃, as sementes por família/acesso e ano foram distribuídas nos contentores como é mostrado na tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição da famílias e acesso por ano nas repetições por tratamento (com exceção do controle).

Contentor 1			Contentor 2			Contentor 3		
C1	PEN22	2018	C1	AL3	2023	C1	AL3	2023
C2	PEN17	2018	C2	AL6	2023	C2	AL6	2023
C3	AL3	2019	C3	AL3	2022	C3	PEN22	2018
C4	AL6	2019	C4	AL6	2022	C4	PEN17	2018
C5	AL3	2020	C5	AL3	2021			
C6	AL6	2020	C6	AL6	2021			
C7	AL3	2021	C7	AL3	2020			
C8	AL6	2021	C8	AL6	2020			
C9	AL3	2022	C9	AL3	2019			
C10	AL6	2022	C10	AL6	2019			

As duas repetições por tratamento permitiram avaliar estatisticamente o efeito do tratamento na germinação de sementes de diferentes famílias/acesso e ano. No ensaio instalado, para cada repetição utilizaram-se 15 sementes por 2 famílias x 5 anos (de 2019 a 2023) e dois acessos de 2018 em cada tratamento e em três condições. Por exemplo, no total para a condição 1 da família AL3 de 2020 considerando todos os tratamentos e as duas repetições foram necessárias 300 sementes (15 sementes x 2 repetições x 10 tratamentos). Essas 300 sementes foram necessárias para outras duas condições de germinação. Assim, para uma família/acesso no ano

considerando todos os tratamentos e as três condições foram necessárias 900 sementes (300 sementes x 3 condições de germinação).

De modo a facilitar o trabalho da sementeira foi realizado o trabalho prévio de contagem e separação em 15 sementes (x 2 vezes) ou 30 sementes por família/acesso e ano por tratamento e condição de germinação. Previamente 24 horas antes da sementeira preparou-se também a solução de GA₃ e imergiram-se as sementes na solução. Posteriormente as sementes contadas e separadas foram guardadas em “unidades” de papel agrafado ou em frascos de vidro, no caso dos tratamentos com GA₃, por tratamento e condição.

No total foram separadas as sementes em “unidades” individuais com 15 (figura 13 à esquerda) ou 30 sementes (figura 13, à direita) para cada tratamento no caso dos tratamentos sem aplicação do GA₃ (total de 6 tratamentos).

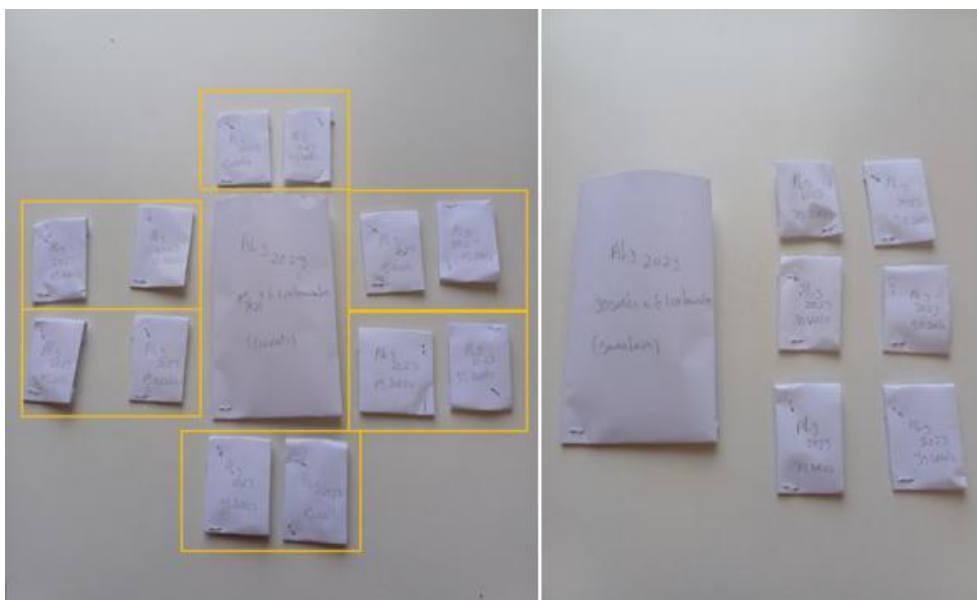


Figura 13 - Trabalho prévio de separação de 15 ou 30 sementes em "unidades" individuais por família e ano e tratamento.

No caso em que as sementes foram separadas individualmente em 15 sementes, como mostra na figura 13 à esquerda) foram no total 12 “unidades” individuais com 15 sementes, isto é, 6 “unidades” com 15 sementes (por repetição) para os 6 tratamentos (sem GA₃), (total de 12 “unidades”). A figura 13 à direita mostra também um exemplo para a condição 3, sementeira direta, de apenas 6 “unidades” com 30 sementes representando os 6 tratamentos. As “unidades” de papel individuais com as sementes foram guardadas em frio, numa “unidade” de papel maior por família/acesso / ano e por condição de germinação.

A figura 14 mostra um exemplo da separação em “unidades” para o acesso PEN 17 na condição 3, sementeira direta.

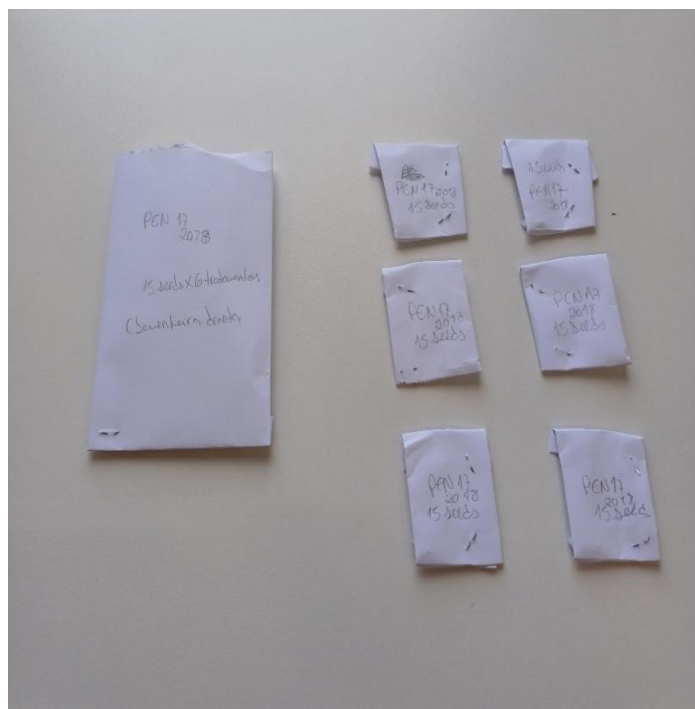


Figura 14 -Trabalho prévio de separação de 15 sementes em "unidades" individuais por acesso e tratamento

No caso dos tratamentos com GA₃ (total foram 4 tratamentos), as sementes foram contadas, separadas e guardadas em frascos de vidro. A figura 15 mostra a separação das sementes em frascos de vidro da família AL3 do ano 2023 para um tratamento com GA₃. Os quatro frascos de vidro correspondem aos 4 tratamentos diferentes com GA₃.



Figura 15 - Trabalho prévio de separação das sementes para os tratamentos com GA₃ (por família/acesso/anos).

No total são 90 sementes num frasco de vidro em que cada frasco representa um tratamento com GA₃, assim são 30 sementes nas 3 condições (30 sementes x 3 condições) dá um total de

90 sementes para cada tratamento. As 30 sementes representam as duas repetições, 15 sementes por repetição.

A monitorização do ensaio de germinação foi realizada sempre que possível semanalmente pela contagem total de germinação em cada família/acesso, ano, tratamento e condição durante um período cerca de 13 semanas de 26 de fevereiro de 2024 até 8 de junho de 2024 com um total de 14 observações.

6.5. Instalação e local do ensaio

A instalação do ensaio foi realizada em quatro dias (com 5 operadores), dias 30 e 31 de janeiro e 1 e 2 de fevereiro de 2024. O calendário dos tratamentos e condições instalados nos quatro dias são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Calendarização da instalação do ensaio em 4 dias e respetivos tratamentos e condições de germinação.

30/jan	Condição 1- Tratamentos C, 1 a 5	Tratamentos	
	Condição 3 - Tratamentos C, 1 e 2	C	Controlo, sem pré-tratamento
31/jan	Condições 1, 2 e 3 - Tratamentos 6 a 9	1	1 semana de estratificação
01/fev	Condição 2 - Tratamentos C, 1 a 5	2	15 dias de estratificação
02/fev	Condição 3 - Tratamentos 2 a 5	3	30 dias de estratificação
		4	45 dias de estratificação
		5	60 dias de estratificação
		6	30 dias de estratificação + GA ₃ (500 mg/L)
		7	30 dias de estratificação + GA ₃ (1000 mg/L)
		8	30 dias de estratificação + GA ₃ (2000 mg/L)
		9	0 dias de estratificação + GA ₃ (2000 mg/L)

Os tratamentos sujeitos a estratificação húmida a frio, foram retirados da câmara de frio ao fim de cumprirem os períodos de estratificação de acordo com a tabela 2 no fim do dia entre as 17h e as 19h.

O local do ensaio foi no edifício principal da Escola Agrária de Coimbra no laboratório VALOREN, na sala G2.12. O local escolhido para o ensaio oferecia luz natural através de janelas localizadas à direita na sala. A rega das sementes e plântulas foi realizada de forma manual com recurso a um pulverizador manual pequeno (2,5L) e ainda no caso dos tabuleiros de sementeira através da colocação da parte inferior dos tabuleiros em água para haver absorção da água por capilaridade. O local escolhido teve como objetivo garantir condições favoráveis

à germinação (evitando as temperaturas baixas no início e na parte final do ensaio temperaturas superiores a 20 °C).

A estratificação a frio foi realizada na câmara de conservação de produtos hortícolas ARNEG, modelo DB- 4 TN localizada na sala do ensaio. Com a câmara foi possível controlar a temperatura e humidade. A temperatura para a estratificação a frio foi cerca de 4°C. A figura 15 mostra as caixas, garrações e tabuleiros de sementeira dos tratamentos que foram sujeitos a estratificação acondicionados e devidamente vedados com película aderente na câmara após instalação do ensaio de forma a evitar a perda de água.



Figura 16 - Caixas de germinação, garrações para sementeira em alfobre e contentores de sementeira direta acondicionados na câmara e vedados com película aderente durante o período de estratificação húmida a frio.

6.5.1. Medições de temperatura e humidade

Devido ao local do ensaio depender da temperatura externa associada com as condições climáticas realizou-se entre os dias 26 de fevereiro a 5 de julho de 2024 o registo hora a hora da temperatura (°C) e humidade (%) através de um termohigrógrafo digital.

6.6. Análise estatística dos resultados

O tratamento estatístico dos dados foi realizado por uma análise estatística descritiva recorrendo aos dados registados em tabelas dinâmicas do Excel. Uma análise estatística descritiva organiza, descreve e caracteriza através de cálculos, compara e resume os dados. As ferramentas em geral de estatística descritiva são tabelas, gráficos e as medidas calculadas para descrever os dados como a percentagem, média e desvio padrão (Martins et al., 2007). Uma tabela dinâmica no Excel é uma ferramenta que permite analisar e organizar os dados. Dados brutos são apresentados (média, desvio padrão e erro padrão) e facilmente representados em tabelas ou figuras, para facilitar a sua análise e interpretação.

Foi ainda realizada uma análise de componentes principais com auxílio do programa STATISTICA (versão 12.0) com o objetivo de identificar alguma relação entre as variáveis estudadas e avaliar a percentagem de variância total explicada pelos fatores. Esta análise permite estimar de um modo global a relação entre todas as variáveis estudadas, a referir o tratamento, ano de colheita, condição e taxa de germinação (Miller e Miller, 2010).

II- Ensaio de enraizamento *ex vitro* e aclimatização

6.7. Material vegetal

Neste ensaio foram testados dois clones (Tabela 7) estabelecidos *in vitro* por segmentos nodais ou ápices meristemáticos de árvores selecionadas de medronheiro. O material vegetal testado foi multiplicado regularmente em meio de cultura sólido FS (De Fossard et al., 1974) e meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Os clones eram mantidos numa câmara de crescimento com temperaturas de 20 °C - 25 °C e fotoperíodo de 16/8h.

Tabela 7 -Registo da origem dos clones testados, bem como as respetivas designações testadas em laboratório e em campo, litologia e solos e objetivo geral.

Origem	Clone	Litologia*	Solos*	Objetivo geral
Saboia, Odemira	1001	Complexo xisto grauváquico	Luvisolos associados a Litossolos	Produção/ (-)Proteção
Coimbra	8001	Gré vermelhos, conglomerados, margas, calcários geralmente dolomíticos	Litossolos associados a Luvisolos	Proteção/ (-)Produção

A informação referente à litologia (APA, 1982) e solos (IUSS, 2006) observada em formato digital shapefile (shp.) das cartas de litologia e solos do Atlas do Ambiente, caracteriza para o clone 1001 um luvisolo associado a litossolo e com material de origem um complexo xisto grauváquico. No clone 8001 caracteriza-se por um litossolo associado a luvisolo e como material de origem Grés vermelhos, conglomerados, margas, calcários geralmente dolomíticos. A proveniência do clone 8001 é interessante pela presença de calcários (Ca) e dolomíticos uma rocha composta por carbonato de cálcio (CaCO₃) e magnésio (Mg) no material de origem (Pokorny, 2006). Estes solos apresentam pH mais elevado ou neutro em comparação com solos com xisto, com pH mais baixo, consequentemente solos ácidos (clone 1001). Os luvisolos são solos desenvolvidos e estruturados com um perfil AEB_{2t}CR. O horizonte A, é um horizonte mineral normalmente mais escuro e com matéria orgânica, no horizonte E existe eluviação de materiais sendo normalmente mais claro que o anterior, é também por vezes nomeado de horizonte A₂, em B normalmente há acumulação de argila, o horizonte C é composto por desagregados da rocha mãe e o horizonte R é composto pela rocha mãe que dá origem ao solo (Pereira et al., 2019). Litossolos são solos menos profundos, espessura inferior a 10 cm e pouco estruturados, com perfil A/CR. Estes solos em Portugal continental normalmente são de uso florestal porque apresentam restrições para a agricultura vulgarmente associados a áreas com

maior declive e maior risco de erosão. Assim, o indicado em solos com estas características é a instalação de espécies pioneiras, como o pinheiro bravo ou autóctones pioneiras como o medronheiro. Litossolos em geral estão incluídos na reserva ecológica nacional (REN), solos com risco elevado de erosão, associados a declives superiores a 30%.

Luvisolos com material de origem xistos e grauvaques poderão apresentar potencial para a produção por existir um equilíbrio na quantidade de argila, sem risco elevado de compactação. No entanto, poderá ter como objetivo a produção com restrições, devido ao baixo teor de matéria orgânica no solo e, em particular, em função do declive associado ao risco de erosão. Litossolos com material de origem de Grés vermelhos, conglomerados, margas, calcários geralmente dolomíticos perante a escala da informação poderão significar como objetivo geral do uso para a proteção uma vez que são solos pouco profundo, menos de 10 cm, pouco estruturados e com risco de erosão quando associados a declives acentuados. Com associação a luvisolos poderá haver locais onde a produção poderá ser interessante havendo solos mais profundos e declives menores.

6.8. Análise aos substratos

Realizou-se aos substratos (de todos os tratamentos) testados no ensaio uma análise química no laboratório de solos da ESAC. Também durante e após o levantamento do ensaio com os substratos diretamente retirados dos garrafões usados na aclimatização, no dia 10 de maio e 4 de junho respetivamente, avaliou-se a condutividade elétrica. A avaliação da condutividade elétrica foi na proporção de 1:5 (v:v) em que foi utilizado 10 ml de substrato para 50 ml de água e colocados a agitar durante 30 minutos e uma hora na avaliação realizada após levantamento do ensaio no dia 4 de junho.

6.9. Caraterização dos tratamentos

No total foram estabelecidos 12 tratamentos (Tabela 8) em três substratos diferentes no ensaio de enraizamento *ex vitro* e aclimatização de rebentos de plântulas micropropagadas. Os substratos são o BioBizz (S1), a SiroFlorestal (S2) e a mistura de Turfa:Perlite (50:50, v:v) (S3). Testou-se ainda a aplicação do Rhizotonic, um estimulante de crescimento vegetativo e radicular a todos os substratos. Nos substratos S2 e S3, adição de ectomicorrizas e adição apenas no substrato S3 de adubo de libertação controlada, fósforo e calcário em diferentes combinações.

Tabela 8 - Caraterização dos tratamentos estabelecidos no ensaio de enraizamento *ex vitro* e aclimatização descritos por substratos, adição ou não de Rhizotonic e adição de outros componentes (adubo de libertação controlada, fósforo e calcário).

Identificação (tratamentos)	Substrato (S1; S2; S3)	Adição Rhizotonic (S.0 vs S.1)	Adição de outros componentes (adubo, calcário e fósforo)
S1.0	BioBizz (S1)	-	-
S1.1	BioBizz (S1)	x	-
S2.0	SiroFlorestal (S2)	-	-
S2.1	SiroFlorestal (S2)	x	-
S3.0	Turfa:Perlite (50:50) (S3)	-	-
S3.1	Turfa:Perlite (50:50) (S3)	x	-
S4	Turfa:Perlite (50:50) (S3)	-	Adubo de libertação controlada
S5	Turfa:Perlite (50:50) (S3)	-	A. Lib. Contr. + Fósforo
S7	Turfa:Perlite (50:50) (S3)	-	A. Lib. Contr.+ Fósforo + Calcário
S6	Turfa:Perlite (50:50) (S3)	-	Fósforo + Calcário
S8	Turfa:Perlite (50:50) (S3)	-	Pastilha de ectomicorrizas (Micofora)
S9	SiroFlorestal (S2)	-	Pastilha de ectomicorrizas (Micofora)

Nos tratamentos S1.0 a S3.1, estes diferem entre si pela adição ou não de Rhizotonic ao substrato (tabela 8). A utilização do Rhizotonic (comercializado pela Urbicult) é um estimulante radicular e vegetativo natural à base de extratos de algas como *Ascophyllum nodosum* e com várias vitaminas como a B1 e B2 (CANNA, s.d) foi testado no ensaio com a expectativa de promover e melhorar o enraizamento e por consequência a sobrevivência das plântulas.

O substrato S1, substrato BioBizz (figura 17) é um substrato comercial aconselhado para a sementeira, estacaria, flores e plântulas de vários tipos. Poderá ser usado no interior ou exterior em espécies hortícolas, relvados ou árvores (Anexo I). O substrato é composto por turfa de *Sphagnum*, perlite e adubo com os macronutrientes NPK na proporção 14-16-18 com 1,2 kg/m³. O pH é igual a 6,2.

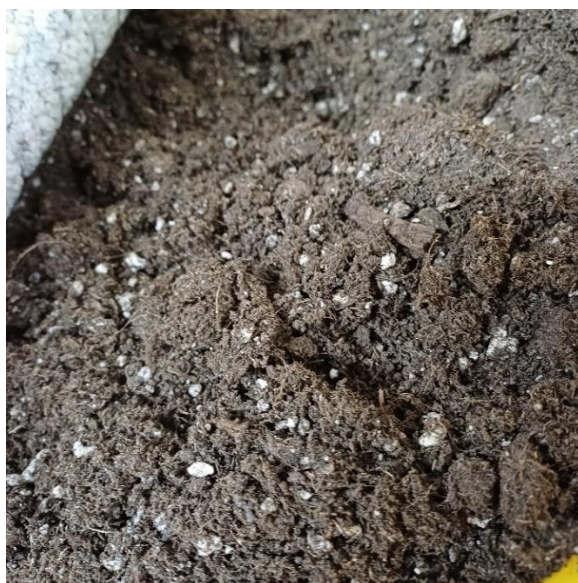


Figura 17 - Aspeto geral do substrato comercial BioBizz.

Este substrato apresentou bons resultados de sobrevivência e crescimento vegetal em outros trabalhos académicos desenvolvidos no âmbito de estágios curriculares na ESAC de produção em viveiro (Pereira, 2022; Moreira, 2022).

O substrato S2, substrato SiroFlorestal (figura 18) é um substrato comercial para germinação e transplantação de espécies florestais. É composto por casca de pinho compostada, turfa loira de *Sphagnum*, argila e adubo mineral de libertação controlada de macronutriente e micronutrientes (*site* da SIRO ¹). Os macronutrientes presentes são NPK na proporção 10-20-12 com 2kg/m³ (adubo de libertação controlada até 9 meses) e os micronutrientes com 0,3kg/m³ (adubo de libertação controlada até 12 meses).



Figura 18 - Aspeto geral do substrato comercial SiroFlorestal.

¹) <https://portal.siro.pt/pt/programs/estview.aspx?ref=SR108200P>

A argila presente na SiroFlorestal é um elemento novo comparativamente a outros substratos testados anteriormente (SiroFlorestal 30, com 30% de turfa). A argila aumenta a capacidade de retenção de água, nutrientes e aumenta o pH do substrato.

O substrato S3 é uma mistura não comercial de turfa e perlite na mesma proporção (figura 19). A turfa de *Sphagnum* é atualmente a mais usada como substrato ou base de substratos comerciais. As características principais da turfa são a sua capacidade de retenção de água, densidade baixa, pH baixo e nível baixo de nutrientes (Huat et al., 2011; Schmilewski, 2008). A turfa continua a ser muito utilizada em substratos pela sua capacidade de reter água associada à microporosidade. A perlite utilizada no substrato com a turfa no ensaio tem como objetivo aumentar a macroporosidade, o arejamento do substrato para evitar o encharcamento.



Figura 19 - Aspeto geral da mistura de Turfa:Perlite (50:50, v/v).

Este substrato é mais barato em relação aos apresentados neste trabalho e continua a ser muito utilizado na produção em viveiro de plantas. No entanto, é relevante neste caso melhorar a sua fertilidade através da correção do pH, da adução com nutrientes e, ainda, a sua atividade biológica (micorrizas). Assim, o substrato S3 foi utilizado como substrato base nos restantes tratamentos de S4 a S8 havendo diferença apenas na adição de adubo de libertação controlada, calcário, fósforo ou ectomicorrizas. Adição destes compostos teve como objetivo melhorar as condições químicas e biológicas do substrato para garantir a sobrevivência, enraizamento, crescimento e desenvolvimento das raízes e parte aérea das plântulas no enraizamento *ex vitro* e aclimatização.

No tratamento S4 (figura 20) testou-se a adição de um adubo de libertação controlado ao substrato, Multicote Agri (Haifa Group¹) composto por macronutriente NPK na proporção 11-22-9 e micronutrientes como o magnésio e boro (adubo de libertação controlada até 9 meses).



Figura 20 - Aspecto geral do tratamento S4 (Substrato S3 com adição de adubo de libertação controlada).

O adubo de libertação controlada foi testado no ensaio com a expectativa de fornecer de forma controlada e gradual os nutrientes essenciais ao desenvolvimento radicular e vegetativo.

No tratamento S5 testou-se a adição ao substrato do adubo de libertação controlado e ainda fósforo² (figura 21, a). No tratamento S6 (figura 21, b) foram adicionados fósforo e calcário³ e no tratamento S7 (figura 21, c) adubo de libertação controlada, fósforo e calcário.

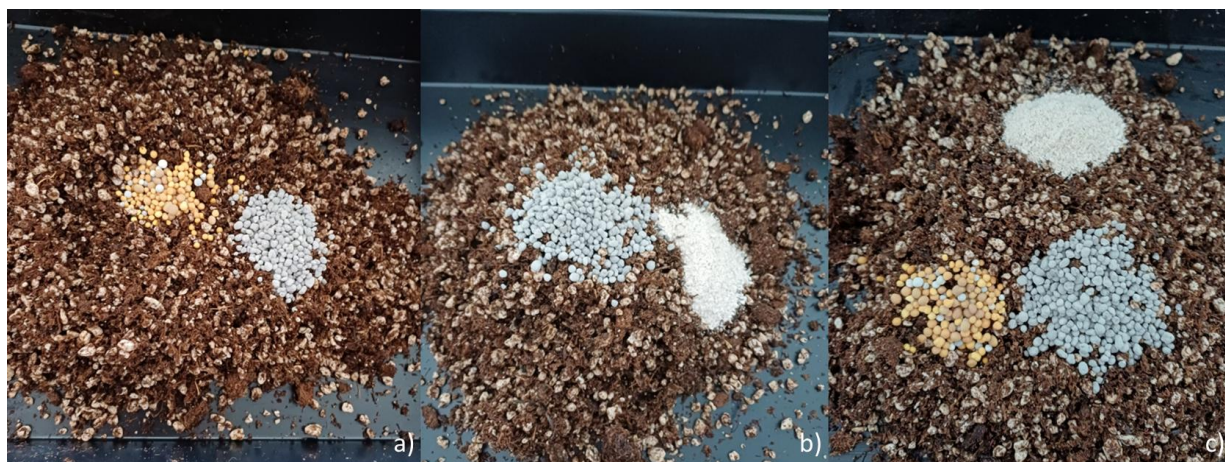


Figura 21 - Aspecto geral dos tratamentos S5 em a) adição de adubo de libertação controlada e fósforo; S6 em b) adição de fósforo e calcário e S7 em c) adição dos três compostos sendo em todos os tratamentos o substrato base S3 (Turfa:Perlite, 50:50).

¹) <https://www.haifa-group.com/multicote%E2%84%A2-agri-controlled-release-fertilizers-agriculture>

²) Ficha técnica: <https://www.adubosdeiba.com/wp-content/uploads/2018/09/Super-18.pdf>

³) Ficha técnica: https://www.biocal.pt/wp-content/uploads/2021/08/Biocal-Simples_v2021.pdf

A adição conjunta de adubo de libertação (S5) controlada e fósforo no ensaio foi testada com a expectativa de fornecer fósforo para promover o desenvolvimento radicular.

No tratamento S6 foi testado a adição de calcário para corrigir o pH e apenas fósforo como nutriente para avaliar se só este macronutriente com o pH corrigido conseguiu promover o desenvolvimento radicular e vegetativo. No tratamento S7 foi testado a adição dos três componentes em que se pretende correção do pH, avaliar o efeito do fósforo para o desenvolvimento inicial das raízes e do adubo de libertação controlada de nutrientes ao longo da aclimatização promovendo a sobrevivência e o enraizamento.

Por fim no tratamento S8 e igual no tratamento S9, mas no substrato SiroFlorestal (S2), testou-se a adição de uma pastilha de ectomicorrizas (figura 22) com o objetivo de melhorar a atividade biológica do substrato, promover estabilidade de micorrizas, melhorar o enraizamento e a sobrevivência. As pastilhas eram compostas por esporos de *Rhizopogon sp.*, *Pisolithus tinctorius* e *Sclerotium verrucosum*.



Figura 22 - Embalagem das pastilhas de ectomicorrizas testadas no ensaio.

6.10. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização

O material vegetal 15 dias antes do estabelecimento do ensaio foi repicado para meio de cultura KNOP sólido adicionado de carbono ativo (Nétien & Gautheret, 1960) com o objetivo de desintoxicar as plântulas principalmente de BAP, citocina, que promove a multiplicação de gomos axilares e interfere na indução e desenvolvimento de raízes (Gomes et al., 2009).

Previamente no dia anterior à aclimatização os substratos e a perlite foram esterilizados para evitar possíveis contaminações. A esterilização foi realizada em autoclave a temperatura de 121 °C durante 60 minutos após os substratos e aperlite terem sido humedecidos com água. O

adubo, o fósforo e o calcário foram pesados e colocados em taças individuais para cada tratamento. A quantidade de adubo utilizada foi em relação a 30 g de adubo recomendado por planta num volume de substrato de cerca de 2,8 litros testado no âmbito de estágios curriculares anteriores. Assim, para 600 ml de substrato foi adicionado 6,43 g de adubo. Para o fósforo a quantidade adicionada foi cerca de 7,07 g de acordo com trabalhos académicos anteriores desenvolvidos no âmbito de estágios curriculares onde se usou a razão 75 g por planta em 2,8 l de volume de substrato, assim foi adicionado 16,07 g de fósforo para os 600 ml de substrato. As quantidades de fósforo adicionadas foram de acordo com trabalhos anteriores no medronheiro e também em eucalipto em viveiro (Estrela, 2023; Vieira, 2023; Vaz, 2023). A quantidade de calcário adicionado foi de 7,07 g em 600 ml conforme protocolo já definido onde é recomendado a adição de cerca de 2,357 g por 100 ml de substrato de turfa e perlite, para inoculação com *Tuber borchii* durante a fase de enraizamento *ex vitro* e aclimatização. (Figueiredo, 2020).

A aclimatização foi realizada em conjunto com o enraizamento *ex vitro* segundo bons resultados obtidos anteriormente na produção de plantas micropropagadas de medronheiro. O processo de aclimatização das plântulas no ensaio foi realizado em garrações de plástico de 5 litros lavados e desinfetados. Os garrações são uma solução prática para utilizar na produção em larga escala por conseguirem suportar mais de 100 rebentos de plântulas. Para cada tratamento foi usado um garrafão, com 60 rebentos (30 rebentos/clone, 2 clones), sendo o total do ensaio de 360 rebentos/clone.

O substrato no garrafão foi colocado entre duas camadas, acima e abaixo de perlite (figura 23). A perlite foi utilizada na camada superior e inferior para evitar contaminações (Castro et al., 2020).



Figura 23 - Preparação e colocação de substrato para ensaio de climatização e enraizamento *ex vitro*, como camadas inferior e superior de perlite.

A preparação da perlite e dos substratos foi realizada individualmente em tabuleiros de laboratório de plástico diferentes. Entre cada preparação de substrato o tabuleiro e os materiais

utilizados foram lavados. Iniciou-se a preparação e a colocação de 800 ml de perlite hidratada na parte inferior em todos os garraões. Foram preparados e colocados os substratos sem adição ou com adição de Rhizotonic, onde apenas se humedeceram os substratos com água vs mistura de água e Rhizotonic. O substrato S3 com combinações de adubo, calcário e fósforo (para os tratamentos S4 a S7) foram preparados seguidamente e por último os substratos S3 e S2 com adição de uma pastilha de ectomicorriza (tratamentos S8 e S9). A pastilha foi desfeita a pó, adicionou-se água para formar uma suspensão homogénea, usada posteriormente para humedecer o substrato. Na camada de substrato foram utilizados 650 ml de substrato em todos os tratamentos. Por fim colocou-se a camada de cima de 650 ml de perlite hidratada em todos os garraões.

Após preparação dos garraões foram colocados os rebentos depois da indução em auxina *pre deeping*. Antes de colocados os rebentos são seguidos diferentes passos para proceder-se ao enraizamento *ex vitro*. Primeiro as plântulas em meio com CA (figura 24) são retiradas e lavadas em água da torneira esterilizada para limpar qualquer vestígio principalmente de açúcares do meio para evitar contaminações futuras.



Figura 24 - Exemplo de plântulas multiplicadas em meio KNOP adicionado de carbono ativo (CA).

As plântulas são cortadas em rebentos com tamanho de cerca de 1,5 cm e colocadas em fungicida *Kumuluss*¹ preparado na concentração de 1,5 g/L. Antes de colocados nos garraões os rebentos um por um são colocados em papel absorvente para tirar o excesso de fungicida e a base é colocada em contato com a hormona de enraizamento, auxina, ácido indol-3-butírico (9,8 μ M AIB) durante 9 segundos (figura 25, a). Após contato com a hormona a base foi passada por pó talco (figura 25, b) com o objetivo de manter a hormona junto à base.

1) Ficha técnica: https://www.agro.basf.pt/Documents/Fichas-de-Seguran%C3%A7a/FDS-023/Kumuluss_FDS.PDF?1695042339380

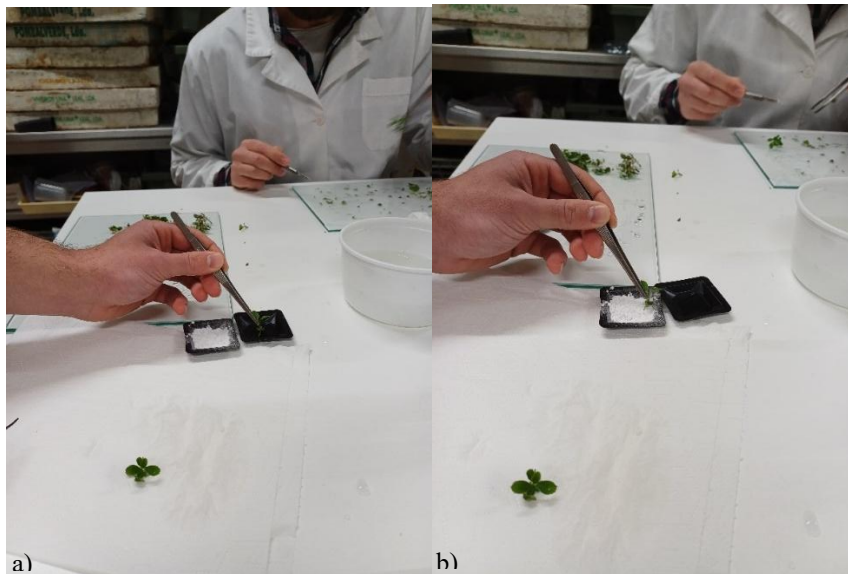


Figura 25 - a) Base do rebento em contato com a hormona de enraizamento. b) Base de rebento depois de estar em contato com a hormona é passada no pó talco.

Em cada garrafão foram colocados 30 rebentos de cada clone. No total por garrafão foram colocados 60 rebentos dos clones/tratamento. Por fim após colocação de todos os rebentos realizou-se uma rega por nebulização antes de fechar os garrafões, e vedou-se com película aderente com o objetivo de manter a humidade relativa elevada. Os garrafões foram colocados na câmara de crescimento com temperatura e luz controladas mantendo sempre uma humidade relativa elevada. Foram mantidas entre uma temperatura de cerca de 20°C a 25°C e fotoperíodo de 16/8h. As plântulas permaneceram desde o dia 5 de março de 2024 (instalação do ensaio) até 10 de maio de 2024 (levantamento do ensaio), durante dois meses e cinco dias na câmara de crescimento.

Um mês antes do final da aclimatização (levantamento do ensaio), quando já se observava formação de novos crescimentos da parte aérea e das raízes nas plântulas procedeu-se à abertura gradual dos garrafões. Esta abertura gradual tem o objetivo de diminuir a humidade relativa e preparar as plântulas para as condições exteriores para a posterior transplantação para viveiro. O período de aclimatização correspondeu a dois meses e cinco dias desde a instalação do ensaio, abertura gradual dos garrafões e levantamento do ensaio.

6.11. Delineamento experimental e análise de resultados

Foram testados 30 rebentos de cada clone em cada um dos tratamentos (2 clones x 12 tratamentos). No total foram testados 12 tratamentos considerando: três substratos, a aplicação de um estimulante radicular e vegetativo aos substratos (Rizotonic), a adição da pastilha de ectomicorrizas em SiroFlorestal e na mistura de Turfa:Perlite e a adição na mistura de Turfa:Perlite, de adubo de liberação controlada, fósforo e calcário em diferentes combinações.

O levantamento do ensaio e análise de resultados para posterior transferência das plântulas para condição de viveiro ocorreu 2 meses e 5 dias após a instalação do ensaio (incluído o tempo de um mês de abertura gradual dos garrafões).

A avaliação dos resultados realizou-se individualmente por planta antes da sua transplantação para alvéolos individuais de 250 ml, utilizando como substrato Siroflorestal. Foram analisados diferentes parâmetros como a sobrevivência, parâmetros relacionados ao desenvolvimento das plântulas, como o comprimento dos rebentos (SL), avaliação da parte aérea, o comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular, número de raízes principais (NPR) e a presença de *callus* na base do rebento. Avaliou-se ainda o estabelecimento de micorrizas nos tratamentos em que foi adicionado a pastilha de ectomicorrizas.

Para avaliação do comprimento dos rebentos (SL) e o comprimento da maior raiz (LLR) procedeu-se à medição direta com uma régua graduada. A avaliação da parte aérea foi através de uma escala numérica (1-4), a referir: 1- folhas vermelho-escuro, 2- folhas vermelho-claro, 3- folhas verdes e vermelhas e 4- folhas verdes. A avaliação da parte radicular foi usada uma escala numérica entre (1 - 4), sendo 1- presença de apenas raiz principal, 2- raízes principais e secundárias, 3 raízes principais, secundárias e terciárias e 4- proliferação de raízes terciárias. O número de raízes principais (NRP) foi um parâmetro onde foi observado o número de raízes principais na base do rebento.

A presença de *callus* foi avaliado aplicando uma escala numérica entre (0 e 3) em que é também considerado a sua dimensão, a referir sem 0 *callus* e 3 presença de *callus* com dimensão superior a 4 mm. A presença de *callus* é um indicador do excesso de hormona ou excesso do tempo que a base do rebento esteve em contato com a hormona.

Na avaliação da micorrização utilizou-se uma escala numérica igualmente utilizada em outros trabalhos académicos anteriores desenvolvidos no âmbito de estágios curriculares. Considerou-se a seguinte escala: 0 – ausência; 1 – presença de micélio; 2 – presença de *baby branch*; 3 – presença de micorriza e 4 – presença de mais de 25 pontas micorrizadas.

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi realizado no programa STATISTICA (versão 12.0). Primeiramente avaliou-se o tipo de distribuição das variáveis de modo a perceber o tipo de método estatístico a aplicar. Se as variáveis apresentarem uma distribuição normal ($P > 5\%$) a variável é paramétrica e procede-se à análise de variância Anova para avaliar o efeito dos tratamentos testados nas variáveis dependentes. No caso, das variáveis explicarem parte significativa da variância observada, procedeu-se à realização de um teste de comparação múltipla de médias, teste de Tukey, para um nível de significância inferior a 5 %, para identificação dos melhores tratamentos. Se as variáveis não apresentarem uma distribuição normal (variável não paramétrica), as médias foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis, para testar a existência de diferenças significativas nos tratamentos testados (Miller e Miller, 2010). Todas as variáveis observadas por notação são variáveis não paramétricas.

Foi realizada uma regressão múltipla para avaliar o efeito de diferentes variáveis na sobrevivência e também comprimento dos rebentos, e número de raízes principais (NPR). No final realizou-se uma análise fatorial (PCA- análise de componentes principais) com o objetivo de melhor identificar a relação entre as variáveis estudadas e avaliar a percentagem de variância total explicada pelos fatores. Através da análise fatorial pretende-se estimar de um modo global a relação entre as variáveis analisadas.

7. Resultados e Discussão

I- Ensaio de tratamentos pré-germinativos

7.1. Caracterização dos lotes de sementes

Na caracterização dos lotes de sementes do acesso PEN de 2018 e famílias AL3 e AL6 desde 2019 a 2023 foram avaliados o grau de pureza (%), viabilidade (%), peso de 1000 sementes, nº de sementes/kg, nº de semente/litro e teor de humidade (%).

O grau de pureza para cada família/acesso/ano é apresentado na figura 26.

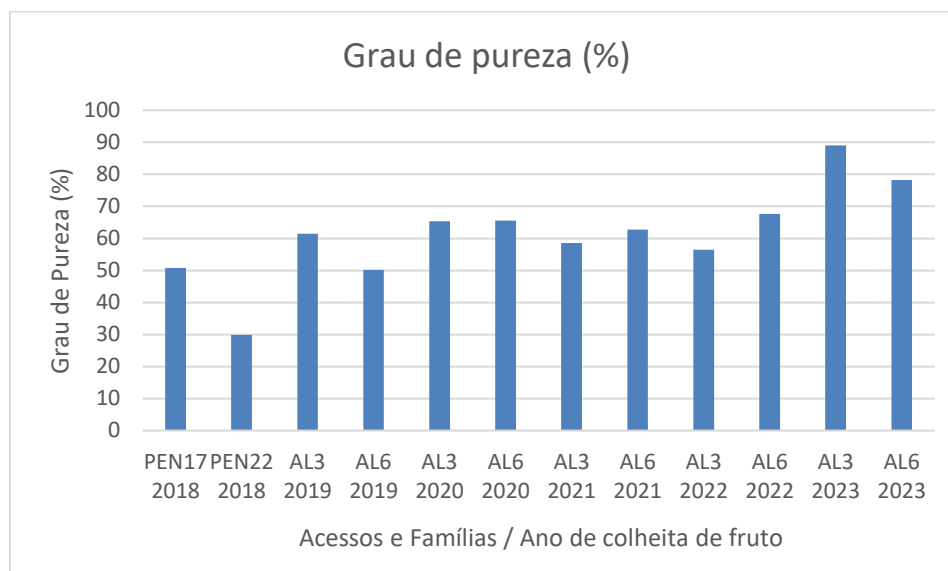


Figura 26 - Grau de pureza por Famílias/Acesso e ano.

As famílias AL3 e AL6 de 2023 apresentam um grau de pureza de cerca de 89% e 78% respetivamente. É o lote de sementes com maior grau de pureza o que significa que houve uma limpeza melhor da semente. O lote com menor grau de pureza, menor quantidade de semente na amostra é o acesso PEN de 2018. As restantes famílias em todos os anos apresentam grau de pureza igual ou superior a 50%. O grau de pureza permite estimar a proporção de sementes no lote e conseqüente a quantidade necessária para a produção de plantas também em função da sua viabilidade.

Na figura 27 mostra o resultado do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade da semente.

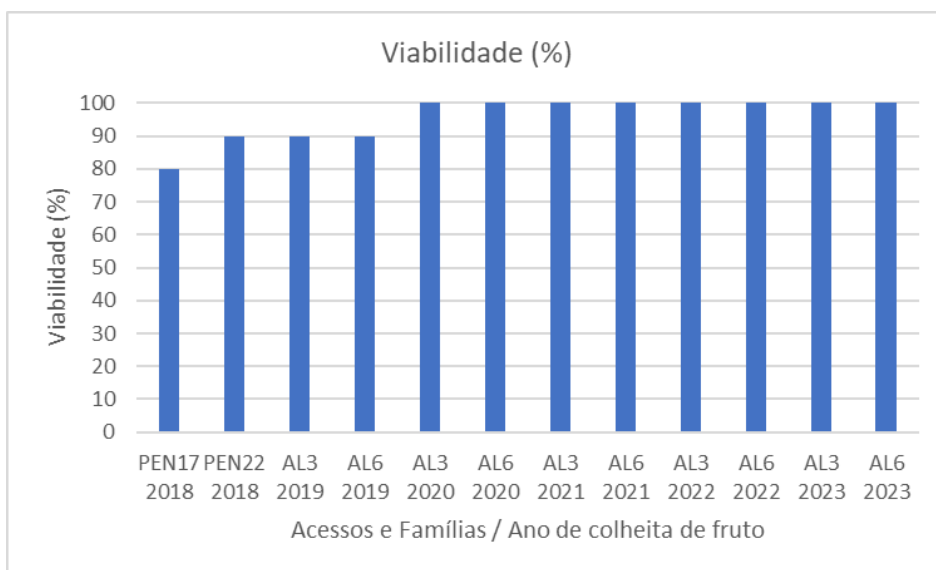


Figura 27 -Taxa de viabilidade (%) observada através do teste tetrazólio por famílias/ acesso e ano.

A viabilidade (%) em geral foi de 100 % para todas as famílias desde 2020. A viabilidade foi igual a 85% apenas para o acesso PEN de 2018 e 90% nas famílias AL3 e AL6 de 2019. Assim, em geral para o acesso e família em todos os anos existe presença de atividade respiratória e a inerente viabilidade. Na figura 28 são apresentados vários exemplos de sementes com coloração vermelha do embrião no seu interior.

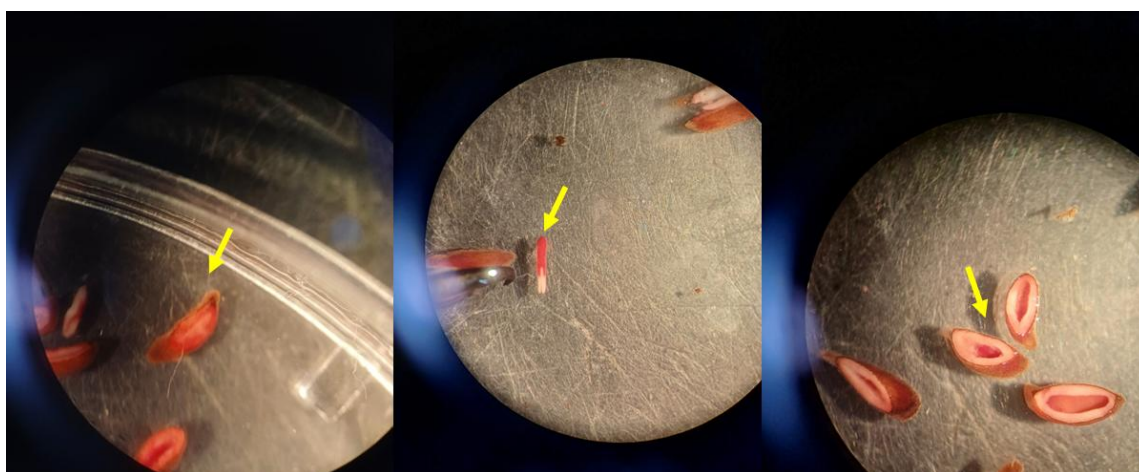


Figura 28 - Sementes observadas com coloração vermelha após sujeitas a solução de cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio preparada a 0,25%.

O peso de 1000 sementes e o nº de sementes num quilo são apresentados nas figuras 29 e 30 para cada família por anos e acesso.

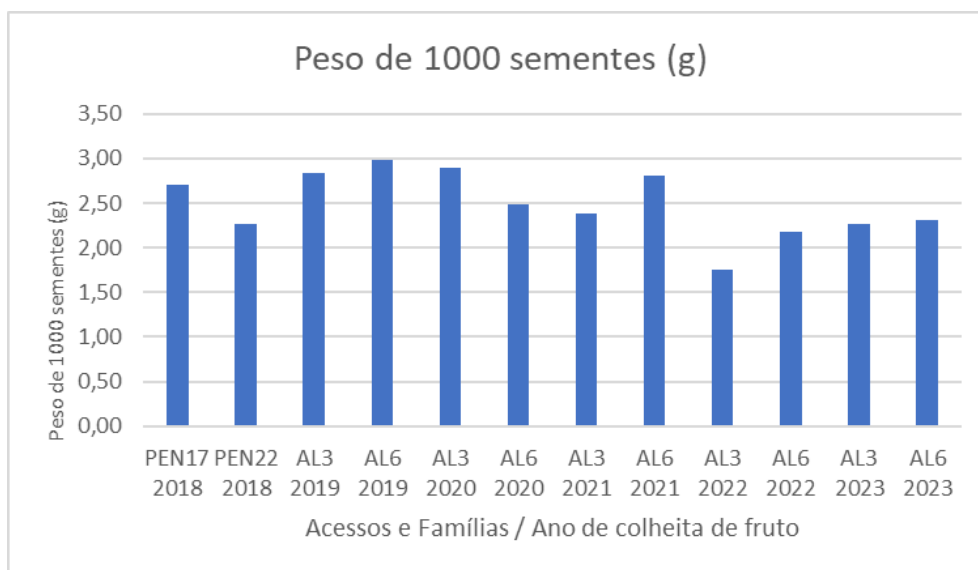


Figura 29 - Peso de 1000 sementes (g) por famílias/acesso e ano.

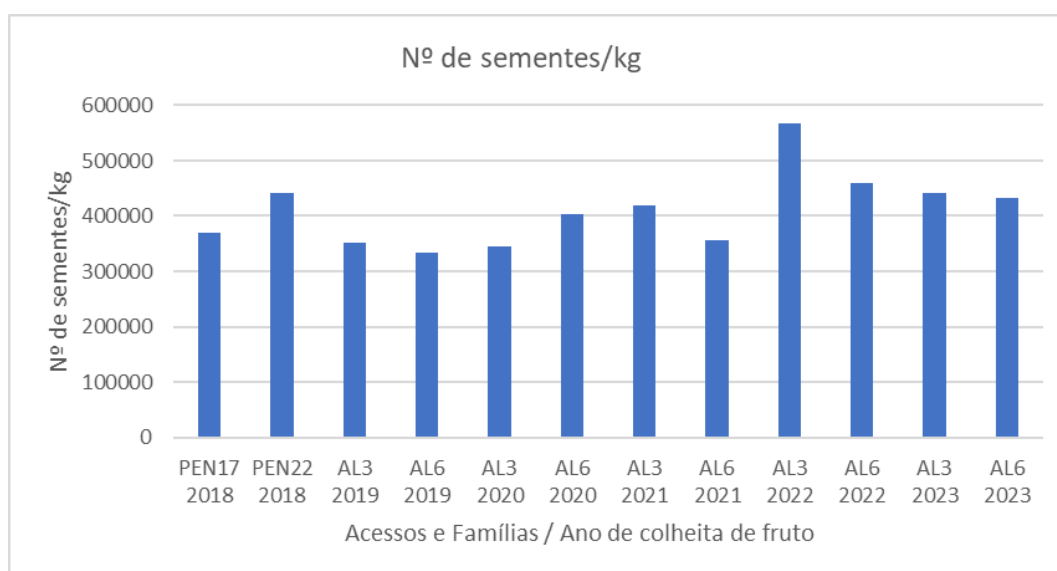


Figura 30 - Nº de sementes/kg por famílias/acesso e ano.

O peso de 1000 sementes com maior valor, cerca de 2,99 gramas, corresponde à família AL6 de 2019, informando que neste caso temos sementes de maiores dimensões (mais pesadas) com mais reservas sendo espetável que correspondam a um menor número de sementes/kg. O lote da família AL3 de 2022 apresenta um peso de 1000 sementes de cerca de 1,5 gramas e consequentemente um número de sementes/kg maior (figura 30).

O número de sementes por quilo representa a estimativa de sementes possíveis num quilo. O maior valor de sementes por quilo corresponde a cerca de 568182 da família AL3 de 2022. Seguidamente com valores de cerca de 458716 sementes, 442478 sementes e 432900 sementes

corresponde respetivamente às famílias AL6 de 2022, AL3 e AL6 de 2023. O nº de sementes por quilo varia de 334448 a 568182 sementes.

O valor médio apresentado no catálogo de Sementes de Árvores e Arbustos Florestais do Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF, 2022) do nº de sementes/kg para o medronheiro é 420000 sementes. Assim, valores abaixo em comparação com os valores médios apresentados no catálogo do ICNF observou-se no acesso PEN 17 de 2018, na família AL3 e AL6 de 2019 e AL6 de 2021, indicando lotes de sementes de maior dimensão média com mais reservas.

Outros autores, Catalán (1991) refere valores do número de sementes por quilo entre 375000 e 570000, Piotto e Di Noi (2001) valores do número de sementes por quilo entre 330000 e 700000, CNRGF El Serranillo, citado por Navarro-Cerrillo et al. (2013) valores do número de sementes/kg entre 350000 e 650000 e Vilhena (2019) refere valores do número de sementes/kg entre 330033 e 1250000. O valor máximo apresentado por Vilhena (2019) de 1250000 sementes por quilo está acima do valor máximo obtido no ensaio de 568181. O valor mais baixo de 334448 sementes de AL6 de 2019 em comparação com os valores apresentados pelos autores está dentro dos intervalos referidos.

Os lotes de sementes das famílias AL3 e AL6 de 2019 a 2023 e acesso PEN de 2018 utilizados no ensaio foram caracterizados em grau de pureza (%), peso de 1000 sementes (g), nº de sementes/kg, nº de sementes/L, teor de humidade (%) e viabilidade (%) como mostra globalmente a tabela 9.

Tabela 9 - Caracterização dos lotes de sementes por família/acesso e ano relativa relativamente a grau de pureza (%), peso de 1000 sementes (g), nº de sementes/kg, nº de sementes/L, teor de humidade (%) e viabilidade (%).

Acesso ou Família	Ano	Grau de pureza (%)	Peso 1000 sementes (g)	Nº sementes /kg	Nº sementes /L	Teor de humidade (%)	Viabilidade (%)
PEN	2018	40	2,48	406424	238875	42	85
AL3	2019	61	2,84	352113	177000	45	90
AL6	2019	50	2,99	334448	178500	14	90
AL3	2020	65	2,90	344828	238250	53	100
AL6	2020	66	2,48	403226	219750	44	100
AL3	2021	59	2,39	418410	210500	15	100
AL6	2021	63	2,81	355872	214250	8	100
AL3	2022	56	1,76	568182	257000	13	100
AL6	2022	68	2,18	458716	244500	17	100
AL3	2023	89	2,26	442478	217250	11	100
AL6	2023	78	2,31	432900	221250	5	100

7.2. Taxa de germinação

7.2.1. Taxa de germinação condição, família/acesso, ano e tratamento

A tabela 10 apresentada para as três condições a taxa de germinação em função da família/acesso, ano e tratamento. É apresentado na mesma tabela o período em que ocorreu a germinação e mês ou período onde se observou os valores máximos de germinação por família/acesso e ano.

Tabela 10 - Taxa de germinação (%) por condição de germinação, família/acesso, ano (de colheita) e tratamentos (pré-germinativos (1 a 9 e C) e respectivo período de germinação.

Condição	Acesso / Família	Ano	Germ % / Trat / Condição / Família/Acesso / Ano										Período Germinação			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	C	período	max		
1	PEN22/17	2018	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	abril	abril
1	AL3	2019	0,00	0,00	6,67	6,67	20,00	20,00	0,00	26,67	26,67	0,00	0,00	0,00	fev-abril	mar
1	AL6	2019	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	—	—	
1	AL3	2020	13,33	13,33	0,00	0,00	40,00	33,33	66,67	0,00	80,00	0,00	0,00	fev-abril	mar	
1	AL6	2020	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,33	0,00	mar	mar	
1	AL3	2021	33,33	6,67	0,00	0,00	13,33	0,00	20,00	0,00	80,00	6,67	0,00	fev-abril	mar	
1	AL6	2021	26,67	0,00	0,00	0,00	20,00	13,33	26,67	0,00	93,33	6,67	0,00	fev-abril	mar	
1	AL3	2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	—	—	
1	AL6	2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	mar	mar	
1	AL3	2023	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	6,67	0,00	0,00	mar	mar	
1	AL6	2023	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	13,33	0,00	6,67	0,00	0,00	mar	mar	
2	PEN22/17	2018	6,67	20,00	0,00	13,33	6,67	20,00	13,33	13,33	33,33	20,00	0,00	març-abril	març-abril	
2	AL3	2019	6,67	13,33	26,67	13,33	13,33	73,33	20,00	33,33	20,00	26,67	0,00	fev-abril	abril	
2	AL6	2019	6,67	13,33	6,67	0,00	13,33	73,33	6,67	26,67	20,00	20,00	0,00	fev-abril	abril	
2	AL3	2020	93,33	86,67	73,33	66,67	80,00	86,67	73,33	80,00	86,67	66,67	0,00	fev-maio	març-abril	
2	AL6	2020	13,33	20,00	0,00	6,67	33,33	13,33	13,33	60,00	26,67	13,33	0,00	fev-abril	abril	
2	AL3	2021	46,67	60,00	40,00	46,67	40,00	73,33	66,67	80,00	73,33	53,33	0,00	fev-abril	março	
2	AL6	2021	60,00	60,00	60,00	46,67	53,33	33,33	73,33	66,67	66,67	66,67	0,00	fev-maio	março	
2	AL3	2022	0,00	6,67	13,33	6,67	33,33	6,67	6,67	6,67	6,67	13,33	0,00	març-abril	abril	
2	AL6	2022	20,00	26,67	6,67	26,67	33,33	13,33	33,33	40,00	20,00	26,67	0,00	fev-abril	març-abril	
2	AL3	2023	6,67	20,00	6,67	6,67	20,00	6,67	20,00	13,33	13,33	26,67	0,00	fev-abril	març-abril	
2	AL6	2023	33,33	33,33	13,33	13,33	26,67	26,67	33,33	33,33	40,00	33,33	0,00	fev-abril	març-abril	
3	PEN22/17	2018	20,00	13,33	13,33	13,33	13,33	26,67	40,00	40,00	60,00	86,67	0,00	març-abril	març-abril	
3	AL3	2019	20,00	13,33	20,00	26,67	20,00	26,67	13,33	33,33	13,33	26,67	0,00	fev-abril	març-abril	
3	AL6	2019	26,67	13,33	6,67	20,00	0,00	13,33	6,67	13,33	20,00	20,00	0,00	març-abril	março	
3	AL3	2020	86,67	86,67	86,67	66,67	66,67	86,67	100,00	93,33	93,33	93,33	0,00	fev-abril	març-abril	
3	AL6	2020	13,33	46,67	20,00	40,00	13,33	26,67	20,00	16,67	13,33	20,00	0,00	març-abril	març-abril	
3	AL3	2021	53,33	60,00	66,67	26,67	60,00	66,67	60,00	66,67	73,33	73,33	0,00	fev-abril	març-abril	
3	AL6	2021	73,33	60,00	40,00	33,33	73,33	66,67	33,33	66,67	60,00	86,67	0,00	fev-abril	març-abril	
3	AL3	2022	0,00	13,33	6,67	13,33	6,67	20,00	6,67	6,67	13,33	6,67	0,00	fev-abril	abril	
3	AL6	2022	33,33	33,33	40,00	26,67	20,00	60,00	40,00	33,33	60,00	40,00	0,00	fev-abril	març-abril	
3	AL3	2023	13,33	13,33	6,67	6,67	0,00	46,67	6,67	53,33	40,00	33,33	0,00	març-abril	abril	
3	AL6	2023	33,33	33,33	13,33	20,00	20,00	26,67	26,67	40,00	46,67	33,33	0,00	fev-abril	març-abril	

Nota: Ensaio instalado entre 30 de janeiro de 2024 a 2 de fevereiro de 2024; Em linha é apresentado por acesso/família e ano por condição e em coluna os tratamentos aplicados de (1 a 9 e C) a taxa de germinação (%). Tratamento C: Controle, sem pré-tratamento germinativo; Tratamento 1: 1 semana de estratificação; Tratamento 2: 15 dias de estratificação; Tratamento 3: 30 dias de estratificação; Tratamento 4: 45 dias de estratificação; Tratamento 5: 60 dias de estratificação; Tratamento 6: 30 dias de estratificação + GA₃ (500 mg/L); Tratamento 7: 30 dias de estratificação + GA₃ (1000

1) **negrito**, Percentagem de germinação máxima por famílias/acesso e ano; 2) Percentagem de germinação máxima por tratamento (escala abaixo)



Na condição 1 (caixa de germinação), a família AL3 de 2021 obteve 80% de taxa máxima de germinação que foi observada no tratamento 9 (adição de ácido giberélico na concentração de 2000 mg/L 24 horas antes da sementeira). Por tratamento o valor máximo de taxa de germinação, lido na coluna, é destacado de acordo com uma escada colorida que vai de verde claro para taxa de germinação inferior a 55 %, um verde menos claro para valores intermédios e um verde mais escuro para taxa de germinação superior a 85%. Na condição 1 este é o único tratamento com germinação superior a 85%. Na condição 2 (sementeira em alfobre), os tratamentos com germinação superior a 85% são observados nos tratamentos 1, 2, 6 e 9 onde os tratamentos 1 e 2 consistiram numa semana e 15 dias de estratificação a frio e o tratamento 6 consistiu em 30 dias de estratificação a frio, adição de ácido giberélico na concentração de 500 mg/L e o tratamento 9 adição de ácido giberélico na concentração de 2000 mg/L sem estratificação húmida a frio. Na condição 3 (sementeira direta) os tratamentos com germinação superior a 85% são os tratamentos 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 e C. O tratamento 3 consistiu em 30 dias de estratificação a frio, os tratamentos 7 e 8 são semelhantes ao tratamento 6 com 30 dias de estratificação a frio, mas com concentrações de ácido giberélico superiores de 1000 mg/L e 2000 mg/L respetivamente. O tratamento C, controlo, obteve taxa de germinação de cerca de 93% igual à dos tratamentos 8 e 9 com adição de GA₃. De destacar o tratamento 7, com 30 dias de estratificação a frio e adição de ácido giberélico na concentração de 1000 mg/L com taxa de germinação de 100%.

Os tratamentos com ácido giberélico geralmente apresentam para as três condições melhores resultados de germinação. Os tratamentos com GA₃ com melhores resultados em geral são os tratamentos por ordem decrescente 9,7 e 6.

O período de germinação geral para as três condições foi de fevereiro a abril com máxima germinação a ser registada entre março e abril.

7.2.2. Taxa de germinação por tratamento e condição

A figura 31 mostra a taxa de germinação por condição de germinação testada e em função do tratamento pré-germinativo (Anexo II).

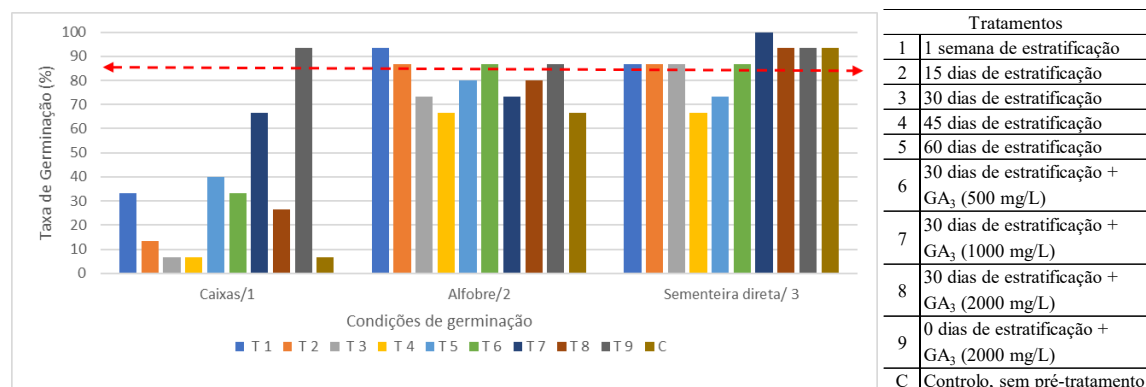


Figura 31 - Taxa de germinação (%) por condição e tratamento
(Nota: linha de referência a 85%).

A taxa de germinação por condição foi em média superior nas condições 2 e 3. Na condição 1, caixa de germinação, verificou-se alguma dificuldade em manter a humidade. Observou-se que o papel, a superfície onde foram colocadas as sementes, secava facilmente. Teria sido importante tapar as caixas de forma a permitir a manutenção da humidade. Na condição 1, é notória a taxa de germinação de superior a 85% no tratamento 9. Um valor igual ou superior a 85% de germinação será o ideal quando nos referimos a germinação de sementes para efeitos comerciais.

Na condição 2 nos tratamentos 1, 2, 6, e 9 a taxa de germinação foi superior ao valor de 85%. É de salientar o resultado interessante nesta condição para o tratamento 1, em que, com apenas uma semana de estratificação observou-se uma taxa superior a 85%, sendo ligeiramente superior aos restantes tratamentos.

Na condição 3, a sementeira direta, a taxa de germinação foi superior ao valor de 85% nos tratamentos 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 e C. É notório o resultado de 100 % de taxa de germinação observada no tratamento 7 onde foi testada a combinação de dois tratamentos pré-germinativos, adição ácido giberélico (GA₃) na concentração de 1000 mg/L e estratificação a frio de 30 dias. Os tratamentos com GA₃ (tratamentos 7, 8 e 9) e o tratamento C apresentam uma taxa de germinação superior a 90% sendo superior aos restantes tratamentos referidos anteriormente (tratamentos 1, 2, 3 e 6). Os tratamentos pré-germinativos em sementeira direta (condição 3) em geral apresentam melhores resultados de germinação sem estratificação a frio (C, controlo), estratificação a frio de 1 semana, 15 e 30 dias (tratamentos 1 a 3), adição de GA₃ nas concentrações 500 mg/L, 1000 mg/L e 2000 mg/L com estratificação a frio de 30 dias

(tratamentos 6 a 8) e sem estratificação só com adição de GA₃ na concentração 2000 mg/L (tratamento 9). Os tratamentos 4 e 5 com resultados inferiores (65 e 75%), têm em comum os maiores períodos de estratificação húmida a frio, com maior risco de perda de humidade do substrato. O destaque vai para os tratamentos com a adição de GA₃ com e sem estratificação, com resultados semelhantes aos obtidos pelo autor Pinis et al. (2017) que obteve com 30 dias de estratificação e as concentrações de GA₃ de 2000 mg/L, 1000 mg/L e 500 mg/L proporcionou germinações entre 82 % e 98%. São ainda interessantes os resultados obtidos com apenas uma semana de estratificação a frio (tratamento 1) e sem nenhum tratamento pré-germinativo (controlo). Para um viveirista a aplicação mais conveniente será o tratamento controlo e aplicação de ácido giberélico na concentração de 2000 mg/L sem estratificação.

7.2.3. Taxa de germinação por condição e família/acesso

A figura 32 mostra a taxa de germinação por condição e família/acesso em função do tratamento de pré-germinativo. Esta informação apresentada em gráfico é referente a uma tabela (Anexo III).

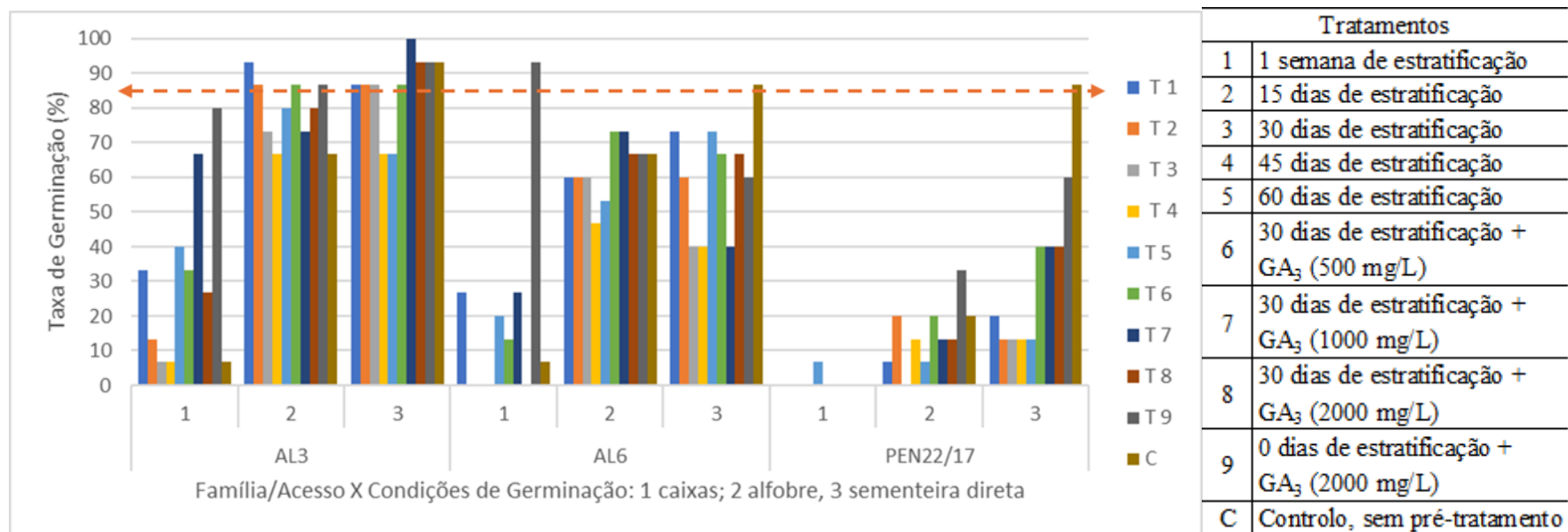


Figura 32 - Taxa de germinação (%) por família/acesso, condição e tratamento. (Nota: linha de referência a 85%).

A família AL3 obteve em média e no geral resultados superiores de taxa de germinação em comparação com a família AL6 e o acesso PEN e, conforme anteriormente referido a menor taxa de germinação foi observada na condição 1. Na família AL3 a taxa máxima de germinação por condição, na condição 1 ocorreu no tratamento 9 (80%). Na condição 2, sementeira em alfobre, a taxa de germinação máxima observada foi de cerca de 93% e ocorreu no tratamento 1, no entanto para os tratamentos 2, 6 e 9 obtiveram-se taxas de germinação interessantes superiores a 85%. Na condição 3, sementeira direta, ocorreu 100% de germinação no tratamento 7. Taxas de germinação superiores a 85% foram observadas também nos tratamentos 1, 2, 3, 6, 8, 9 e C.

Na família AL6, a taxa máxima de germinação por condição, na condição 1 ocorreu no tratamento 9 com cerca de 93%. Na condição 2 a taxa de germinação de cerca de 73% ocorreu nos tratamentos 6 e 7. Por fim na condição 3 a taxa de germinação observada foi de cerca de 87% no tratamento C, controlo.

No acesso PEN na condição 1 apenas foi observada germinação no tratamento 5, com taxa de germinação inferior a cerca de 7%. Na condição 2 a taxa de germinação máxima observada foi de cerca de 33% e ocorreu no tratamento 9, um valor inferior a 85%, o valor de referência. Para a condição 3, sementeira direta, obteve-se o resultado interessante de cerca de 87% de taxa de germinação no tratamento C. A condição 3 com o tratamento C que corresponde a um tratamento sem aplicação de nenhum tratamento pré-germinativo apresentou os melhores resultados de germinação para este acesso. Vilhena (2019) apesar de não testar os PEN 17 e PEN 22 utilizados no presente trabalho, obteve resultados superiores a 85% para PEN em estratificação a frio de 29, 46, 60 e 90 dias. Tendo observado cerca de 96% de germinação na estratificação de 90 dias. A referir que no trabalho de Vilhena (2019) os lotes de sementes testados foram do mesmo ano de colheita, enquanto no presente trabalho os lotes de sementes da mesma proveniência estiveram em frio desde a sua colheita/extração (2018).

Numa perspetiva de produção em viveiro, em larga escala, o tratamento pré-germinativo de mais fácil aplicação é o tratamento 9 (0 dias de estratificação húmida a frio e adição de ácido giberélico (GA₃) na concentração de 2000 mg/L) uma vez que não se aplica a estratificação húmida a frio, algo que necessita de condições muito específicas de temperatura (4°C) e humidade. A taxa média de germinação por condição de germinação e acesso/família é apresentado em Anexo IV.

7.2.4. Taxa de germinação por condição de sementeira e ano de processamento da semente

A figura 33 mostra a taxa de germinação por condição e ano em função do tratamento de pré-germinativo. Esta informação apresentada em gráfico é referente a uma tabela em anexo (Anexo V).

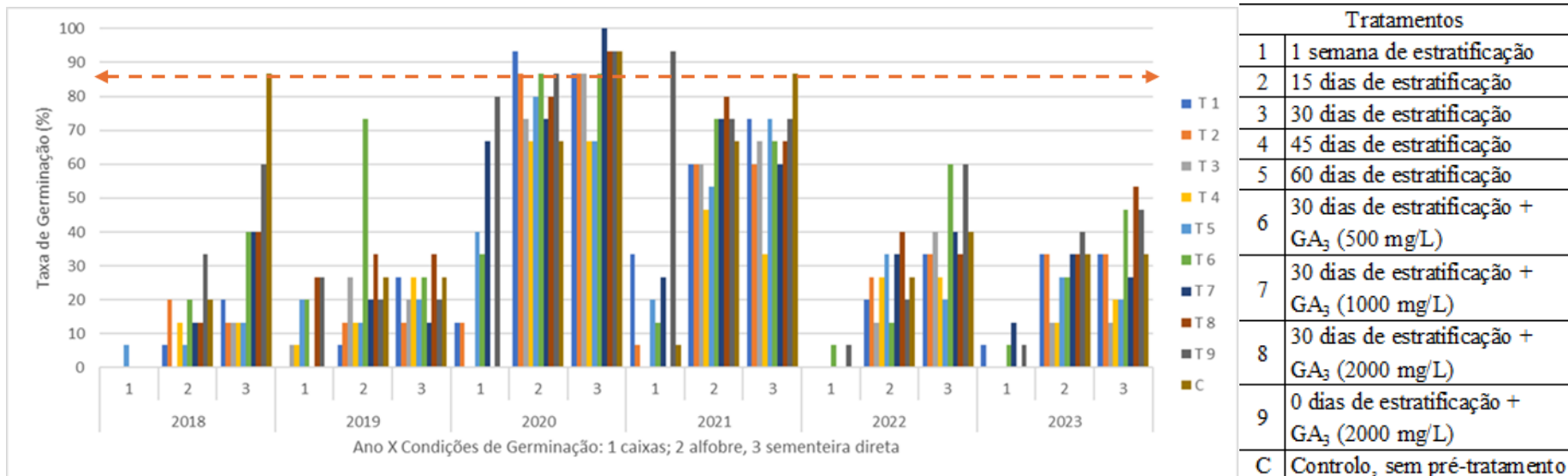


Figura 33 - Taxa de germinação (%) por condição, ano e tratamento.
 (Nota: linha de referência a 85%).

No período de 2018 a 2023 avaliado no ensaio, os anos com maior taxa de germinação em média e no geral foram observados em 2020 e 2021 e os valores mais baixos em 2019, 2018 e 2023. Considerando o ano, para o ano 2018 apenas o tratamento C, na condição 3, obteve taxa de germinação superior ao valor de referência de 85%. No ano 2019 o tratamento com maior taxa de germinação aconteceu na condição 2 foi o tratamento 6, onde foi aplicada uma estratificação a frio de 30 dias e adição de GA₃ na concentração de 500mg/L 24 horas antes da sementeira, no entanto o valor é inferior a 85%. No ano 2020 os melhores resultados de taxa de germinação são superiores a 90% e acontecem na condição 2 no tratamento 1 na condição 3 nos tratamentos 8, 9 e C. No ano de 2021 na condição 1 com o tratamento 9 obteve-se uma taxa de germinação superior a 85%. Globalmente a adição de ácido giberélico na concentração 2000 mg/L com estratificação e sem estratificação (tratamento 8 e 9, respetivamente), a adição de ácido giberélico na concentração 1000 mg/L com estratificação (tratamento 7) e o tratamento controlo apresentam os melhores resultados. Sem descartar que globalmente na sementeira em alfobre é evidente os bons resultados nos tratamentos com 1 e 2 semanas de estratificação húmida a frio, o tratamento com ácido giberélico na concentração 500 mg/L (tratamento 6) com resultados iguais ou superiores ao tratamento 9. Estratificação húmida a frio durante 45 e 60 dias não apresentou bons resultados.

O tratamento com ácido giberélico na concentração 2000 mg/L sem estratificação foi igualmente observado pelo Pinis et al., 2017. A utilização do ácido giberélico foi satisfatória na quebra de dormência da semente de *Arbutus unedo* como observado pelos autores Tilki et al., 2004; Smiris et al., 2006. Nas condições 2 e 3 não foram observadas no controlo taxas de germinação (%) inferiores a 60% como é referido por ICNF (2022) que a taxa de germinação é entre 50% e 60%.

De forma mais pormenorizada são apresentados em anexo (Anexo VI) a taxa de germinação (%) por acesso/família, anos de colheita e tratamentos pré-germinativos (1 a 9 e C) e respetivo período de germinação por condição.

7.2.4.1. Medições de temperatura (°C) e humidade (%)

A tabela 11 mostra a temperatura média, máxima e mínima (°C) e humidade média, máxima e mínima (%) realizada por um termohigrógrafo digital entre os dias 26 de fevereiro a 5 de julho. As plantas permaneceram no laboratório desde 30 de janeiro a 2 de fevereiro até 8 de junho de 2024, tendo sido posteriormente transferidas para o viveiro.

Tabela 11 - Temperatura (°C) média, máxima e mínima e Humidade (%) média máxima e mínima.

Mês	Temperatura média (°C)	Humidade média (%)	Temperatura máxima (°C)	Humidade máxima (%)	Temperatura mínima (°C)	Humidade mínima (%)
Fevereiro*	15,4	58,7	17,2	72,4	14,4	46,8
Março	16,0	71,2	20,8	82,7	13,6	37,5
Abril	20,2	62,7	23,8	79,8	15,4	29,9
Maio	19,9	61,4	25,3	74,4	16,6	41,9
Junho	23,5	54,8	27,1	69,4	20,7	37,6
Julho	23,9	60,7	27,4	65,4	21,1	52,8

A temperatura média (°C) dos meses de fevereiro a julho sofreu uma subida gradual no decorrer do ensaio. Esta subida gradual da temperatura foi algo esperado durante uma vez que a sua instalação ocorreu ainda no inverno caracterizado em Portugal continental por temperaturas mais baixas e terminou apenas no verão caracterizado por temperaturas em geral acima dos 20 °C.

A humidade relativa média (%) teve variações de cerca de 71,2% a 54,8%. A humidade relativa máxima (%) registada foi de cerca de 82,7% em março e humidade relativa mínima (%) foi de cerca de 29,9% no mês de abril.

A temperatura entre 10°C a 20°C é considerada por Ricardo *et al.* (1987) como favorável para germinação de sementes de medronheiro. A temperatura em média acima de 20 °C ocorreu apenas nos meses de junho e julho, no entanto houve registos de ocorrência de temperaturas acima desse valor de abril a maio. A temperatura é um dos fatores que influencia da germinação (Hartmann. et al., 2011). A temperatura máxima (°C) registada foi de cerca de 27,4 °C no mês de julho. A temperatura mínima (°C) registada foi de cerca de 14,4 °C e ocorreu em março.

A germinação em geral ocorreu de fevereiro a abril onde se observaram as condições ideais de temperatura (entre 14°C e 20 °C). Este período coincide com temperatura primaveril que em geral promove a germinação, como referenciado por Ricardo *et al.* (1987).

7.2.5. Análise de componentes principais

A figura 34 mostra a análise de componentes principais (PCA). Observa-se que os fatores 1 e 2 explicam cerca de 36,1% e 25,1% da variância total observada (Anexo VII).

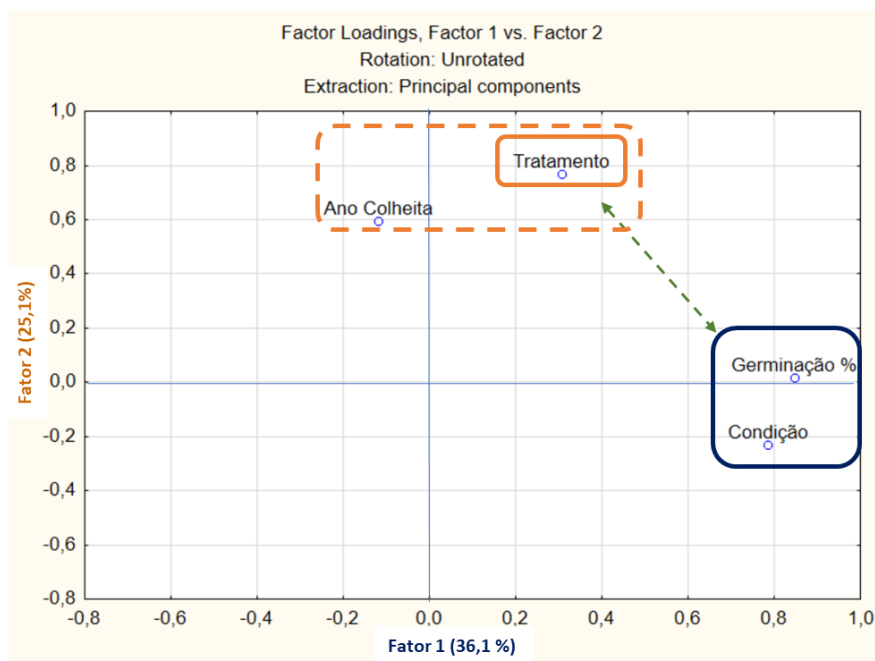


Figura 34 - Análise de componentes principais ensaio de tratamentos pré-germinativos (Ensaio I).

O fator 1 demonstram a relação entre a taxa de germinação e a condição de germinação, sugerindo que a germinação depende da condição de sementeira testada. Com os resultados anteriores confirma-se que a taxa de germinação foi dependente da condição de sementeira testada uma vez que se observo uma maior taxa de germinação nas condições 2 e 3.

O fator 2 demonstra a relação entre o tratamento e o ano de colheita está também relacionado com a taxa de germinação e condição de sementeira. Estes resultados indicam uma relação direta entre a taxa de germinação e condição de sementeira e ainda mostra que é dependente do tratamento. A relação entre o ano de colheita e o tratamento estará relacionada com uma maior taxa de germinação para os anos de 2020 e 2021 e, ainda, melhor resultado geral para todos os tratamentos.

II- Ensaio de enraizamento *ex vitro* e aclimatização

7.3. Taxa de sobrevivência

Entre as variáveis analisadas globalmente por clone ou em função dos tratamentos apenas a variável do comprimento da maior raiz (LLR) apresentou uma distribuição normal (Anexo VIII). As restantes variáveis, sobrevivência, comprimento dos rebentos (SL), avaliação da parte radicular, avaliação da parte aérea, número de raízes principais (NPR), *callus* e micorrizas (*Myc Establish*), são variáveis não paramétricas.

A sobrevivência foi avaliada por contagem direta das plantas sobreviventes por clone e tratamento ao fim de 2 meses e 5 dias. A tabela 12 mostra a taxa de sobrevivência média numa análise global em função do material vegetal testado, clones 1001 e 8001. O teste Kruskal Wallis confirma a existência de diferenças significativas na sobrevivência em função dos clones testados (Anexo IX).

Tabela 12 - Valor da sobrevivência média (%) em função do clone.

Clones	N	Sobrevivência (%)	
		Med	± SE
1001	360	54,44	± 2,63 ^a
8001	360	44,44	± 2,62 ^b
Total Geral	720	49,44	± 1,86

Nota: letras diferentes mostram a existência de diferenças significativas ($P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis).

Existe uma diferença na taxa de sobrevivência favorável ao clone 1001 comparativamente ao clone 8001. Estes valores são relativamente baixos em comparação com outros resultados em trabalhos de Martins et al., (2019) e Gomes & Canhoto., (2009) com taxas superiores 80% de sobrevivência.

A tabela 13 mostra a taxa de sobrevivência média em função do tratamento testado nos três substratos diferentes, Biobizz (S1), Siroflorestal (S2) e Turfa:Perlite (S3) com e sem adição de Rhizotonic, adição de pastilha de ectomicorrizas nos substratos S2 e S3 correspondendo aos tratamentos (S9 e S8 respetivamente) e adição no substrato Turfa:Perlite adubo de libertação controlada (S4), combinação de adubo e fósforo (S5), combinação de fósforo e calcário (S6) e combinação de adubo, fósforo e calcário (S7). O teste Kruskal Wallis confirmou a existência de diferenças significativas na taxa de sobrevivência em função dos tratamentos testados (Anexo X).

Tabela 13 -Taxa de sobrevivência média (%) em função do tratamento testado.

Tratamentos	N	Sobrevivência (%)		Tratamentos	
		Med	± SE		
S1.0	60	76,67	± 5,51 ^a	S1.0	BioBizz
S1.1	60	66,67	± 6,14 ^a	S1.1	" + Rhizotonic
S2.0	60	70,00	± 5,97 ^a	S2.0	SiroFlorestal
S2.1	60	53,33	± 6,49 ^a	S2.1	" + Rhizotonic
S3.0	60	58,33	± 6,42 ^a	S3.0	Turfa:Perlite (50:50)
S3.1	60	45,00	± 6,48 ^{ab}	S3.1	" + Rhizotonic
S4	60	63,33	± 6,27 ^a	S4	" + Adubo controlado
S5	60	13,33	± 4,43 ^{bc}	S5	" + " + Fósforo
S6	60	15,00	± 4,65 ^{bc}	S6	" + Fósforo + Calcário
S7	60	8,33	± 3,60 ^c	S7	" + Adubo + Fósforo + Calário
S8	60	53,33	± 6,49 ^a	S8	" + pastilha ectomicorizas
S9	60	70,00	± 5,97 ^a	S9	S2 + pastilha ectomicorizas
Total Geral	720	49,44	± 1,86		

Nota: letras diferentes mostram a existência de diferenças significativas (P<0,05, Teste de Kruskal-Wallis).

Os melhores resultados para a sobrevivência são observados nos tratamentos S1.0, S1.1, S2.1, S3.0, S4, S8 e S9, sem diferenças significativas. Mesmo que para os tratamentos com aplicação de Rhizotonic não houve diferenças significativas em comparação com os tratamentos sem a sua aplicação, os resultados obtidos são inferiores, não se justificando assim a sua utilização. É de salientar a sobrevivência média com melhores resultados de cerca de 77% no substrato BioBizz, tratamento S1.0 e com 70% nos tratamentos S2.0 e S9 ambos com o substrato SiroFlorestal, sendo o tratamento S9 o mesmo substrato com adição da pastilha de ectomicorizas. Os tratamentos S5, S6 e S7 apresentam sobrevivência média inferior a 16%.

A figura 35 mostra o aspeto geral dos tratamentos nos dias 10 ou 13 de maio, quando se realizou o levantamento do ensaio (após 2 meses e cinco dias), se procedeu à monitorização dos ensaios (avaliação das diferentes vareáveis) e à transplantação para tubete para posterior transporte para viveiro

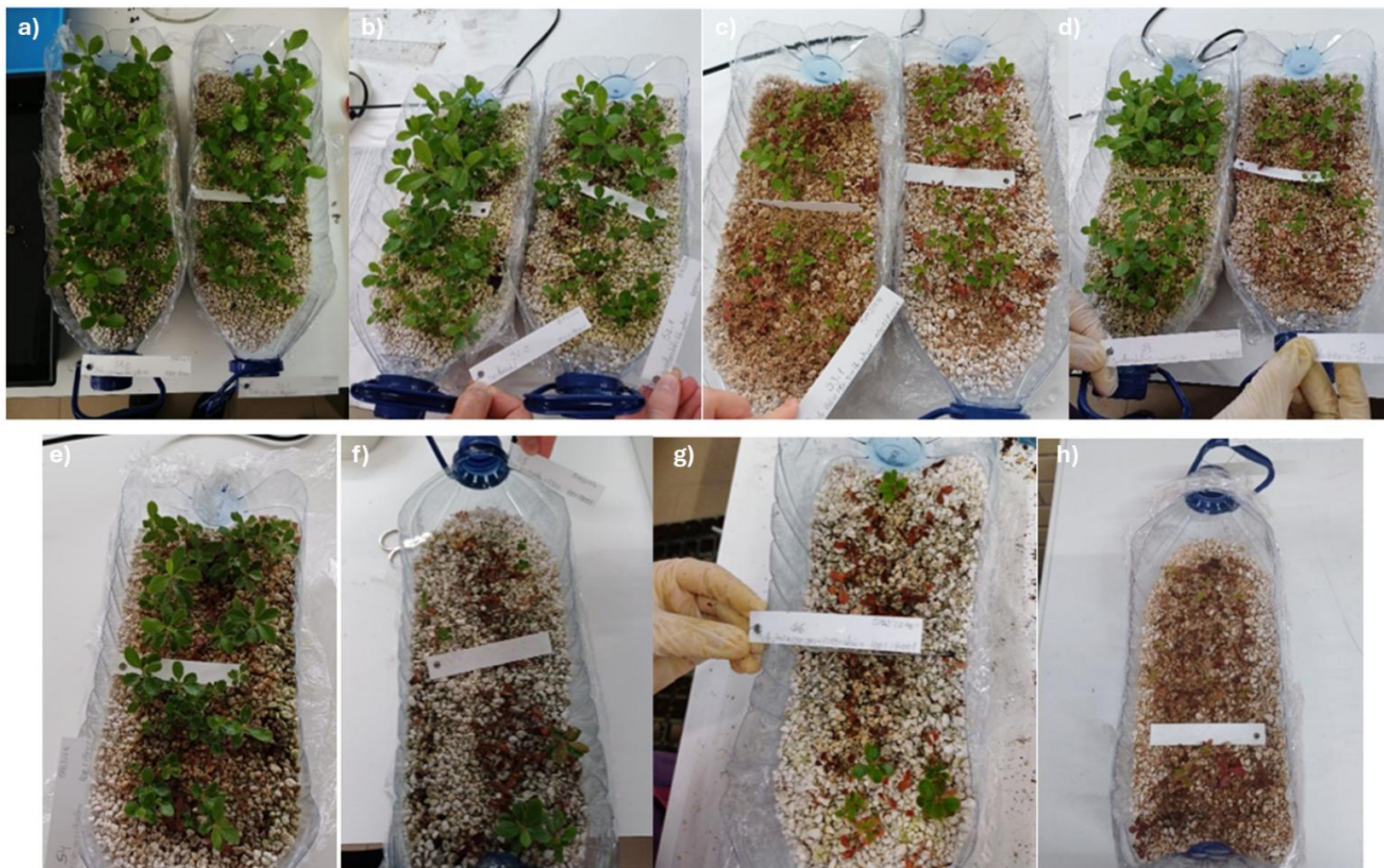


Figura 35 - Aspeto geral dos tratamentos ao fim de 2 meses e 5 dias: a) S1.0 (mais à esquerda) e S1.1 (mais à direita), em b) S2.0 (mais à direita) e S2.1 (mais à esquerda), em c) S3.1 (mais à direita) e S3.0 (mais à esquerda); d) S9 (à direita) e S8 (à esquerda); e) S4; f) S5; g) S6 e h) S7.

Nota: S1.0 = Substrato BioBizz; S1.1= BioBizz + Rhizotonic; S2.0 = Substrato SiroFlorestal; S2.1= SiroFlorestal + Rhizotonic; S3.0 = Turfa:Perlite (50:50); S3.1= Turfa:Perlite (50:50) + Rhizotonic; S9 = SiroFlorestal+ Pastilha de ectomicorrizas; S8= Turfa:perlite + Pastilha de ectomicorrizas; S4= Turfa:perlite + Adubo de libertação controlada; S5= Turfa:perlite + Adubo de libertação controlada + Fósforo; S6= Turfa:perlite + Fósforo + Calcário e S7= Turfa:perlite + Adubo de libertação controlada + Fósforo + Calcário.

Uma nota importante é que depois da aclimatização e durante a transplantação para tubetes e consequente transferência para condições de viveiro, se as plantas apresentarem uma parte aérea ou radicular relativamente grande deve-se proceder a uma poda ligeira da parte aérea e do sistema radicular reduzindo assim o stresse, evitar o emurchimento do ápice e danos na raiz devido ao seu enrolamento. A poda ligeira da raiz irá também estimular o seu desenvolvimento.

A tabela 14 mostra a taxa de sobrevivência em função do tratamento, observada para os clones 1001 e 8001. Através do teste Kruskal Wallis avaliou-se a existência de diferenças significativas entre tratamentos (Anexo XI).

Tabela 14 - Clone 1001 e 8001 valor da sobrevivência média (%) em função do tratamento.

Clone	Tratamentos	Sobrevivência (%)		Tratamentos	Clone	Tratamentos	Sobrevivência (%)	
		N	Med ± SE				N	Med ± SE
1001	S1.0	30	90,00 ± 5,57^a	S1.0	8001	S1.0	30	63,33 ± 8,95^{ab}
	S1.1	30	76,67 ± 7,85^{ab}	S1.1		S1.1	30	56,67 ± 9,20^{ab}
	S2.0	30	90,00 ± 5,57^a	S2.0		S2.0	30	50,00 ± 9,28 ^{a-c}
	S2.1	30	60,00 ± 9,10 ^{a-c}	S2.1		S2.1	30	46,67 ± 9,26 ^{a-c}
	S3.0	30	60,00 ± 9,10 ^{a-c}	S2.1		S3.0	30	56,67 ± 9,20^{ab}
	S3.1	30	46,67 ± 9,26 ^{a-c}	S3.0		S3.1	30	43,33 ± 9,20 ^{a-c}
	S4	30	60,00 ± 9,10 ^{a-c}	S3.1		S4	30	66,67 ± 8,75^a
	S5	30	13,33 ± 6,31 ^c	S4		S5	30	13,33 ± 6,31 ^{bc}
	S6	30	26,67 ± 8,21 ^{bc}	S5		S6	30	3,33 ± 3,33 ^c
	S7	30	13,33 ± 6,31 ^c	S6		S7	30	3,33 ± 3,33 ^c
	S8	30	40,00 ± 9,10 ^{a-c}	S7		S8	30	66,67 ± 8,75^a
	S9	30	76,67 ± 7,85^{ab}	S8		S9	30	63,33 ± 8,95^{ab}
	S9	30	76,67 ± 7,85^{ab}	S9		S9	30	63,33 ± 8,95^{ab}
Total Geral	360	54,44 ± 2,63		Total Geral	360	44,44 ± 2,62		

Nota: letras diferentes mostram a existência de diferenças significativas (P<0,05, Teste de Kruskal-Wallis).

É notório para o clone 1001 uma taxa de sobrevivência elevada nos tratamentos S1.0, S2.0, ambos com valores de 90% e em S1.1 e S9 com valores de cerca de 77%. Os melhores resultados de sobrevivência para o clone 1001 são observados nos tratamentos com os substratos BioBizz (S1.0) e SiroFlorestal (S2.0) sem aplicação de Rhizotonic e, ainda, neste substrato último mencionado com a adição de pastilha de micorrizas (tratamento S9).

Para o clone 8001, a melhor taxa de sobrevivência cerca de 67% é obtida no tratamento S4 e S8. Ambos os tratamentos têm de base como substrato a mistura Turfa:Perlite (50:50), com adição de adubo de libertação controlada ou ectomicorrizas, respetivamente. No entanto, estes resultados não apresentam diferenças significativas em relação aos tratamentos S1.0 e S9 (com valor médio superior a 60%). Este clone mostra encontrar boas condições de aclimatização nos substratos com adição de pastilha de ectomicorrizas (tratamentos S8 e S9), na mistura de Turfa:Perlite com adubo de libertação controlada (S4) e no substrato BioBizz sem adição de Rhizotonic (S1.0).

7.4. Avaliação dos parâmetros de crescimento vegetal e do estabelecimento de micorrizas

A tabela 15 mostra os resultados globais para os parâmetros de comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), *callus* e presença de micorrizas em função dos clones. Através do teste Kruskal Wallis e teste Tukey (para a variável paramétrica LLR) avaliou-se a existência de diferenças significativas entre clones (Anexo XII).

Tabela 15 - Valores médios do comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), *callus* e presença de micorrizas em função do clone.

Clones	N	SL (cm)	LLR (cm)	Aval. P. Radicular	Aval. P. Aérea	NPR	<i>Callus</i> (0-3)	Myc Establish (0-4)
		Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE
1001	196	3,78 ± 0,11 ^b	6,68 ± 0,17 ^b	2,42 ± 0,03 ^b	3,78 ± 0,04 ^a	1,94 ± 0,07 ^b	0,56 ± 0,07 ^a	0,22 ± 0,04 ^a
8001	160	4,87 ± 0,16^a	8,31 ± 0,19^a	2,73 ± 0,04^a	3,91 ± 0,03 ^a	2,76 ± 0,14^a	0,48 ± 0,07 ^a	0,23 ± 0,09 ^a
Total Geral	356	4,27 ± 0,10	7,41 ± 0,13	2,56 ± 0,03	3,84 ± 0,02	2,31 ± 0,08	0,52 ± 0,05	0,23 ± 0,04

Nota: letras diferentes mostram a existência de diferenças significativas (P<0,05, Teste de Kruskal-Wallis e Tukey).

O clone 8001 apresentou melhores resultados com diferenças significativas para as variáveis, comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e número de raízes principais (NPR). As variáveis da parte aérea, *callus* e presença de micorrizas não evidenciaram a existência de diferenças significativas comparativamente

com o clone 1001. A avaliação da parte radicular corresponde em média para ambos os clones a presença de raízes principais, secundárias e algumas terciárias. Durante a contagem de plantas sobreviventes observou-se nas plantas mortas a presença mais frequente de *callus* no clone 8001 (figura 36). A presença de *callus* poderá indicar excesso de hormona, o ideal para este clone seria reduzir o tempo de contacto com a auxina.



Figura 36 - Presença de *callus* (indicados pelas setas amarelas).

A tabela 16 mostra os resultados globais para os parâmetros de comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), *callus* e presença de micorrizas em função dos tratamentos testados. Através do teste Kruskal Wallis e teste Tukey (para a variável paramétrica LLR) avaliou-se a existência de diferenças significativas entre tratamentos (Anexo XIII).

Tabela 16 -Valores médios do comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), *callus* e presença de micorrizas em função dos tratamentos testados.

Tratamentos	N	SL (cm)	LLR (cm)	Aval. P. Radicular	Aval. P. Aérea	NPR	<i>Callus</i> (0-3)	Myc Establish (0-4)
		Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE
S1.0	46	5,56 ± 0,28 ^a	7,57 ± 0,39 ^{ab}	2,49 ± 0,06 ^a	3,98 ± 0,02 ^a	2,50 ± 0,25 ^a	0,46 ± 0,11 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S1.1	40	5,01 ± 0,27 ^a	7,23 ± 0,35 ^{a-c}	2,49 ± 0,06 ^a	4,00 ± 0,00 ^a	2,15 ± 0,23 ^a	0,43 ± 0,15 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S2.0	42	5,08 ± 0,34 ^{ab}	8,01 ± 0,41 ^a	2,67 ± 0,07 ^a	4,00 ± 0,00 ^a	2,55 ± 0,28 ^a	1,05 ± 0,19 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S2.1	32	4,31 ± 0,28 ^{a-c}	7,75 ± 0,26 ^{ab}	2,69 ± 0,10 ^a	3,94 ± 0,04 ^{ab}	1,84 ± 0,17 ^a	1,03 ± 0,22 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S3.0	35	2,64 ± 0,11 ^d	8,04 ± 0,39 ^a	2,54 ± 0,12 ^a	3,44 ± 0,10 ^b	1,94 ± 0,16 ^a	0,51 ± 0,14 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S3.1	27	3,30 ± 0,17 ^{cd}	7,61 ± 0,51 ^{a-c}	2,48 ± 0,10 ^a	3,44 ± 0,14 ^{ab}	1,96 ± 0,22 ^a	0,46 ± 0,17 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S4	38	4,24 ± 0,19 ^{a-c}	5,81 ± 0,37 ^c	2,57 ± 0,08 ^a	3,97 ± 0,03 ^a	2,50 ± 0,22 ^a	0,22 ± 0,08 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S5	8	2,88 ± 0,32 ^{b-d}	4,88 ± 0,97 ^{bc}	2,56 ± 0,26 ^a	3,81 ± 0,09 ^{ab}	3,13 ± 0,58 ^a	0,31 ± 0,21 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S6	9	2,54 ± 0,26 ^{cd}	7,22 ± 1,11 ^{a-c}	2,44 ± 0,15 ^a	3,22 ± 0,36 ^{ab}	1,56 ± 0,24 ^a	0,11 ± 0,07 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S7	5	3,60 ± 0,19 ^{a-d}	8,40 ± 0,89 ^{a-c}	2,60 ± 0,19 ^a	4,00 ± 0,00 ^{ab}	1,80 ± 0,20 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S8	32	2,95 ± 0,16 ^{cd}	7,50 ± 0,43 ^{a-c}	2,48 ± 0,11 ^a	3,72 ± 0,11 ^{ab}	2,34 ± 0,24 ^a	0,22 ± 0,10 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S9	42	5,02 ± 0,30 ^{ab}	7,68 ± 0,37 ^{ab}	2,67 ± 0,07 ^a	3,95 ± 0,03 ^a	2,79 ± 0,27 ^a	0,52 ± 0,14 ^a	1,46 ± 0,14 ^a
Total Geral	356	4,27 ± 0,10	7,41 ± 0,13	2,56 ± 0,03	3,84 ± 0,02	2,31 ± 0,08	0,52 ± 0,05	0,23 ± 0,04

S1.0= BioBizz; S1.1= BioBizz + Rhizotonic; S2.0= SiFlorestal; S2.1= SiroFlorestal + Rhizotonic; S3.0= Turfa:Perlite(50:50); S3.1= Turfa:perlite(50:50) + Rhizotonic; S4= Turfa:Perlite (50:50)+ Adubo de liberação controlada; S5= Turfa:Perlite(50:50) + Adubo + Fósforo; S6=Turfa:Perlite(50:50)+ Fósforo+ Calcário; S7= Turfa:Perlite(50:50) + Adubo + Fósforo + Calcário; S8= Turfa:Perlite(50:50) + Pastilha de ectomicorrizas; S9= SiroFlorestal + Pastilha ectomicorrizas

Nota: letras diferentes mostram a existência de diferenças significativas (P<0,05, Teste de Kruskal-Wallis e Tukey).

Os tratamentos S1.0, S1.1, S2.0 e S9 obtiveram comprimentos dos rebentos em média superiores (5 cm) e avaliação da parte aérea igual a 4 (valor máximo da escala numérica para esse parâmetro) ou em média acima de 3,95. O comprimento da maior raiz (LLR) foi maior nos tratamentos S1.0, S2.0, S2.1, S3.0 e S9. Os tratamentos S1.0, correspondendo ao substrato BioBizz, S2.0 correspondendo ao substrato SiroFlorestal e S9 que corresponde ao substrato anterior com adição de pastilha de ectomicorrizas são os que apresentam para todos os parâmetros avaliados os melhores resultados. A avaliação da parte radicular, assim como o número de raízes principais (NRP) e *callus* não apresentaram diferenças significativas em função do tratamento. Em média para a avaliação da parte radicular existem raízes principais, secundárias e algumas terciárias.

É notória em relação ao tratamento S9 a presença de ectomicorrizas com diferença significativa do tratamento S8 (Turfa:Perlite (50:50) + Pastilha de ectomicorrizas). O substrato SiroFlorestal (tratamento S9) mostra-se em comparação com o substrato Turfa:Perlite melhor para o estabelecimento de ectomicorrizas nas raízes das plântulas de medronheiro durante o enraizamento *ex vitro* e a aclimatização (ao fim de 2 meses e 5 dias). Nas figuras 37 e 38 observou-se a presença de micorrizas nas raízes do tratamento S9.

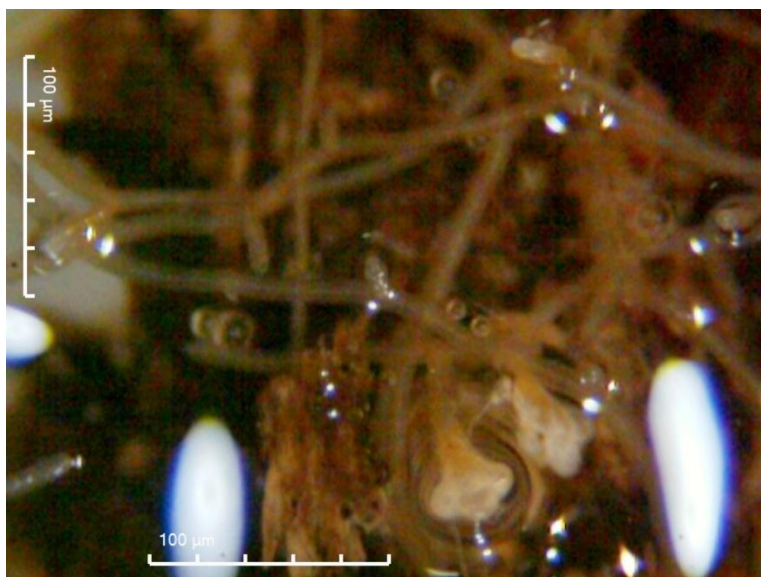


Figura 37 - Presença de micorrizas nas raízes no tratamento S9.
Nota: S9= Substrato SiroFlorestal + Pastilha de ectomicorrizas.

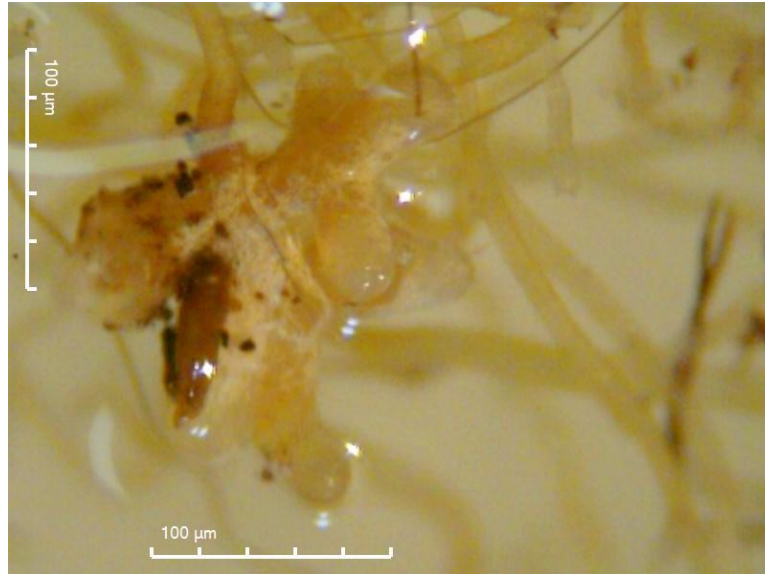


Figura 38 -Presença de micorrizas nas raízes do tratamento S9, ampliado.
Nota: S9= Substrato SiroFlorestal + Pastilha de ectomicorrizas.

Para o clone 1001 a tabela 17 mostra os resultados para os parâmetros de comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), *callus* e presença de micorrizas em função dos tratamentos testados. Através do teste Kruskal Wallis e teste Tukey (para a variável paramétrica LLR) avaliou-se a existência de diferenças significativas entre tratamentos testados (Anexo XIV).

Tabela 17 -Clone 1001 valores médios do comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), *callus* e presença de micorrizas em função dos tratamentos testados.

Clone	Tratamentos	N	SL (cm)	LLR (cm)	Aval. P. Radicular	Aval. P. Aérea	NPR	<i>Callus</i> (0-3)	Myc Establish (0-4)
			Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE
1001	S1.0	27	5,06 ± 0,37^a	6,44 ± 0,45^a	2,44 ± 0,08 ^{ab}	3,96 ± 0,04^a	2,11 ± 0,19 ^a	0,44 ± 0,16 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S1.1	23	4,26 ± 0,25^{ab}	5,87 ± 0,28 ^{ab}	2,48 ± 0,07 ^{ab}	4,00 ± 0,00^a	1,91 ± 0,23 ^a	0,30 ± 0,18 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S2.0	27	4,26 ± 0,29^{ab}	7,81 ± 0,52^a	2,57 ± 0,08^a	4,00 ± 0,00^a	2,11 ± 0,28 ^a	1,22 ± 0,25 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S2.1	18	3,64 ± 0,25 ^{a-c}	7,58 ± 0,41^a	2,53 ± 0,16^a	3,94 ± 0,06^a	1,56 ± 0,17 ^a	1,19 ± 0,31 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S3.0	18	2,39 ± 0,15 ^c	7,33 ± 0,47 ^{ab}	2,06 ± 0,06 ^b	3,33 ± 0,14 ^{bc}	1,89 ± 0,20 ^a	0,36 ± 0,16 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S3.1	14	2,89 ± 0,21 ^{bc}	6,96 ± 0,66 ^{ab}	2,43 ± 0,14 ^{ab}	3,00 ± 0,21 ^c	1,93 ± 0,25 ^a	0,57 ± 0,25 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S4	18	4,17 ± 0,26^{ab}	5,15 ± 0,47 ^b	2,44 ± 0,12 ^{ab}	4,00 ± 0,00^a	2,00 ± 0,26 ^a	0,36 ± 0,16 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S5	4	2,38 ± 0,13 ^{a-c}	4,13 ± 0,90 ^{ab}	2,00 ± 0,00 ^{ab}	3,75 ± 0,14^a	2,25 ± 0,25 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S6	8	2,55 ± 0,30 ^{bc}	7,44 ± 1,24 ^{ab}	2,44 ± 0,18 ^{ab}	3,13 ± 0,40^a	1,63 ± 0,26 ^a	0,13 ± 0,08 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S7	4	3,50 ± 0,20 ^{a-c}	8,38 ± 1,14 ^{ab}	2,63 ± 0,24 ^{ab}	4,00 ± 0,00^a	2,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S8	12	2,63 ± 0,26 ^c	5,93 ± 0,46 ^{ab}	2,04 ± 0,20 ^{ab}	3,58 ± 0,19^a	2,00 ± 0,25 ^a	0,04 ± 0,04 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S9	23	3,99 ± 0,29^{ab}	6,53 ± 0,45 ^{ab}	2,59 ± 0,09^a	3,91 ± 0,06^a	1,91 ± 0,21 ^a	0,57 ± 0,20 ^a	1,62 ± 0,15^a	
Total Geral	196	3,78 ± 0,11	6,68 ± 0,17	2,42 ± 0,03	3,78 ± 0,04	1,94 ± 0,07	0,56 ± 0,07	0,02 ± 0,01	

S1.0= BioBizz; S1.1= BioBizz + Rhizotonic; S2.0= SiFlorestal; S2.1= SiroFlorestal + Rhizotonic; S3.0= Turfa:Perlite(50:50); S3.1= Turfa:perlite(50:50) + Rhizotonic; S4= Turfa:Perlite (50:50)+ Adubo de liberação controlada; S5= Turfa:Perlite(50:50) + Adubo + Fósforo; S6=Turfa:Perlite(50:50)+ Fósforo+ Calcário; S7= Turfa:Perlite(50:50) + Adubo + Fósforo + Calcário; S8= Turfa:Perlite(50:50) + Pastilha de ectomicorrizas; S9= SiroFlorestal + Pastilha ectomicorrizas

Nota: letras diferentes mostram a existência de diferenças significativas (P<0,05, Teste de Kruskal-Wallis e Tukey).

O clone 1001 para o número de raízes principais (NPR) e presença *callus*, não apresenta diferenças significativas entre os tratamentos testados. Em média, os melhores valores para o comprimento dos rebentos (SL) correspondem a 5,06 cm no tratamento S1.0 e ao valor de 4,26 cm nos tratamentos S1.1 e S2.0. Os melhores valores para comprimento da maior raiz (LLR) foram observados no tratamento S2.0 e no tratamento S2.1 (valores superiores a 7 cm). No tratamento S1.0 o valor para o LLR foi de 6,44 cm \pm 0.45 cm.

A avaliação da parte radicular teve melhores resultados nos tratamentos S2.0, S2.1 e S9, mas sem diferenças significativas em relação aos restantes tratamentos. Em média apresentam para todos os tratamentos raízes primárias, secundárias e algumas terciárias em particular para os tratamentos com melhores resultados. A avaliação da parte aérea apresenta diferenças significativas com resultados em média inferiores com os restantes tratamentos apenas nos tratamentos S3.0 e S3.1.

A tabela 18 mostra os resultados para os parâmetros de comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), *callus* e presença de micorrizas em função dos tratamentos testados para o clone 8001. Através do teste Kruskal Wallis e teste Tukey (para a variável paramétrica LLR) avaliou-se a existência de diferenças significativas entre tratamentos testados (Anexo XV).

Tabela 18 - Clone 8001 valores médios do comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), *callus* e desenvolvimento de micorrizas em função dos tratamentos testados.

Clone	Tratamentos	N	SL (cm)	LLR (cm)	Aval. P. Radicular	Aval. P. Aérea	NPR	<i>Callus</i> (0-3)	Myc Establish (0-4)
			Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE	Med ± SE
8001	S1.0	19	6,26 ± 0,38 ^a	9,16 ± 0,50 ^a	2,55 ± 0,10 ^a	4,00 ± 0,00 ^a	3,05 ± 0,54 ^a	0,47 ± 0,16 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S1.1	17	6,02 ± 0,43 ^{ab}	9,07 ± 0,45 ^a	2,50 ± 0,11 ^a	4,00 ± 0,00 ^a	2,47 ± 0,43 ^a	0,59 ± 0,25 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S2.0	15	6,57 ± 0,63 ^{ab}	8,37 ± 0,66 ^{ab}	2,83 ± 0,12 ^a	4,00 ± 0,00 ^a	3,33 ± 0,57 ^a	0,73 ± 0,26 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S2.1	14	5,18 ± 0,48 ^{a-c}	7,96 ± 0,31 ^{ab}	2,89 ± 0,08 ^a	3,93 ± 0,07 ^a	2,21 ± 0,30 ^a	0,82 ± 0,30 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S3.0	17	2,91 ± 0,12 ^d	8,79 ± 0,58 ^{ab}	3,06 ± 0,15 ^a	3,56 ± 0,15 ^a	2,00 ± 0,27 ^a	0,68 ± 0,23 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S3.1	13	3,75 ± 0,23 ^{b-d}	8,32 ± 0,77 ^{ab}	2,54 ± 0,14 ^a	3,92 ± 0,08 ^a	2,00 ± 0,39 ^a	0,35 ± 0,25 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S4	20	4,31 ± 0,29 ^{a-d}	6,41 ± 0,55 ^b	2,68 ± 0,12 ^a	3,95 ± 0,05 ^a	2,95 ± 0,32 ^a	0,10 ± 0,05 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S5	4	3,38 ± 0,55 ^{a-d}	5,63 ± 1,78 ^{ab}	3,13 ± 0,31 ^a	3,88 ± 0,13 ^a	4,00 ± 1,00 ^a	0,63 ± 0,38 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S6	1	2,50 ± 0,00 ^{a-d}	5,50 ± 0,00 ^{ab}	2,50 ± 0,00 ^a	4,00 ± 0,00 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S7	1	4,00 ± 0,00 ^{a-d}	8,50 ± 0,00 ^{ab}	2,50 ± 0,00 ^a	4,00 ± 0,00 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
	S8	20	3,15 ± 0,19 ^{cd}	8,45 ± 0,53 ^{ab}	2,75 ± 0,09 ^a	3,80 ± 0,14 ^a	2,55 ± 0,36 ^a	0,33 ± 0,16 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
S9	19	6,26 ± 0,41 ^a	9,07 ± 0,42 ^a	2,76 ± 0,10 ^a	4,00 ± 0,00 ^a	3,84 ± 0,43 ^a	0,47 ± 0,19 ^a	1,00 ± 0,26 ^a	
Total Geral	160	4,87 ± 0,16	8,31 ± 0,19	2,73 ± 0,04	3,91 ± 0,03	2,76 ± 0,14	0,48 ± 0,07	0,00 ± 0,00	

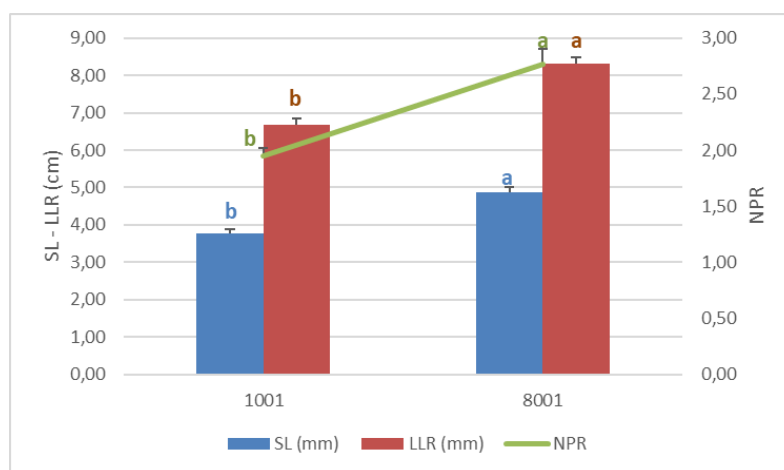
S1.0= BioBizz; S1.1= BioBizz + Rhizotonic; S2.0= SiFlorestal; S2.1= SiroFlorestal + Rhizotonic; S3.0= Turfa:Perlite(50:50); S3.1= Turfa:perlite(50:50) + Rhizotonic; S4= Turfa:Perlite (50:50)+ Adubo de libertação controlada; S5= Turfa:Perlite(50:50) + Adubo + Fósforo; S6=Turfa:Perlite(50:50)+ Fósforo+ Calcário; S7= Turfa:Perlite(50:50) + Adubo + Fósforo + Calcário; S8= Turfa:Perlite(50:50) + Pastilha de ectomicorrizas; S9= SiroFlorestal + Pastilha ectomicorrizas

Nota: letras diferentes mostram a existência de diferenças significativas (P<0,05, Teste de Kruskal-Wallis e Tukey).

No clone 8001 para os parâmetros de crescimento vegetal, a avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR) e *callus*, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos testados. Em média os melhores valores para o comprimento dos rebentos (SL) correspondem a 6,57cm no tratamento S2.0, ao valor de 6,26 cm nos tratamentos S1.0 e S9. Em média os melhores valores para o comprimento da maior raiz (LLR) correspondem a 9,16 cm no tratamento S1.0 e ao valor de 9,07 cm nos tratamentos S1.1 e S9. Os tratamentos com maior comprimento dos rebentos e da raiz para ambos os parâmetros foram observados nos tratamentos S1.0, S1.1 e S9.

7.5. Regressão linear

A regressão múltipla mostra que a variável comprimento dos rebentos (SL) em função ($P < 0,05$) do clone, tratamento, comprimento da raiz, avaliação da parte radicular e da parte aérea e do número de raízes principais com um coeficiente de correlação $R = 0,69$. Estes resultados mostram a relevância do tratamento (tipo de substrato), a funcionalidade do sistema de radicular de forma a estimular o desenvolvimento da parte aérea (SL) e a garantia do melhor desenvolvimento na aclimatização. A figura 39 mostra para os diferentes clones (1001 e 8001) a relação com SL, LLR e NPR.



Regression Summary for Dependent Variable: SL (mm) (Global_aclim_março5.sta)						
R= ,69369554 R²= ,48121350 Adjusted R²= ,46925301						
F(8,347)=40,234 p<0,0000 Std Error of estimate: 1,3346						
	b*	Std.Err. of b*	b	Std.Err. of b	t(347)	p-value
N=356						
Intercept			22,16265	2,996478	7,39623	0,000000
Clone	0,130158	0,043777	0,00007	0,000023	2,97320	0,003153
Tratamento	-0,371572	0,042519	-0,21933	0,025098	-8,73898	0,000000
LLR (mm)	0,238827	0,042799	0,17667	0,031661	5,58026	0,000000
Aval.P Radic	0,111200	0,044740	0,39943	0,160708	2,48545	0,013409
Aval.P.Aerea	0,145735	0,043858	0,58651	0,176506	3,32290	0,000986
NPR	0,236115	0,042334	0,29476	0,052849	5,57746	0,000000
Callus	0,054335	0,040077	0,10845	0,079990	1,35574	0,176063
Myc (Estab.)	-0,004307	0,039129	-0,07474	0,679090	-0,11007	0,912421

Figura 39 - Relação do comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR) e número de raízes principais (NPR) em função dos clones testados.

Conclui-se que o clone 8001 apresenta em média melhores resultados para as três variáveis apresentadas. Estes resultados sugerem que seria possível antecipar a transplantação reduzindo o período de aclimatização um dos objetivos deste trabalho. Há ainda a referir, em particular para o clone 8001, considerando a taxa de sobrevivência e a presença de *callus* na base dos rebentos mortos que será conveniente no próximo processo de aclimatização reduzir o tempo de contato entre a auxina e a base do rebento ou concentração da auxina.

7.6. Análise de componentes principais

A figura 40 mostra a análise de componentes principais, observando-se que os fatores 1 e 2 explicam cerca de 25,0% e 17,8% da variância total observada (Anexo XVI).

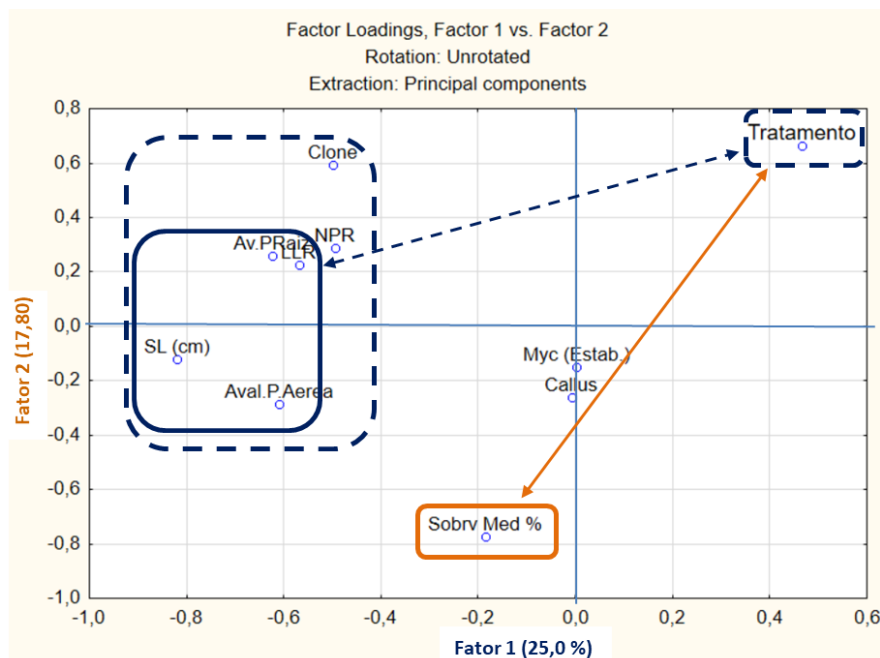


Figura 40 - Análise de componentes principais (PCA) ensaio II.

O fator 1 mostra relação direta entre as variáveis como o comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR) e avaliação da parte aérea e radicular conforme anteriormente observado pela regressão múltipla.

O fator 2 mostra que a sobrevivência média está inversamente relacionada com o tratamento. O tratamento testado influencia a sobrevivência média das plântulas, conforme anteriormente observado.

7.7. Análise dos substratos

Os resultados da condutividade elétrica dos substratos testados são apresentados na tabela 19 e em anexo também resultado das análises químicas dos substratos realizados no laboratório de solos da ESAC, são apresentados no anexo (Anexo XVII).

Tabela 19 - Resultados da condutividade elétrica observados nos diferentes tratamentos testados (tipo de substrato).

Tratamentos	10/05/2024 (levantamento)	ESAC	04/06/2024 (após ensaio)
	mS/cm	mS/cm	mS/cm
S1.0	0,11	0,73	0,41
S1.1	0,11	0,75	0,55
S2.0	0,09	0,49	0,35
S2.1	0,11	0,50	0,34
S3.0	0,03	0,04	0,07
S3.1	0,02	1,04	0,06
S4	0,15	0,19	0,08
S5	0,00	1,51	0,98
S6	1,03	1,58	0,19
S7	0,88	1,29	0,46
S8	0,04	0,15	0,11
S9	0,06	0,54	0,29

Tratamentos	
S1.0	BioBizz
S1.1	" + Rhizotonic
S2.0	SiroFlorestal
S2.1	" + Rhizotonic
S3.0	Turfa:Perlite (50:50)
S3.1	" + Rhizotonic
S4	" + Adubo controlado
S5	" + " + Fósforo
S6	" + Fósforo + Calcário
S7	" + Adubo + Fósforo + Calário
S8	" + pastilha ectomicorrias
S9	S2 + pastilha ectomicorrias

Nota: Valores de referência Salinidades (1:1,5 v/v), Moderada: 1,51 -2,50; Elevada: 2,51-3; Muito elevada: >3,00. Fonte: https://www.inia.vpt/images/publicacoes/livros-manuais/Manual_Fertilizacao_das_culturas.pdf

Avaliados pelo laboratório de solos da ESAC a condutividade é elevada para as plantas em fase de aclimatização nos tratamentos S5, S6 e S7. Os três tratamentos correspondem ao substrato com mistura de Turfa:Perlite e adição de adubo de libertação controlada, fósforo e calcário em diferentes combinações. Estes valores estão relacionados com sais de sódio, mas também de magnésio, potássio e calcário. De acordo com anexo os mesmos tratamentos apresentam excesso de P₂O₅, CaO e MgO em comparação com os restantes. Assim se poderá compreender o insucesso de sobrevivência para os tratamentos S5, S6 e S7 abaixo de 15% em média com os valores de excesso de P₂O₅, CaO e MgO associados a elevada condutividade elétrica.

Com a análise química aos substratos observou-se que o clone 8001 é o que apresenta melhor tolerância a solos tanto ácidos como nos tratamentos S3.0 e S4 com valores de pH de 4,3 e 3,9 respetivamente, e em substratos menos ácidos como nos tratamentos S1.1 e S2.0 com valores de pH de 6,2 e 6,1 respetivamente. No entanto apresentou melhor sobrevivência em substratos menos ácidos o que está de acordo com a proveniência do clone de solos com calcário.

A adição de pastilha de ectomicorrizas ao tratamento S8, substrato de mistura de Turfa:Perlite mostrou aumentar o pH do substrato. O tratamento S4, com substrato de mistura de Turfa:Perlite com adição de adubo de libertação controlada, observou-se reduzida disponibilidade de nutrientes, como seria de esperar, oferecendo resultado positivo para a sobrevivência média. No entanto, em geral não apresenta diferenças significativas em comparação com o tratamento S3.0 que corresponde apenas ao substrato de mistura Turfa:Perlite. Os valores são muito semelhantes, também para as variáveis do comprimento dos rebentos ou da maior raiz e avaliação da parte radicular ou aérea.

8. Conclusões e perspectivas futuras

I-Ensaio de tratamento pré-germinativos

Os tratamentos pré-germinativos testados evidenciaram ser eficazes para a quebra da dormência e para uma uniforme germinação das sementes de medronheiro.

A condição de sementeira testada afeta a germinação. A condição 2, sementeira em alfobre, e a condição 3, sementeira direta, são as duas condições com melhores resultados de germinação, sendo a condição 2 mais exigente e mais onerosa devido à necessidade de “repicagem” anterior à transplantação das plântulas germinadas para contentores/tubetes/vasos definitivos em viveiro.

Na condição 1 o tratamento 9 obteve melhor taxa de germinação. Na condição 2 os tratamentos 1, 2, 6 e 9 e na condição 3 os tratamentos 7, 8, 9 e C obtiveram melhores taxas de germinação.

A família AL3 teve em média e no geral melhor taxa de germinação em relação à família AL6 e ao acesso que apresentou taxas de germinação significativamente inferiores de apenas 35%. Em relação à germinação por ano observou-se maior germinação média nos anos de 2020 e 2021.

Os tratamentos que apresentaram em todo o ensaio melhores taxas de germinação foram o tratamento 1 na condição 2 e na condição 3 os tratamentos 7, 8, 9 e C. O tratamento 1 corresponde a 1 semana de estratificação húmida a frio húmida. Os tratamentos 7 e 8 são a combinação de GA₃ nas concentrações de 1000 mg/L e 2000 mg/L e 30 dias de estratificação húmida a frio. O tratamento 9 foi adição de GA₃ na concentração de 2000 mg/l sem estratificação húmida a frio e por último o C, controlo (sem tratamento pré-germinativo). Sem aplicação de nenhum tratamento pré-germinativo é uma opção fácil (aplicação em viveiro) e económica de aplicar. O tratamento 9 é também outra opção operacionalmente vantajosa comparativamente com os tratamentos com combinação de aplicação de ácido giberélico e estratificação húmida a frio (tratamentos 7 e 8) onde é necessário utilizar um frigorífico a temperatura de 4°C.

A condição 1, caixas de germinação, não deverá ser aplicada sem uma tampa/cobertura superior para evitar perda de humidade.

Como perspectivas futuras será interessante avaliar o efeito do teor de humidade da semente, período de conservação a frio e sua interação com ano de colheita na germinação.

II- Ensaio de enraizamento *ex vitro* e aclimatização

Os substratos BioBizz e SiroFlorestal para a fase de enraizamento *ex vitro* e aclimatização são os que apresentaram melhores condições para a sobrevivência, desenvolvimento da parte aérea e radicular das plântulas.

Os melhores resultados para a sobrevivência, observados ao fim de um período inferior de aclimatização (2 meses e 5 dias) são os substratos BioBizz (S1.0) e SiroFlorestal (S2.0) sem aplicação de Rhizotonic, o tratamento S4, substrato Turfa:Perlite com adição de adubo de libertação controlada e o tratamento S9, substrato SiroFlorestal com adição de pastilha de ectomicorrizas. Nos parâmetros observados de comprimento dos rebentos (SL) e comprimento da maior raiz (LLR) os tratamentos S1.0, S2.0 e S9 apresentaram os melhores resultados num período curto de aclimatização. O substrato SiroFlorestal com pastilha de ectomicorrizas (tratamento S9) foi favorável ao estabelecimento de micorrizas.

A sobrevivência do clone 1001 foi superior ao clone 8001, no entanto o clone 8001 apresentou melhores resultados para os parâmetros de crescimento vegetal e radicular. O clone 1001 mostra bons resultados para a sobrevivência nos tratamentos S1.0, S2.0, mas também em S1.1 e S9. Para o clone 8001 apresentou bons resultados nos tratamentos referidos anteriormente para o clone 1001, no entanto com melhores resultados nos tratamentos S8 (Turfa:Perlite + ectomicorrizas) e S4 (Turfa:Perlite + adubo de libertação controlada). Assim, conclui-se que o clone 8001 mostra-se mais tolerante a solos tanto ácidos como menos ácidos.

A adição do Rhizotonic nos substratos não mostrou ser vantajosa na fase de enraizamento *ex vitro* e aclimatização.

Neste ensaio não foi possível perceber se adição de calcário para correção do pH na mistura de Tufa:Perlite, substrato S3, melhorou as condições químicas do substrato uma vez que a sua adição foi sempre juntamente com outros compostos.

É desaconselhado a repetição das quantidades de fósforo adicionado no ensaio.

Como perspectivas futuras, é possível ainda antecipar mais a aclimatização com abertura mais cedo dos garrafões (antes de 2 meses e 5 dias) com plântulas mais pequenas, com propósito de diminuir o stresse na transplantação para condições de viveiro. Melhorar as condições do substrato Turfa:Perlite, uma opção mais barata de substrato, com adição de calcário vs adição de nutrientes e ainda, a possibilidade de utilização de adubos líquidos. Testar a utilização do Rhizotonic na rega por nebulização e ainda, testar a adição de micélio *Pisolithus tinctorius* (fungo micorrízico), aos substratos SiroFlorestal e Turfa:Perlite, considerando o efeito mais rápido e positivo no estabelecimento de ectomicorrizas.

9. BIBLIOGRAFIA

AJAP (2017). *Manual Boas Práticas para Culturas Emergentes. A cultura do medronho*. Lisboa., ISBN: 978-989-8319-30-2.

AltriFlorestal (2024). *Laboratório de Micropropagação - Protocolo de sementeira de medronheiro*. p.2

Alves, A. M., Pereira, J. S. & Silva, J. M. N. (2007). *O melhoramento do eucalipto em Portugal. O eucaliptal em Portugal: impactes ambientais e investigação científica*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, 61-110. ISAPress

Azarkovich, M. I. (2020). *Dehydrins in orthodox and recalcitrant seeds*. Russian journal of plant physiology, v. 67. n. 2. p. 221-230

Barh, D., Srivastava, H. C., & Mazumdar, B. C. (2008). *Self fruit extract and vitamin-c improves tomato seed germination*. Journal of Applied Sciences Research, 4(2), 156-165.

Barros, J. F. C (2020). *Fertilização do solo e Nutrição das plantas*. Escola de Ciências e Tecnologia departamento de Fototecnia. Évora. Consultado em: <https://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/28120/1/P.%20Pedag%C3%B3gica%20-%20Fertiliza%C3%A7%C3%A3o%20das%20culturas.pdf>

Baskin, C. C. & Baskin, J. M. (2021). *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego: Academic Press. 666p.

Beltrame, H. S. (2013). *Micropropagação de clones híbridos de Castanea sativa x C. crenata e C. sativa x C. mollissima para estudos de resistência a Phytophthora cinamomi (Master's thesis)*. Relatório. Departamento de Ciências da Vida. Universidade de Coimbra

Bender, A. B., Schulz, J. S., Queiroz, V. S., Barz, I. L., da Silva, M. G., & Franco, D. F. (2015). *Determinação do grau de umidade de sementes*. V Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa clima Temperado. p.73

Bolar, J.P., Norelli, J., Aldwinckle, H.S. & Hanke, V. (1998). *An efficient method for rooting and acclimatization of micropropagated apple culture*. Hort. Sci. 37: 1241-1252

Camara, M. C., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., de Oliveira, J., Faulds, C., Bertrand, E., & Soccol, C. R. (2018). *Current advances in gibberellic acid (GA 3) production, patented technologies and potential applications*. Planta, 248, 1049-1062.

Canhoto, J.M. (2010). *Biotecnologia vegetal - da clonagem de plantas à transformação genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.

CANNA (s.d.). CANNA RHIZOTONIC. <https://www.canna.es/canna-rhizotonic>

Catalán, G. (1991). *Semillas de árboles y arbustos forestales*. (4.^a edição). Madrid: ICONA, D.L. 392 p.

Castro, F., Gomes, B., Murena, C., Figueiredo, M., Reis, D., Vidal, M., Ferreira, I., Nunes, J., Machado, H., & Gomes, F. (2020). *Effect of substrate on mycorrhizal synthesis between Tuber*

borchii and micropropagated plants of *Arbutus unedo* L. 4 o Encontro Em Biologia Funcional e Biotecnologia de Plantas, 91–100.

CENASEF. (2014). *Regras básicas para o manuseamento de sementes florestais. Guia técnico. Divisão de Apoio à Produção Florestal e Valorização de Recursos Silvestres – CENASEF.* Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, ICNF. <https://www.icnf.pt/api/file/doc/62198431a361dd24>

CENASEF (2017). *Processamento e conservação de sementes florestais. Guia técnico. Divisão de Apoio à Produção Florestal e Valorização de Recursos Silvestres.* Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, IP

CENASEF. (2022). *Sementes de árvores e arbustos florestais. Catálogo de sementes 2022.* Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, IP

CENASEF. (2024). *Sementes de árvores e Arbustos Florestais- Catálogo de Sementes 2024/2025.* Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, IP

Chaves, L. H. G., & de Azevedo Farias, C. H. (2008). *Escória de siderurgia e calcário na correção da acidez do solo e na disponibilidade de cálcio, magnésio e fósforo.* Revista Caatinga. vol. 21, pp. 75-82. Universidade Federal Rural do Semi-Árido Mossoró. Brasil. Rede de Revistas Científicas da América Latina. Caribe. Espanha e Portugal

Coelho, D. V. (2010). *Estudo comparativo da utilização de vários substratos de turfa, em viveiros de horticultura, na época de produção primavera-verão.* (Master's thesis, Universidade de Évora).

Considine, M. J., & Considine, J. A. (2016). *On the language and physiology of dormancy and quiescence in plants.* Darwin Review. Journal of Experimental Botany. Vol. 67, No. 11 pp. 3189–3203, 2016

Correia, A. V., Oliveira, Â. C., Teixeira, C., Salinas, F., Louro, V. & Costa, Z. (2002). *Principais Espécies Florestais com interesse para Portugal: Zonas de Influência Mediterrânica.* Direcção-Geral das Florestas (DGF) 2ª Edição. Lisboa.

Curado, F., Gama, C., & Gomes, F. (2015). *A instalação da cultura do medronheiro.* In "II Jornadas do Medronho", Actas Portuguesas de Horticultura nº 24. Gomes, F.; Sousa, R.M.; Guilherme, R. (eds). APH, ISBN: 978-972-8936-17-4. Coimbra: 84-92

Daykin, A.; Scott, I. M.; Francis, D.; & Causton, D. R. (1997). *Effects of gibberellin on the cellular dynamics of dwarf pea internode development.* Planta, [S.l.]. v. 203. p. 526- 535

De Fossard, R.A.; Nitsch, C.; Cresswell, R.J., & Lee, H.C.M. 1074. Tissue and organ culture of Eucalyptus. New Zeal. J. For. Sci. 4:267-278.

Marques, F. A. De A. (2014). *Contribuição para o conhecimento da capacidade e vigor germinativos de sementes de Acacia dealbata Link. e Acacia longifolia (Andr.) Wild.* Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais. Universidade de Lisboa (Portugal).

Demirsoy, L., Demirsoy, H., Celikel, G., Macit, I. e Ersoy, B. (2010). *Seed treatment with GA3 or stratification enhances emergence of some strawberry tree genotypes – short communication*. Horticultural Science. 37 (1): 34-37

Dorman, K. W. (1976). *The genetics and breeding of southern pines* (No. 471). US Department of Agriculture, Forest Service.

DSVPF (2003) - *Princípios de Boas Práticas Florestais*. Direcção-Geral das Florestas. Lisboa. ISBN: 972-8097-51-4.

Ertekin, M. & Kirdar, E. (2010). *Breaking seed dormancy of strawberry tree (Arbutus unedo)*. International Journal of Agriculture & Biology. 12 (1): 57-60.

Estrela, P; Quintela, A; Vaz, J; Chá, LC; Pereira, A; Pato, RL; Rosa, I., & Gomes, F. (2023). *Efeito do hidrogel (orgânico vs químico), micorrizas e adição de fósforo na resiliência ao stresse hídrico à plantação de medronheiro*. Congresso Nacional dos Recursos Silvestres 2023, 18 de outubro de 2023, Escola Superior Agrária de Bragança. Livro de Resumos p. Abst 21. ISBN: 978-972-745-330-6 <https://esa.ipb.pt/cnrs2023/>

Figueiredo, P., Gomes, F., Santos, R., & Pop, R. L. (2013). *Rapid propagation of Arbutus unedo L. adult selected plants using ex vitro rooting*. In Program and Abstract Book, Proceedings of the 8th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Coimbra, Portugal (pp. 2-7).

Figueiredo, M. J. (2020). *Efeito do substrato e flavonoides na micorrização de plantas micropropagadas de medronheiro (Arbutus unedo L)*. Relatório de Estágio de Fim de Curso de LBIO / ESAC

Figueiredo, M. J, (2020). *Efeito do substrato e flavonoides na micorrização de plantas micropropagadas de medronheiro (Arbutus unedo L)*. Relatório de estágio de fim de curso de LBIO, ESAC (Nº 2016058263)

Francisco, A. (2021). *O melhoramento do medronheiro, casos de estudo: avaliação do efeito do uso de polímero à plantação e efeito do substrato no crescimento das plantas*. Relatório de Estágio Profissionalizante Licenciatura em Ciências Florestais e Recursos Florestais. Relatório de Estágio Profissionalizante.

Freire, E. (2017). Medronho. *Uma cultura com potencial*. Vida Rural, Revista Profissional de Agronegócios, pp. 24-30. http://www1.esac.pt/medronho/Comunicacoes/Equipa%20ESAC/artigos/2017/VR_fev17%20-%20Medronho.pdf

Glória, B. A., & Guerreiro, C. (1992). *Anatomia vegetal*. Universidade de São Paulo. ESALQ.

Gomes, F. (2020). *Fisiologia e Reprodução de Plantas Florestais*– ESAC. Coimbra.

Gomes, F. (2021). *Da semente à floresta*. In Plataforma florestas.pt, 08 de setembro de 2021. Link: <https://florestas.pt/academia/da-semente-a-floresta-por-filomena-gomes/>

Gomes, F. & Canhoto J.M. (2009) *Micropropagation of strawberry tree (Arbutus unedo L.) from adult plants*. In *Vitro Cellular & Development Biology Plant* 45, 72-82.

Gomes, F., Suárez, D., Santos, R., Silva, M., Gaspar, D., & Machado, H. (2016). *Mycorrhizal synthesis between Lactarius deliciosus and Arbutus unedo L.* *Mycorrhiza*, 26, 177-188.

Gomes, F., Casau, F., Melo, F., Botelho, G., Rodrigues, I., Franco, J., Henriques, M., Bingre, P., Guilherme, R., Pato, R., Gama, J., Machado, H., Capelo, J., Barrento, M.J & Sousa, R. (2018). *Medronheiro - Manual de boas práticas para a cultura*. 2ª Edição. REN – Redes Energéticas Nacionais. IPC - Instituto Politécnico de Coimbra, ESAC - Escola Superior Agrária de Coimbra, CERNAS - Centro de Estudos e Recursos Naturais Ambiente e Sociedade. CPM – Cooperativa Portuguesa de Medronho crl.. Coimbra, 110 p., ISBN 978-972-99205-6-1.

Gomes, F., Casau, F., Melo, F., Botelho, G., Rodrigues, I., Franco, J., Henriques, M., Bingre, P., Guilherme, R., Pato, R., Gama, J., Machado, H., Capelo, J., Barrento, M.J & Sousa, R. (2019). *Medronheiro – Manual de boas práticas para a cultura*. Edição Digital. REN – Redes Energéticas Nacionais. IPC - Instituto Politécnico de Coimbra, ESAC - Escola Superior Agrária de Coimbra, CERNAS - Centro de Estudos e Recursos Naturais Ambiente e Sociedade. CPM –Cooperativa Portuguesa de Medronho crl.. Coimbra, 110 p., ISBN 978-989-54532-0-7.

Gomes, F. (2020). *Fisiologia e Reprodução de Plantas Florestais. Conservação*. ESAC. Coimbra.

Gomes, B.; Castro, F.; Santos, R.; Figueiredo, P.; Silva, M.; Vidal, M.; Ferreira, I.; Nunes, J.; Machado, H. & Gomes, F. (2021). *Effect of Quercetin on Mycorrhizal Synthesis between Tuber borchii and Arbutus unedo L. In Vitro Plants*. *Microbiol. Res.* 2021, 12, 69–81. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12010007>

Gonçalves, J. C. (1991). *Influência de alguns fatores na micropropagação de castanheiro*. Dissertação de mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 80pp.

Gonçalves, J. C., Diogo G. & Amâncio S. (1998). “*In Vitro Propagation of Chestnut (Castanea Sativa x C. Crenata): Effects of Rooting Treatments on Plant Survival, Peroxidase Activity and Anatomical Changes during Adventitious Root Formation.*” *Scientia Horticulturae* 72: 265–75.

Graça Martins, M. E., Loura, L & Mendes, F. (2007). *Análise de dados*, Texto de apoio para os professores do 1º ciclo. Ministério da Educação. DGIDC. ISBN: 978-972-742-261-6. Depósito legal 262674/07.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies F. T. & Geneve R. L. (2011) *Hartmann & Kester’s plant propagation: Principles and Practices*. 8th ed. Pearson Education, Ltd., Pearson Prentice Hall, USA.

Hilhorst HWM. (1995). *A critical update on seed dormancy. I. Primarydormancy*. *Seed Science Research* 5: 61–73.

Huat, B. B., Kazemian, S., Prasad, A., & Barghchi, M. (2011). *State of an art review of peat: General perspective*. *International Journal of the Physical Sciences*, 6(8), pp.1988-1996.

Huber, D., Römheld, V., & Weinmann, M. (2012). *Relationship between nutrition, plant diseases and pests*. In Marschner's mineral nutrition of higher plants (pp. 283-298). Academic Press.

IUSS Working Group WRB. (2006). *World reference base for soil resources 2006*. 2nd edition. World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Rome.

Jiménez López, C., Caleja, C., Corrêa, R. C., Dias, M. I., Prieto Lage, M. A., Barreiro, M. F., Barros, L & Ferreira, I. C. F. R. (2018). *Aplicação em waffles de um corante natural obtido de frutos de Arbutus unedo L.* 14º Encontro de Química dos Alimentos.

Karam, N.S. & Al-Salem M.M. (2001). *Breaking dormancy in Arbutus andrachne L. seeds by stratification and gibberellic acid*. Seed Science and Technology. 29: 51-56.

Lopes, A. C. A., & Nascimento, W. M. (2012). *Dormência em sementes de hortaliças*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Hortaliças. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento

Machado, H., Martins, A., Silva, C. S., & Bastidas, M. J. (2011). *Manual para a gestão dos recursos micológicos silvestres do baixo alentejo*. 71.

Martins, M. C. B. (2010). *Estudo morfo-anatômico de três espécies de plantas tintureiras*. Tese de Mestrado em Biologia e Geologia para o Ensino. (Master's thesis, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. Portugal.

Martins, J.F.S. (2012). *Estudos de cultura in vitro em medronheiro (Arbutus unedo L.) testados ao seu melhoramento*. Dissertação para obtenção do Grau Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências - Universidade de Coimbra, Coimbra.

Martins, D. C. (2015). *Análise do efeito de vários tipos de compostos na micropropagação de medronheiro (Arbutus unedo L.)*. Dissertação para Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Coimbra.

Martins, J. F., Correia, S., Correia, B., Pinto, G., & Canhoto, J. M. (2019). *Shoot proliferation and organogenesis on Arbutus unedo: Physiological analysis under water stress*. Biol. Plant, 63, 278-286.

McClelland, M. T., Smith, M. A. L., & Carothers, Z. B. (1990). *The effects of in vitro and ex vitro root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 23, 115-123.

Mesléard, F., & Lepart, J. (1989). *Continuous basal sprouting from a lignotuber: Arbutus unedo L. and Erica arborea L., as woody Mediterranean examples*. Oecologia, 80(1), 127-131.

Miler, J. N. & Miller J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6th ed.*; Pearson Education Limited: Edinburgh, Scotland. pp. 224 – 228 ISBN: 978-0-273-73042-2

Moreira, F. (2022). *O melhoramento do medronheiro, casos de estudo: avaliação do efeito do uso de polímero à plantação e efeito do substrato no crescimento das plantas em viveiro*. Relatório de Estágio de Fim de Curso de LCFRN / ESAC.

Mori, E. S., Kikuti, P., Sousa, V. D., Castilho, C. R., & Ferreira, M. (1988). *Pomares de sementes florestais*. Série Técnica ISSN – 0100-8137. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, IPEF. Departamento de Ciências Florestais.

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

Narbona, E., Arista, M. & Ortiz, P.L. (2003). *Germinación de las semillas del madroño (Arbutus unedo L., Ericaceae)*. *Acta Botanica Malacitana.* 28: 73-78.

Navarro Cerrillo., & Gálvez C., (2001). *Manual para la identificación y reproducción de semillas de especies vegetales autóctonas de Andalucía*. Tomo I. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Córdoba. pp. 81-83.

Navarro Cerrillo, R.M., Plaza Arregui, L., Sánchez Lancha, A., Arroyo Saucos, M., Marchal Gallardo, F. & Lara Gómez, M.A. (2013). *Arbutus unedo L. Em: Pemán, J., Producción y manejo de semillas y plantas forestales*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. ISBN 978-84-8014-837-5. 1018 p.

Nétien, G., & Gautheret, R. J. (1960). *La Culture des Tissus végétaux*. Publications de La Société Linnéenne de Lyon, 24.

Neto, J. F., Krzyzanowski, F. C., & da Costa, N. P. (1998). *O teste de tetrazólio em sementes de soja*. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 72p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 116).

O'Farrell P.H. (2011). *Quiescence: early evolutionary origins and universality do not imply uniformity*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366, 3498–3507.

Palmer, G. H. (1974). *The industrial use of gibberellic acid and its scientific basis—a review*. *Journal of the Institute of Brewing*, 80(1), 13-30.

Passarinho, J.A., Sousa, R.M., & Coelho, I.S. (2017). *A produção de medronho para fruto não destilado*. Em Coelho et al. *Medronheiro: Caderno Técnico*. Oeiras: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. 76 p.

Pereira, M. G., Anjos, L., Junior, C. R. P., Pinto, L. A. S. R., Neto, E. C. S. & Fontana, A. (2019). *Formação, Classificação e Cartografia dos Solos* (pp. 7-9). Atena Editora. Ponta Grossa – Paraná – Brasil.

Pereira, A. L. J. C. (2022). *Avaliação de substratos, polímero e tratamentos em viveiro no crescimento de plantas de medronheiro e eucalipto*. Relatório de Estágio de Fim de Curso de LCFRN / ESAC.

Picolotto, L., Bianchi, V. J., & Fachinello, J. C. (2007). *Ação de giberelinas e citocininas na germinação de sementes de pessegueiro*. *Scientia Agraria*, 8(3), 225-232.

Pipinis, E., Stampoulidis, A., Millios, E., Kitikidou, K. & Radoglou, K. (2017). *Effects of cold stratification and GA3 on germination of Arbutus unedo seeds of three provenances*. *African*

Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines. 14(1): 318-323. Polunin, O. e Huxley, A. (1967). *Flowers of the Mediterranean*. London: Chatto e Windus. 272 p.

Piotto B. & Di Noi A. (2001). *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. Roma: ANPA. ISBN 88-448-0271-6. 212 p.

Piotto, B.; Bartolini, G.; Bussotti, F.; Garcia, A.; Chessa, I.; Ciccarese, C.; Ciccarese, L.; Crosti, R.; Cullum, F.; Noi, A.; Garcia-Fayos, P.; Lombardi, M.; Lisci, M.; Lucci, S.; Melini, S.; Reinoso, J.; Murrancia, S.; Nieddu, G.; Pacini, E.; Pagni, G.; Patumi, M.; Garcia, F.; Picini, C.; Rossetto, M. e Trane, G., (2001). *Schede informative sulla propagazione per seme degli alberi e degli arbusti più diffusi della flora mediterranea*. In *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali, Manuale ANPA (Agenz. Naz. per la Protezi. dell' Ambiente), Piotto, B. e Noi. A. (eds.), 109-169.

Pokorny, A. (2006). *Obtenção e caracterização de espumas vítreas a partir de resíduos de vidro sodo-cálcico e calcário dolomítico como agente espumante*. (Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Minas, Metalúrgica e de Materiais. Escola de Engenharia.) p.36 <http://hdl.handle.net/10183/8020>

Pospíšilová, J., I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel, & Š. Plzánková. (1999). *Acclimatization of Micropropagated Plants to Ex Vitro Conditions*. *Biologia Plantarum* 42 (4): 481–97.

Raviv, M., Chen Y. & Inbar, Y. (1986). *Peat and peat substitutes as growth media for container-grown plants*, pp. 257-287. In: *The role of organic matter in modern agriculture*. Y. Chen e Y. Avnimelech (eds.). Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Holanda

Ribeiro, D., Ribeiro, H., & Louro, V. (2001). *Produção em viveiros florestais*. DGDRural/DDTI, Lisboa.

Richard, T., Millot, S., Gardes, M., & Selosse, M-A. (2005). *Diversity na specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from na old-growth Mediterranean forest dominated by Quercus ilez*. *New Phytologist* 166: 1011-1023

Ricardo, C. P. & Veloso, M. M. (1987). *Features of seed germination in Arbutus unedo L. In Plant response to stresse, functional analysis in Mediterranean Ecosystems*, Tenhunen et al. (eds.), Springer- Verlag. Berlin.

Schmilewski, G. (2008). *The role of peat in assuring the quality of growing media*. *Mires & Peat*, 3. Article 02. International Mire Conservation Group and International Peat Society Klasmann-Deilmann GmbH. Germany

Schopmeyer, C. S. (1974). *Seeds of woody plants in the United States*. Technical Coordinator Division of Timber Management Research

Shah, S. H., Islam, S., Mohammad, F., & Siddiqui, M. H. (2023). *Gibberellic acid: a versatile regulator of plant growth, development and stresse responses*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(12), 7352-7373.

Smiris, P., Pipinis, E., Aslanidou, M., Mavrokordopoulou, O., Milios, E. & Kouridakis, A. (2006). *Germination study on Arbutus unedo L. (Ericaceae) and Podocytisus caramanicus Boiss. & Heldr. (Fabaceae)*. Journal of Biological Research. 5: 85-91.

Singh, V., & Sood, A. K. (2017). *Plant Nutrition: A tool for the management of hemipteran insect-pests-A review*. Agricultural Reviews, 38(4), 260-270.

Soares, J. S., Rosa, Y. B. C. J., Tatará, M. B., Sorgato, J. C., & Lemes, C. S. R. (2014). *Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio*. Semina: Ciências Agrárias vol. 35, núm. 5, pp. 2275-2284. Universidade Estadual de Londrina. Brasil

Sutter, E. (1984). *Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plants grown in vitro*. Canadian Journal of Botany. 62: 74-77.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2007). *Fisiologia vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume. 4^a. Artmed, Porto Alegre

Tapum, J. A. M. (1980). *Breves notas sobre a cultura do medronheiro na serra algarvia. Passado, presente e futuro*. Lagos: Instituto Geográfico e Cadastral, Direcção dos Serviços de Cadastro, Divisão dos Serviços de Avaliação e Conservação Cadastral. 41 f.

Tilki, F. (2004). *Improvement in seed germination of Arbutus unedo L.* Pakistan Journal of Biological Sciences. 7: 1640-1642.

Trigiano, Robert N., & Gray, Dennis J. (2004). *Plant development and biotechnology*. CRC press.

Vaz, J. A. M. (2023). *Efeito do uso de polímero e micorrizas na tolerância ao stresse hídrico à plantação de eucalipto (simulação em viveiro)*. Relatório de Estágio para obtenção de Grau de Mestre em Mestrado em Recursos Florestais.

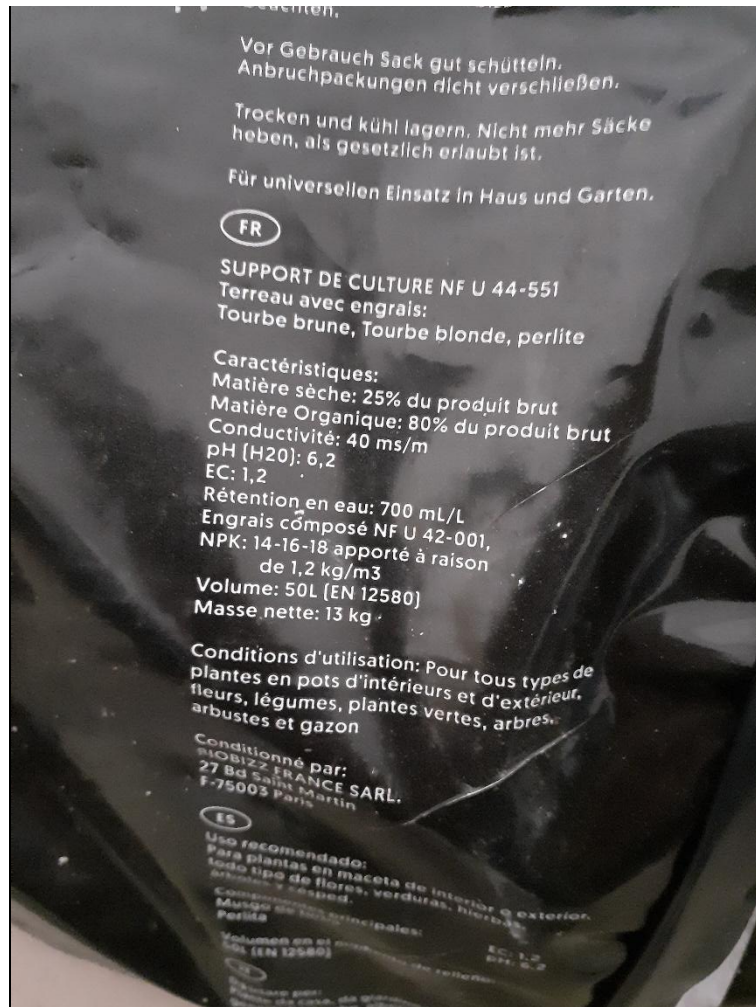
Veloso, P., Sempiterno, C., Calouro, F., Rebelo, F., Pedra, F., Castro, I. V., Gonçalves, M. C., Marcelo, M. E., Pereira, P., Fareleira, P., Jordão, P., Mano, R., & Fernandes, R. (2022). *Manual de fertilização das culturas. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. – INIAV. 3^a Edição. 978-972-579-063-2*

Vieira, J.; Quintela, A.; Chá, L.C.; Pereira, A.L.; Rosa, I.; Pato, R.L.; Gomes, F. (2023). *Effect of the hydrogel (Copolymere fertilisant) and mycorrhizae on resilience to hydric stresse in eucalyptus plantation*. Iufro Forest Environment Div. 8. Conference 2023, 24-27 outubro, Universidade de Évora Abst. p. 179. <https://iufro2023.uevora.pt/book-of-abstracts/>

Vilhena, J. M. J. (2019). *Contributo para o estabelecimento de reserva ex situ de medronheiro (Arbutus unedo L.). Condições de germinação, instalação e crescimento em viveiro de plantas de diferentes proveniências*. Tese de Mestrado. Lisboa: ISA.

ANEXOS

Anexo I- Rótulo do substrato comercial BioBizz.



Anexo II- Tabela de valores de germinação (%) por condição e tratamento, referente à figura 31.

Condições	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	T 9	C	Média
Caixas/1	33,33	13,33	6,67	6,67	40,00	33,33	66,67	26,67	93,33	6,67	32,67
Alfobre/2	93,33	86,67	73,33	66,67	80,00	86,67	73,33	80,00	86,67	66,67	79,33
Sementeira direta/ 3	86,67	86,67	86,67	66,67	73,33	86,67	100,00	93,33	93,33	93,33	86,67

Anexo III- Tabela de valores de germinação (%) por família/acesso, condição e tratamento, referente à figura 32.

Família/Acesso	Condição	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	T 9	C
AL3	1	33,33	13,33	6,67	6,67	40,00	33,33	66,67	26,67	80,00	6,67
	2	93,33	86,67	73,33	66,67	80,00	86,67	73,33	80,00	86,67	66,67
	3	86,67	86,67	86,67	66,67	66,67	86,67	100,00	93,33	93,33	93,33
AL6	1	26,67	0,00	0,00	0,00	20,00	13,33	26,67	0,00	93,33	6,67
	2	60,00	60,00	60,00	46,67	53,33	73,33	73,33	66,67	66,67	66,67
	3	73,33	60,00	40,00	40,00	73,33	66,67	40,00	66,67	60,00	86,67
PEN22/17	1	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	6,67	20,00	0,00	13,33	6,67	20,00	13,33	13,33	33,33	20,00
	3	20,00	13,33	13,33	13,33	13,33	40,00	40,00	40,00	60,00	86,67

Anexo IV- Tabela de valores de germinação (%) por família/acesso e condição.

	Condição	Germinação (%)
AL3	1	31,33
	2	79,33
	3	86
AL6	1	18,67
	2	62,67
	3	60,67
PEN22/17	1	0,67
	2	14,67
	3	34

Anexo V- Tabela de valores de germinação (%) por anos, condição e tratamento, referente à figura 33.

Ano	Condição	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	T 9	C
2018	1	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	6,67	20,00	0,00	13,33	6,67	20,00	13,33	13,33	33,33	20,00
	3	20,00	13,33	13,33	13,33	13,33	40,00	40,00	40,00	60,00	86,67
2019	1	0,00	0,00	6,67	6,67	20,00	20,00	0,00	26,67	26,67	0,00
	2	6,67	13,33	26,67	13,33	13,33	73,33	20,00	33,33	20,00	26,67
	3	26,67	13,33	20,00	26,67	20,00	26,67	13,33	33,33	20,00	26,67
2020	1	13,33	13,33	0,00	0,00	40,00	33,33	66,67	0,00	80,00	0,00
	2	93,33	86,67	73,33	66,67	80,00	86,67	73,33	80,00	86,67	66,67
	3	86,67	86,67	86,67	66,67	66,67	86,67	100,00	93,33	93,33	93,33
2021	1	33,33	6,67	0,00	0,00	20,00	13,33	26,67	0,00	93,33	6,67
	2	60,00	60,00	60,00	46,67	53,33	73,33	73,33	80,00	73,33	66,67
	3	73,33	60,00	66,67	33,33	73,33	66,67	60,00	66,67	73,33	86,67
2022	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	6,67	0,00
	2	20,00	26,67	13,33	26,67	33,33	13,33	33,33	40,00	20,00	26,67
	3	33,33	33,33	40,00	26,67	20,00	60,00	40,00	33,33	60,00	40,00
2023	1	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	13,33	0,00	6,67	0,00
	2	33,33	33,33	13,33	13,33	26,67	26,67	33,33	33,33	40,00	33,33
	3	33,33	33,33	13,33	20,00	20,00	46,67	26,67	53,33	46,67	33,33

Anexo VI- Taxa de germinação por acesso/família. E taxa de germinação (%) por acesso/família, anos de colheita e tratamentos pré-germinativos (1 a 9 e c) e respetivo período de germinação por condição.

A figura abaixo mostra resumidamente a taxa de germinação por condição e família/acesso.

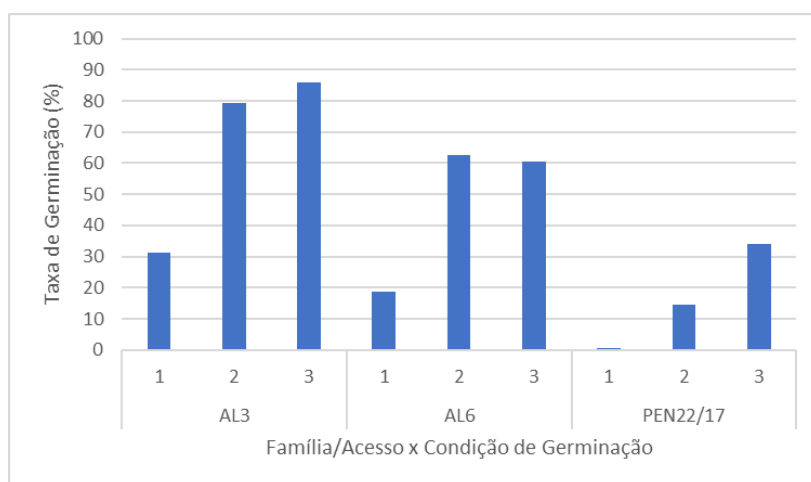


Figura 41 - Taxa de germinação por família/acesso e condição.

É notório a taxa de germinação nas três condições que a família AL3 obteve resultados superiores à família AL6 e acesso PEN. Na família AL3 e acesso observa-se uma maior taxa de germinação na condição 3, sementeira direta, que nas restantes condições. Para a família AL6 na condição 2, alfobre, é ligeiramente superior à condição 3.

A taxa de germinação (%) por acesso/família, anos de colheita e tratamentos pré-germinativos (1 a 9 e c) e respetivo período de germinação por condição é apresentado em pormenor por condição.

A) Condição 1

Na condição 1, nomeada também de caixa, a taxa de germinação por tratamento, condição, família/acesso e ano é apresentada na tabela 9. É ainda referido na mesma tabela o período em que ocorreu a germinação e mês onde foram observados os valores máximos de germinação por família/acesso e ano.

Tabela 20 - Taxa de germinação (%) na condição 1 por acesso/família, ano (negrito) e tratamentos (escala colorida).

Condição	Acesso / Família	Ano	Germ % / Trat / Condição / Família/Acesso / Ano										Período Germinação		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	C	período	max	
1	PEN22/17	2018	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	abril	abril
1	AL3	2019	0,00	0,00	6,67	6,67	20,00	20,00	0,00	26,67	26,67	0,00	fev-abril	mar	
1	AL6	2019	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	—	—	
1	AL3	2020	13,33	13,33	0,00	0,00	40,00	33,33	66,67	0,00	80,00	0,00	fev-abril	mar	
1	AL6	2020	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,33	0,00	mar	mar	
1	AL3	2021	33,33	6,67	0,00	0,00	13,33	0,00	20,00	0,00	80,00	6,67	fev-abril	mar	
1	AL6	2021	26,67	0,00	0,00	0,00	20,00	13,33	26,67	0,00	93,33	6,67	fev-abril	mar	
1	AL3	2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	—	—	
1	AL6	2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	6,67	0,00	mar	mar	
1	AL3	2023	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	6,67	0,00	mar	mar	
1	AL6	2023	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	13,33	0,00	6,67	0,00	mar	mar	

Nota: Ensaio instalado entre 30 de janeiro de 2024 a 2 de fevereiro de 2024; Em linha é apresentado por acesso/família e ano por condição e em coluna os tratamentos aplicados de (1 a 9 e C) a taxa de germinação (%). Tratamento C: Controlo, sem pré-tratamento germinativo; Tratamento 1: 1 semana de estratificação; Tratamento 2: 15 dias de estratificação; Tratamento 3: 30 dias de estratificação; Tratamento 4: 45 dias de estratificação; Tratamento 5: 60 dias de estratificação; Tratamento 6: 30 dias de estratificação + GA₃ (500 mg/L); Tratamento 7: 30 dias de estratificação + GA₃ (1000

Legenda: 1) **negrito**, Percentagem de germinação máxima por famílias/acesso e ano; 2) Percentagem de germinação máxima por tratamento (escala abaixo)



Na condição 1 como referido anteriormente apenas no tratamento 9 obteve-se valores de taxa de germinação superior a 85% e acontece na família AL6 de 2021. Nesta condição houve alguma dificuldade de manter a humidade nas sementes. Sempre que as sementes germinavam estas foram retiradas após contagem. Nas figuras 42 e 43 mostra sementes a germinar na condição 1 da família AL3 de 2019 e da mesma família do ano 2021 do tratamento 6.

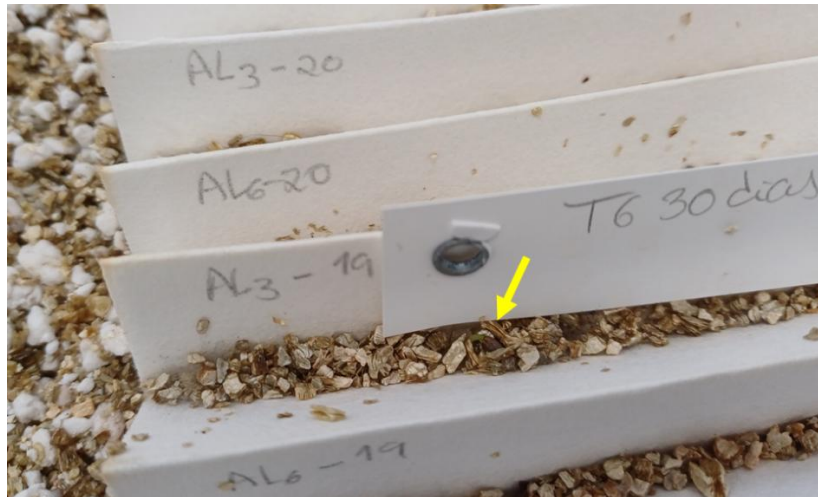


Figura 42 - Observação da germinação no tratamento 6 na condição 1 (caixa de germinação) ao fim de cerca de 5 semanas (11 de março de 2024).



Figura 43 - Observação da germinação na condição 1 (caixa de germinação) ao fim de cerca de 6 semanas (11 de março de 2024)

Na família AL3 apesar de não ter obtido taxa de germinação superior a 85% é de destacar no ano de 2020 nos tratamentos 9 e 7 valores de taxa de germinação de 80% e cerca de 67% respetivamente. O tratamento 7 foi a combinação de 30 dias de estratificação a frio e adição de GA3 na concentração de 1000 mg/L 24 horas antes da sementeira. Para a mesma família, mas no ano de 2021 também no tratamento 9 obteve-se o valor de 80% de taxa de germinação.

O ácido giberélico foi em geral favorável à germinação nesta condição apesar de ter ocorrido inferior germinação em comparação com as outras duas condições.

Não foi observado uma homogeneidade na resposta em função à família ou ano, ou seja, haver uma germinação uniforme relacionado a uma família ou um ano em específico. Conclui-

se que o tratamento com os melhores resultados e influência na germinação foi o tratamento 9 (condição 1).

A germinação na condição 1, ocorreu entre os meses de fevereiro e abril tendo sido observado em geral maior germinação no mês de março (instalação ocorreu nos dias 30 de janeiro de 2024 e 31 de janeiro de 2024).

B) Condição 2

Na condição 2, nomeada também de alfobre, a taxa de germinação por tratamento, condição, família/acesso e ano é apresentada na tabela 10. É ainda referido na mesma tabela o período em que ocorreu a germinação e mês onde foram observados os valores máximos de germinação por família/acesso e ano.

Tabela 21 - Taxa de germinação (%) na condição 2 por acesso/família, ano (negrito) e tratamentos (escala colorida).

Condição	Acesso / Família	Ano	Germ % / Tratamento / Condição / FamíliaAcesso / Ano										Período Germinação	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	C	período	max
2	PEN22/17	2018	6,67	20,00	0,00	13,33	6,67	20,00	13,33	13,33	33,33	20,00	març-abril	març-abril
2	AL3	2019	6,67	13,33	26,67	13,33	13,33	73,33	20,00	33,33	20,00	26,67	fev- abril	abril
2	AL6	2019	6,67	13,33	6,67	0,00	13,33	73,33	6,67	26,67	20,00	20,00	fev- abril	abril
2	AL3	2020	93,33	86,67	73,33	66,67	80,00	86,67	73,33	80,00	86,67	66,67	fev- maio	març-abril
2	AL6	2020	13,33	20,00	0,00	6,67	33,33	13,33	13,33	60,00	26,67	13,33	fev- abril	abril
2	AL3	2021	46,67	60,00	40,00	46,67	40,00	73,33	66,67	80,00	73,33	53,33	fev- abril	março
2	AL6	2021	60,00	60,00	60,00	46,67	53,33	33,33	73,33	66,67	66,67	66,67	fev- maio	março
2	AL3	2022	0,00	6,67	13,33	6,67	33,33	6,67	6,67	6,67	6,67	13,33	març-abril	abril
2	AL6	2022	20,00	26,67	6,67	26,67	33,33	13,33	33,33	40,00	20,00	26,67	fev- abril	març-abril
2	AL3	2023	6,67	20,00	6,67	6,67	20,00	6,67	20,00	13,33	13,33	26,67	fev- abril	març-abril
2	AL6	2023	33,33	33,33	13,33	13,33	26,67	26,67	33,33	33,33	40,00	33,33	fev- abril	març-abril

Nota: Ensaio instalado entre 30 de janeiro de 2024 a 2 de fevereiro de 2024; Em linha é apresentado por acesso/família e ano por condição e em coluna os tratamentos aplicados de (1 a 9 e C) a taxa de germinação (%). Tratamento C: Controlo, sem pré-tratamento germinativo; Tratamento 1: 1 semana de estratificação; Tratamento 2: 15 dias de estratificação; Tratamento 3: 30 dias de estratificação; Tratamento 4: 45 dias de estratificação; Tratamento 5: 60 dias de estratificação; Tratamento 6: 30 dias de estratificação + GA₃ (500 mg/L); Tratamento 7: 30 dias de estratificação + GA₃ (1000

Legenda: 1) **negrito**, Percentagem de germinação máxima por famílias/acesso e ano; 2) Percentagem de germinação máxima por tratamento (escala abaixo)



Na condição 2 como referido anteriormente os tratamentos com germinação superior a 85% correspondem aos tratamentos 1, 2, 6 e 9 e foram observados na família AL3 no ano de 2020 para todos os tratamentos. A figura 44 mostra sementes a germinar na condição 2 na família AL3 de 2020 do tratamento 9.



Figura 44 - Observação da germinação na condição 2 (sementeira em alfobre) ao fim de cerca de 4 semanas (29 de fevereiro de 2024).

É de destacar uma taxa de germinação, superior a 90% que ocorreu no tratamento 1. Neste tratamento foi testado como tratamento pré-germinativo uma semana de estratificação a frio, no entanto, só mostra resultados interessantes para a família AL3 de 2020. O mesmo resultado foi observado para o tratamento 2 com o tratamento pré-germinativo de 15 dias de estratificação húmida a frio.

Na família AL3 no ano de 2020 ainda é observado para os tratamentos 5 e 8 taxas interessantes de 80% de germinação apesar de inferiores ao valor 85%. O tratamento 5 o tratamento pré-germinativo foi 60 dias de estratificação a frio, cerca de 2 meses e o tratamento 8 foi 30 dias de estratificação a frio e adição de GA₃ na concentração de 2000mg/L. Na mesma família, no entanto, no ano 2021 também no tratamento 8 obteve-se uma taxa de germinação de 80%.

Nas restantes famílias/acesso e ano a adição de ácido giberélico no geral foi também favorável à germinação.

Os melhores resultados em geral são observados na concentração maior de GA₃ sem estratificação, tratamento 9 e no tratamento 6 onde foi adicionado GA₃ na concentração 500 mg/L e 30 dias de estratificação.

A germinação na condição 2, ocorreu entre os meses de fevereiro e abril tendo sido observado maior germinação nos meses de março e abril (instalação ocorreu nos dias 31 de janeiro de 2024 e 1 de fevereiro de 2024).

C) Condição 3

Na condição 3, nomeada também de sementeira direta (em alvéolo), a taxa de germinação por tratamento, condição, família/acesso e ano é apresentada na tabela 11. É ainda referido na mesma tabela o período em que ocorreu a germinação e mês onde observou-se os valores máximos de germinação por família/acesso e ano.

Tabela 22 - Taxa de germinação (%) na condição 3 por acesso/família, ano (negrito) e tratamentos (escala colorida).

Condição	Acesso / Família	Ano	Germ % / Trat / Condição / Família Acesso / Ano										Período Germinação	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	C	período	max
3	PEN22/17	2018	20,00	13,33	13,33	13,33	13,33	26,67	40,00	40,00	60,00	86,67	març-abril	març-abril
3	AL3	2019	20,00	13,33	20,00	26,67	20,00	26,67	13,33	33,33	13,33	26,67	fev-abril	març-abril
3	AL6	2019	26,67	13,33	6,67	20,00	0,00	13,33	6,67	13,33	20,00	20,00	març-abril	março
3	AL3	2020	86,67	86,67	86,67	66,67	66,67	86,67	100,00	93,33	93,33	93,33	fev-abril	març-abril
3	AL6	2020	13,33	46,67	20,00	40,00	13,33	26,67	20,00	16,67	13,33	20,00	març-abril	març-abril
3	AL3	2021	53,33	60,00	66,67	26,67	60,00	66,67	60,00	66,67	73,33	73,33	fev-abril	març-abril
3	AL6	2021	73,33	60,00	40,00	33,33	73,33	66,67	33,33	66,67	60,00	86,67	fev-abril	març-abril
3	AL3	2022	0,00	13,33	6,67	13,33	6,67	20,00	6,67	6,67	13,33	6,67	fev-abril	abril
3	AL6	2022	33,33	33,33	40,00	26,67	20,00	60,00	40,00	33,33	60,00	40,00	fev-abril	març-abril
3	AL3	2023	13,33	13,33	6,67	6,67	0,00	46,67	6,67	53,33	40,00	33,33	març-abril	abril
3	AL6	2023	33,33	33,33	13,33	20,00	20,00	26,67	26,67	40,00	46,67	33,33	fev-abril	març-abril

Nota: Ensaio instalado entre 30 de janeiro de 2024 a 2 de fevereiro de 2024; Em linha é apresentado por acesso/família e ano por condição e em coluna os tratamentos aplicados de (1 a 9 e C) a taxa de germinação (%). Tratamento C: Controlo, sem pré-tratamento germinativo; Tratamento 1: 1 semana de estratificação; Tratamento 2: 15 dias de estratificação; Tratamento 3: 30 dias de estratificação; Tratamento 4: 45 dias de estratificação; Tratamento 5: 60 dias de estratificação; Tratamento 6: 30 dias de estratificação + GA₃ (500 mg/L); Tratamento 7: 30 dias de estratificação + GA₃ (1000

Legenda: 1) **negrito**, Percentagem de germinação máxima por famílias/acesso e ano; 2) Percentagem de germinação máxima por tratamento (escala abaixo)



Na condição 3 como referido anteriormente os tratamentos com germinação superior a 85% corresponde aos tratamentos 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 e C e foram observados na família AL3 no ano de 2020 para todos os tratamentos. Na figura 45 mostra sementes a germinar na condição 3 no tratamento C.



Figura 45 - Observação da germinação na condição 3 (sementeira direta) ao fim de cerca de 5 semanas (7 de março de 2024).

É de destacar uma taxa de germinação de 100% que ocorreu no tratamento 7. Este tratamento consistiu na combinação de 30 dias de estratificação a frio e adição de GA₃ na concentração de 1000 mg/L, no entanto só mostra resultados interessantes para a família AL3 de 2020. Nos tratamentos 8, 9 e C para a mesma família são observados resultados superiores a 90% de germinação. O tratamento C, controlo obteve resultados iguais de germinação aos tratamentos com adição de GA₃.

No tratamento C para o acesso de 2018 e a família AL6 de 2021 observou-se taxas de germinação superiores a 85%

Nas restantes famílias e ano a adição de ácido giberélico foi em geral favorável à germinação. Os melhores resultados em geral são observados na concentração maior de GA₃ sem estratificação, tratamento 9 e no tratamento 7 e 8 onde foi adicionado GA₃ na concentração 1000 mg/L e 2000mg/L respetivamente e testados 30 dias de estratificação.

A germinação na condição 3, ocorreu entre os meses de fevereiro e abril ou março e abril tendo sido observado maior germinação nos meses de março e abril (instalação ocorreu nos dias 30 de janeiro de 2024, 31 de janeiro de 2024 e 2 de fevereiro de 2025).

Anexo VII- Análise de componentes principais no ensaio de tratamentos pré-germinativos (ensaio I).

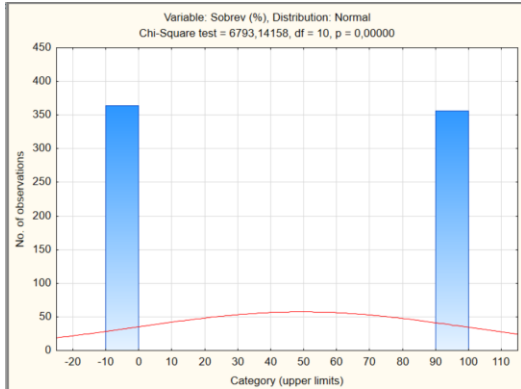
Factor Loadings (Unrotated) (Sementes_Ana.sta)			
Extraction: Principal components			
(Marked loadings are >,700000)			
Variable	Factor 1	Factor 2	
Tratamento	0,306592	0,771308	
Ano Colheita	-0,118453	0,596596	
Condição	0,784717	-0,228483	
Germinação %	0,847768	0,015908	
Expl.Var	1,442520	1,003301	
Prp.Totl	0,360630	0,250825	

Eigenvalues (Sementes_Ana.sta)				
Extraction: Principal components				
Value	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %
1	1,442520	36,06301	1,442520	36,06301
2	1,003301	25,08252	2,445821	61,14553

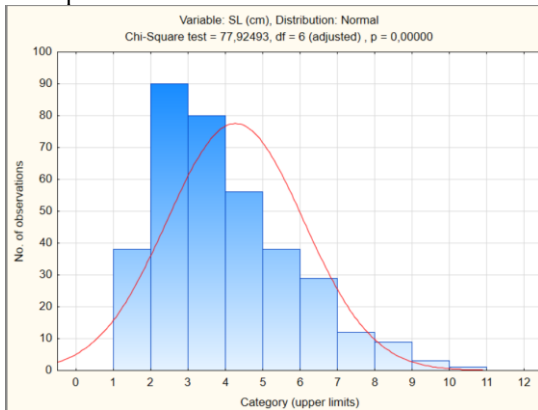
Anexo VIII- Realização de histogramas para testar se as variáveis numéricas apresentam uma distribuição Normal ($P > 5\%$).

Variáveis não paramétricas:

-Sobrevivência média



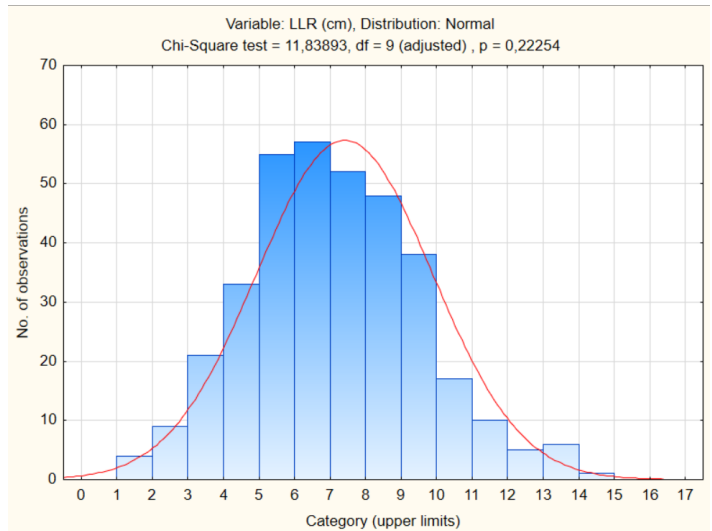
-Comprimento da maior raiz



As restantes variáveis, avaliação da parte radicular, avaliação da parte aérea, NPR, *Callus* e Myc Establish, são não paramétricas porque são expressas em escala quantitativa.

Variável paramétrica:

-Comprimento da maior raiz



Anexo IX- Teste de Kruskal-Wallis, para a variável não paramétrica: sobrevivência em função do clone.

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Sobrev (%) (Global_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Clone											
		Kruskal-Wallis test: H (1, N= 720) =7,190888 p =,0073											
Depend.:		1001	8001										
Sobrev (%)		R:378,50	R:342,50										
1001			0,020223										
8001		0,020223											

Anexo X- Teste de Kruskal-Wallis, para a variável não paramétrica: sobrevivência em função do tratamento.

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Sobrev (%) (Global_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Tratamento											
		Kruskal-Wallis test: H (11, N= 720) =153,0505 p =0,000											
Depend.:		S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Sobrev (%)		R:212,50	R:458,50	R:422,50	R:434,50	R:374,50	R:434,50	R:374,50	R:236,50	R:410,50	R:344,50	R:392,50	R:230,50
S7			0,000000	0,000002	0,000000	0,001313	0,000000	0,001313	1,000000	0,000012	0,033579	0,000141	1,000000
S1.0		0,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000000	1,000000	0,176974	1,000000	0,000000
S1.1		0,000002	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000064	1,000000	1,000000	1,000000	0,000028
S2.0		0,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,000012	1,000000	1,000000	1,000000	0,000005
S2.1		0,001313	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,018411	1,000000	1,000000	1,000000	0,009859
S9		0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,000012	1,000000	1,000000	1,000000	0,000005
S8		0,001313	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,018411	1,000000	1,000000	1,000000	0,009859
S6		1,000000	0,000000	0,000064	0,000012	0,018411	0,000012	0,018411		0,000304	0,293967	0,002633	1,000000
S4		0,000012	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000304		1,000000	1,000000	0,000141
S3.1		0,033579	0,176974	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,293967	1,000000		1,000000	0,176974
S3.0		0,000141	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,002633	1,000000	1,000000		0,001313
S5		1,000000	0,000000	0,000028	0,000005	0,009859	0,000005	0,009859	1,000000	0,000141	0,176974	0,001313	

Anexo XI- Teste de Kruskal-Wallis, para a variável não paramétrica: sobrevivência em função do tratamento para

a) clone 1001

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Sobrev (%) (1001_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Tratamento											
		Kruskal-Wallis test: H (11, N= 360) =96,85316 p =,0000											
Depend.:		S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Sobrev (%)		R:106,50	R:244,50	R:220,50	R:244,50	R:190,50	R:220,50	R:154,50	R:130,50	R:190,50	R:166,50	R:190,50	R:106,50
S7			0,000019	0,001458	0,000019	0,116891	0,001458	1,000000	1,000000	0,116891	1,000000	0,116891	1,000000
S1.0		0,000019		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,053441	0,001458	1,000000	0,244050	1,000000	0,000019
S1.1		0,001458	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,926570	0,053441	1,000000	1,000000	1,000000	0,001458
S2.0		0,000019	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,053441	0,001458	1,000000	0,244050	1,000000	0,000019
S2.1		0,116891	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,116891
S9		0,001458	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,926570	0,053441	1,000000	1,000000	1,000000	0,001458
S8		1,000000	0,053441	0,926570	0,053441	1,000000	0,926570		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6		1,000000	0,001458	0,053441	0,001458	1,000000	0,053441	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4		0,116891	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,116891
S3.1		1,000000	0,244050	1,000000	0,244050	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
S3.0		0,116891	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,116891
S5		1,000000	0,000019	0,001458	0,000019	0,116891	0,001458	1,000000	1,000000	0,116891	1,000000	0,116891	

b) clone 8001

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Sobrev (%) (8001_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 360) =77,36450 p =.0000												
Depend.: Sobrev (%)	S7 R:106,50	S1.0 R:214,50	S1.1 R:202,50	S2.0 R:190,50	S2.1 R:184,50	S9 R:214,50	S8 R:220,50	S6 R:106,50	S4 R:220,50	S3.1 R:178,50	S3.0 R:202,50	S5 R:124,50
S7		0,003852	0,023315	0,116891	0,244050	0,003852	0,001458	1,000000	0,001458	0,486542	0,023315	1,000000
S1.0	0,003852		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,003852	1,000000	1,000000	1,000000	0,053441
S1.1	0,023315	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,023315	1,000000	1,000000	1,000000	0,244050
S2.0	0,116891	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,116891	1,000000	1,000000	1,000000	0,926570
S2.1	0,244050	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,244050	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S9	0,003852	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,003852	1,000000	1,000000	1,000000	0,053441
S8	0,001458	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,001458	1,000000	1,000000	1,000000	0,023315
S6	1,000000	0,003852	0,023315	0,116891	0,244050	0,003852	0,001458		0,001458	0,486542	0,023315	1,000000
S4	0,001458	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,001458		1,000000	1,000000	0,023315
S3.1	0,486542	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,486542	1,000000		1,000000	1,000000
S3.0	0,023315	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,023315	1,000000	1,000000		0,244050
S5	1,000000	0,053441	0,244050	0,926570	1,000000	0,053441	0,023315	1,000000	0,023315	1,000000	0,244050	

Anexo XII- Teste de Kruskal-Wallis, para a variável não paramétrica a): comprimento dos rebentos (SL), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), *callus* e desenvolvimento de micorrizas em função do clone e teste de Tukey para a variável paramétrica b): comprimento da maior raiz (LLR). Em geral em função do clone.

a)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SL (mm) (Global_aclim_março5.sta)		
Independent (grouping) variable: Clone		
Kruskal-Wallis test: H (1, N= 356) =26,80251 p =.0000		
Depend.: SL (mm)	1001 R:153,10	8001 R:209,61
1001		0,000000
8001	0,000000	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Aval.P Radic (Global_aclim_março5.sta)		
Independent (grouping) variable: Clone		
Kruskal-Wallis test: H (1, N= 356) =31,64685 p =.0000		
Depend.: Aval.P Radic	1001 R:152,44	8001 R:210,42
1001		0,000000
8001	0,000000	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Aval.P.Aerea (Global_aclim_março5.sta)		
Independent (grouping) variable: Clone		
Kruskal-Wallis test: H (1, N= 356) =7,267675 p =.0070		
Depend.: Aval.P.Aerea	1001 R:170,62	8001 R:188,15
1001		0,109929
8001	0,109929	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); NPR (Global_aclim_março5.sta)		
Independent (grouping) variable: Clone		
Kruskal-Wallis test: H (1, N= 356) =17,71342 p =.0000		
Depend.: NPR	1001 R:158,58	8001 R:202,90
1001		0,000053
8001	0,000053	

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Callus (Global_aclim_março5.sta)			
		Independent (grouping) variable: Clone			
		Kruskal-Wallis test: H (1, N= 356) =,4055542 p =,5242			
Depend.:		1001	8001		
Callus		R:175,85	R:181,75		
1001			0,590687		
8001		0,590687			

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Myc (Estab.) (Global_aclim_março5.sta)			
		Independent (grouping) variable: Clone			
		Kruskal-Wallis test: H (1, N= 356) =3,293135 p =,0696			
Depend.:		1001	8001		
Myc (Estab.)		R:180,13	R:176,50		
1001			0,740420		
8001		0,740420			

b)

Univariate Tests of Significance for LLR (cm) (Global_aclim_março5.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	19783,87	1	19783,87	3602,153	0,000000
Clone	232,62	1	232,62	42,354	0,000000
Error	1944,25	354	5,49		

Tukey HSD test; variable LLR (cm) (Global_aclim_março5.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 5,4922, df = 354,00				
Cell No.	Clone	LLR (cm) Mean	1	2
1	1001	6,680612	****	
2	8001	8,305625		****

Anexo XIII- Teste de Kruskal-Wallis, para a variável não paramétrica a): comprimento dos rebentos (SL), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), callus e desenvolvimento de micorrizas em função do clone e teste de Tukey para a variável paramétrica b): comprimento da maior raiz (LLR). Em geral em função do tratamento.

a)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SL (mm) (Global_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 356) =123,9043 p =0,000												
Depend.:	S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
SL (mm)	R:154,30	R:249,00	R:228,18	R:216,36	R:185,97	R:221,89	R:100,97	R:67,333	R:191,30	R:127,28	R:73,700	R:89,188
S7		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0	1,000000		1,000000	1,000000	0,514675	1,000000	0,000000	0,000084	0,695787	0,000070	0,000000	0,003325
S1.1	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,000012	0,001500	1,000000	0,005462	0,000000	0,032230
S2.0	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,000117	0,005327	1,000000	0,029680	0,000000	0,089665
S2.1	1,000000	0,514675	1,000000	1,000000		1,000000	0,062959	0,148404	1,000000	1,000000	0,000540	1,000000
S9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,000036	0,002863	1,000000	0,012783	0,000000	0,054748
S8	1,000000	0,000000	0,000012	0,000117	0,062959	0,000036		1,000000	0,016746	1,000000	1,000000	1,000000
S6	1,000000	0,000084	0,001500	0,005327	0,148404	0,002863	1,000000		0,076315	1,000000	1,000000	1,000000
S4	1,000000	0,695787	1,000000	1,000000	1,000000	0,016746	0,076315	0,076315		0,887498	0,000071	0,709305
S3.1	1,000000	0,000070	0,005462	0,029680	1,000000	0,012783	1,000000	1,000000	0,887498		1,000000	1,000000
S3.0	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000540	0,000000	1,000000	1,000000	0,000071	1,000000		1,000000
S5	1,000000	0,003325	0,032230	0,089665	1,000000	0,054748	1,000000	1,000000	0,709305	1,000000	1,000000	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Aval.P Radic (Global_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 356) =14,11299 p =,2268												
Depend.:	S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Aval.P Radic	R:185,30	R:161,21	R:159,84	R:196,86	R:215,42	R:201,21	R:174,73	R:153,83	R:180,64	R:163,57	R:161,01	R:163,19
S7		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.1	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.0	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S8	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
S3.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
S3.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
S5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Aval.P.Aerea (Global_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 356) =98,36432 p =,0000												
Depend.:	S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Aval.P.Aerea	R:202,50	R:198,71	R:202,50	R:202,50	R:191,59	R:194,19	R:167,77	R:119,56	R:197,91	R:128,22	R:112,06	R:144,00
S7		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,312022	0,011497	1,000000
S1.1	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,248040	0,009667	1,000000
S2.0	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,226621	0,008124	1,000000
S2.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,104172	0,032227	1,000000
S9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,617694	0,024408	1,000000
S8	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,471236	0,024408	1,000000
S3.1	1,000000	0,312022	0,248040	0,226621	1,000000	0,617694	1,000000	1,000000	0,471236		1,000000	1,000000
S3.0	1,000000	0,011497	0,009667	0,008124	0,104172	0,032227	1,000000	1,000000	0,024408	1,000000		1,000000
S5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); NPR (Global_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 356) =16,35825 p =,1283												
Depend.:	S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
NPR	R:158,00	R:188,51	R:166,72	R:183,05	R:150,28	R:205,35	R:184,64	R:126,06	R:198,28	R:157,04	R:159,90	R:235,00
S7	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S8	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S3.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S3.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Callus (Global_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 356) =30,56659 p =,0013												
Depend.:	S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Callus	R:117,50	R:182,41	R:160,55	R:219,19	R:219,61	R:180,07	R:148,63	R:148,50	R:154,76	R:161,56	R:192,24	R:160,63
S7	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.1	1,000000	1,000000	1,000000	0,653688	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.0	1,000000	1,000000	0,653688	1,000000	1,000000	0,229407	0,229407	1,000000	0,341236	1,000000	1,000000	1,000000
S2.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,382639	1,000000	0,569809	1,000000	1,000000	1,000000
S9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S8	1,000000	1,000000	1,000000	0,229407	0,382639	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4	1,000000	1,000000	1,000000	0,341236	0,569809	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S3.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S3.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Myc (Estab.) (Global_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 356) =30,15963 p =,0015												
Depend.:	S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Myc (Estab.)	R:176,50	R:176,50	R:176,50	R:176,50	R:176,50	R:193,45	R:176,50	R:176,50	R:176,50	R:176,50	R:176,50	R:176,50
S7	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S8	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S3.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S3.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

b)

Univariate Tests of Significance for LLR (cm) (Global_aclim_março5.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	11231,33	1	11231,33	1947,806	0,000000
Tratamento	193,31	11	17,57	3,048	0,000657
Error	1983,55	344	5,77		

Tukey HSD test; variable LLR (cm) (Global_aclim_março5.sta)					
Homogenous Groups, alpha = ,05000					
Error: Between MS = 5,7661, df = 344,00					
Cell No.	Tratamento	LLR (cm) Mean	1	2	3
12	S5	4,875000		****	****
9	S4	5,813158			****
8	S6	7,222222	****	****	****
3	S1.1	7,230000	****	****	****
7	S8	7,503125	****	****	****
2	S1.0	7,565217	****	****	
10	S3.1	7,611111	****	****	****
6	S9	7,680952	****	****	
5	S2.1	7,750000	****	****	
4	S2.0	8,011905	****		
11	S3.0	8,042857	****		
1	S7	8,400000	****	****	****

Anexo XIV- Teste de Kruskal-Wallis, para a variável não paramétrica a): comprimento dos rebentos (SL), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), callus e desenvolvimento de micorrizas em função do clone e teste de Tukey para a variável paramétrica b): comprimento da maior raiz (LLR). Para o clone 1001.

a)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SL (mm) (1001_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 196) =66,82349 p =,0000												
Depend.:	S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
SL (mm)	R:97,125	R:136,33	R:122,87	R:117,19	R:97,139	R:110,24	R:52,375	R:48,438	R:121,00	R:64,214	R:40,583	R:34,750
S7	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,001313	0,007816	1,000000	0,007471	0,000002	0,054781
S1.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,031898	0,091709	1,000000	0,150810	0,000266	0,273002
S2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,065385	0,171976	1,000000	0,302031	0,000599	0,440705
S2.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,275600	0,524452	1,000000	0,077186	0,183484	1,000000
S9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,275600	0,524452	1,000000	1,000000	0,006295	0,925832
S8	1,000000	0,001313	0,031898	0,065385	1,000000	0,275600	1,000000	1,000000	0,077186	1,000000	1,000000	1,000000
S6	1,000000	0,007816	0,091709	0,171976	1,000000	0,524452	1,000000	1,000000	0,172149	1,000000	1,000000	1,000000
S4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,077186	0,172149	1,000000	0,327714	0,001392	0,392487
S3.1	1,000000	0,007471	0,150810	0,302031	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,327714	1,000000	1,000000	1,000000
S3.0	1,000000	0,000002	0,000266	0,000599	0,183484	0,006295	1,000000	1,000000	0,001392	1,000000	1,000000	1,000000
S5	1,000000	0,054781	0,273002	0,440705	1,000000	0,925832	1,000000	1,000000	0,392487	1,000000	1,000000	1,000000

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SL (mm) (1001_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 196) =66,82349 p =,0000												
Depend.:	S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
SL (mm)	R:97,125	R:136,33	R:122,87	R:117,19	R:97,139	R:110,24	R:52,375	R:48,438	R:121,00	R:64,214	R:40,583	R:34,750
S7	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,001313	0,007816	1,000000	0,007471	0,000002	0,054781
S1.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,031898	0,091709	1,000000	0,150810	0,000266	0,273002
S2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,065385	0,171976	1,000000	0,302031	0,000599	0,440705
S2.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,275600	0,524452	1,000000	0,077186	0,183484	1,000000
S9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,275600	0,524452	1,000000	1,000000	0,006295	0,925832
S8	1,000000	0,001313	0,031898	0,065385	1,000000	0,275600	1,000000	1,000000	0,077186	1,000000	1,000000	1,000000
S6	1,000000	0,007816	0,091709	0,171976	1,000000	0,524452	1,000000	1,000000	0,172149	1,000000	1,000000	1,000000
S4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,077186	0,172149	1,000000	0,327714	0,001392	0,392487
S3.1	1,000000	0,007471	0,150810	0,302031	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,327714	1,000000	1,000000	1,000000
S3.0	1,000000	0,000002	0,000266	0,000599	0,183484	0,006295	1,000000	1,000000	0,001392	1,000000	1,000000	1,000000
S5	1,000000	0,054781	0,273002	0,440705	1,000000	0,925832	1,000000	1,000000	0,392487	1,000000	1,000000	1,000000

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Aval.P Aérea (1001_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Tratamento											
		Kruskal-Wallis test: H (11, N= 196)=83.85826 p =.0000											
Depend.:		S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Aval.P Aérea		R:116,00	R:112,48	R:116,00	R:116,00	R:110,72	R:107,74	R:83,000	R:64,000	R:116,00	R:43,571	R:57,056	R:75,250
S7			1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0		1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,014880	0,087269	1,000000
S1.1		1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,010916	0,063353	1,000000
S2.0		1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,006980	0,042104	1,000000
S2.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,058977	0,299358	1,000000
S9		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,055868	0,298442	1,000000
S8		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,022406	0,120416	1,000000
S3.1		1,000000	0,014880	0,010916	0,006980	0,058977	0,055868	1,000000	1,000000	0,022406		1,000000	1,000000
S3.0		1,000000	0,087269	0,063353	0,042104	0,299358	0,298442	1,000000	1,000000	0,120416	1,000000		1,000000
S5		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); NPR (1001_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Tratamento											
		Kruskal-Wallis test: H (11, N= 196)=6,042054 p =.8705											
Depend.:		S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
NPR		R:114,00	R:109,59	R:95,000	R:96,630	R:78,889	R:97,130	R:105,92	R:83,625	R:100,56	R:100,14	R:99,222	R:126,25
S7			1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0		1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.1		1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.0		1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S9		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S8		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
S3.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
S3.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
S5		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Callus (1001_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Tratamento											
		Kruskal-Wallis test: H (11, N= 196)=25,38385 p =.0080											
Depend.:		S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Callus		R:68,000	R:97,889	R:82,239	R:124,41	R:126,58	R:97,978	R:74,208	R:86,625	R:92,389	R:96,857	R:96,333	R:68,000
S7			1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0		1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.1		1,000000	1,000000		0,580595	0,857128	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.0		1,000000	1,000000	0,580595		0,709473	0,873137	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.1		1,000000	1,000000	0,857128	1,000000		1,000000	0,873137	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S9		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S8		1,000000	1,000000	1,000000	0,709473	0,873137	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
S3.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
S3.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
S5		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Myc Esta (1001_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Tratamento											
		Kruskal-Wallis test: H (11, N= 196)=30,55707 p =.0013											
Depend.:		S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Myc Esta		R:96,500	R:96,500	R:96,500	R:96,500	R:96,500	R:113,54	R:96,500	R:96,500	R:96,500	R:96,500	R:96,500	R:96,500
S7			1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0		1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.1		1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.0		1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S9		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S8		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
S3.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
S3.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
S5		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

b)

Univariate Tests of Significance for LLR (cm) (1001_aclim_março5.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5713,527	1	5713,527	1201,942	0,000000
Tratamento	166,508	11	15,137	3,184	0,000560
Error	874,659	184	4,754		

Tukey HSD test; variable LLR (cm) (1001_aclim_março5.sta)					
Homogenous Groups, alpha = ,05000					
Error: Between MS = 4,7536, df = 184,00					
Cell No.	Tratamento	LLR (cm) Mean	1	2	
12	S5	4,125000	****	****	
9	S4	5,150000		****	
3	S1.1	5,869565	****	****	
7	S8	5,925000	****	****	
2	S1.0	6,444444	****	****	
6	S9	6,530435	****	****	
10	S3.1	6,957143	****	****	
11	S3.0	7,333333	****	****	
8	S6	7,437500	****	****	
5	S2.1	7,583333	****		
4	S2.0	7,814815	****		
1	S7	8,375000	****	****	

Anexo XV- Teste de Kruskal-Wallis, para a variável não paramétrica a): comprimento dos rebentos (SL), avaliação da parte radicular e aérea, número de raízes principais (NPR), callus e desenvolvimento de micorrizas em função do clone e teste de Tukey para a variável paramétrica b): comprimento da maior raiz (LLR). Para o clone 8001.

a)

Multiple Comparisons p values (2-tailed); SL (mm) (8001_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 160) =83,68559 p =,0000												
Depend.:	S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
SL (mm)	R:66,500	R:115,58	R:110,35	R:112,83	R:90,750	R:114,24	R:38,425	R:12,000	R:71,000	R:57,846	R:27,794	R:45,750
S7		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000013	1,000000	0,176232	0,035402	0,000001	0,405923
S1.1	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,000167	1,000000	0,662081	0,138525	0,000014	0,798900
S2.0	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,000170	1,000000	0,541677	0,114601	0,000015	0,665518
S2.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,078639	1,000000	1,000000	1,000000	0,010994	1,000000
S9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,000022	1,000000	0,236311	0,047595	0,000002	0,475839
S8	1,000000	0,000013	0,000167	0,000170	0,078639	0,000022		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4	1,000000	0,176232	0,662081	0,541677	1,000000	0,236311	1,000000	1,000000		1,000000	0,310278	1,000000
S3.1	1,000000	0,035402	0,138525	0,114601	1,000000	0,047595	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
S3.0	1,000000	0,000001	0,000014	0,000015	0,010994	0,000002	1,000000	1,000000	0,310278	1,000000		1,000000
S5	1,000000	0,405923	0,798900	0,665518	1,000000	0,475839	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Ava. P Radic (8001_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Tratamento											
		Kruskal-Wallis test: H (11, N= 160) =19,87344 p =,0471											
Depend.:		S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Ava. P Radic		R:50,000	R:64,474	R:57,059	R:86,000	R:97,464	R:86,105	R:84,300	R:50,000	R:78,950	R:66,692	R:102,29	R:105,88
S7		1,000000											
S1.0		1,000000	1,000000										
S1.1		1,000000	1,000000	1,000000									
S2.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000								
S2.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000							
S9		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000						
S8		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000					
S6		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000				
S4		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000			
S3.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		
S3.0		1,000000	0,955795	0,291778	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
S5		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Aval.P Aérea (8001_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Tratamento											
		Kruskal-Wallis test: H (11, N= 160) =32,34117 p =,0007											
Depend.:		S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Aval.P Aérea		R:87,000	R:87,000	R:87,000	R:87,000	R:81,321	R:87,000	R:78,500	R:87,000	R:83,025	R:80,885	R:54,235	R:68,375
S7		1,000000											
S1.0		1,000000	1,000000										
S1.1		1,000000	1,000000	1,000000									
S2.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000								
S2.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000							
S9		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000						
S8		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000					
S6		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000				
S4		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000			
S3.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		
S3.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
S5		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); NPR (8001_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Tratamento											
		Kruskal-Wallis test: H (11, N= 160) =21,61878 p =,0275											
Depend.:		S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
NPR		R:25,500	R:83,079	R:72,059	R:91,967	R:69,571	R:108,39	R:75,850	R:25,500	R:90,825	R:59,462	R:62,029	R:112,88
S7		1,000000											
S1.0		1,000000	1,000000										
S1.1		1,000000	1,000000	1,000000									
S2.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000								
S2.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000							
S9		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000						
S8		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000					
S6		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000				
S4		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000			
S3.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,220685	1,000000	1,000000	1,000000			
S3.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,179647	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		
S5		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Callus (8001_aclim_março5.sta)											
		Independent (grouping) variable: Tratamento											
		Kruskal-Wallis test: H (11, N= 160) =14,09320 p =,2279											
Depend.:		S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Callus		R:50,000	R:86,105	R:80,647	R:93,433	R:92,750	R:82,342	R:70,450	R:50,000	R:63,000	R:64,962	R:95,529	R:92,750
S7		1,000000											
S1.0		1,000000	1,000000										
S1.1		1,000000	1,000000	1,000000									
S2.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000								
S2.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000							
S9		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000						
S8		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000					
S6		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000				
S4		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000			
S3.1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		
S3.0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
S5		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Myc Esta (8001_aclim_março5.sta)												
Independent (grouping) variable: Tratamento												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 160) =0,000000 p =1,000												
Depend.:	S7	S1.0	S1.1	S2.0	S2.1	S9	S8	S6	S4	S3.1	S3.0	S5
Myc Esta	R:80,500	R:80,500	R:80,500	R:80,500	R:80,500	R:80,500	R:80,500	R:80,500	R:80,500	R:80,500	R:80,500	R:80,500
S7		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.0	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S1.1	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.0	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S2.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S9	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S8	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S6	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
S4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
S3.1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
S3.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
S5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

b)

Tukey HSD test; variable LLR (cm) (8001_aclim_março5.sta)					
Homogenous Groups, alpha = ,05000					
Error: Between MS = 5,0908, df = 148,00					
Cell No.	Tratamento	LLR (cm) Mean	1	2	
8	S6	5,500000	****	****	
12	S5	5,625000	****	****	
9	S4	6,410000		****	
5	S2.1	7,964286	****	****	
10	S3.1	8,315385	****	****	
4	S2.0	8,366667	****	****	
7	S8	8,450000	****	****	
1	S7	8,500000	****	****	
11	S3.0	8,794118	****	****	
3	S1.1	9,070588	****		
6	S9	9,073684	****		
2	S1.0	9,157895	****		

Univariate Tests of Significance for LLR (cm) (8001_aclim_março5.s					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3252,702	1	3252,702	638,9310	0,000000
Tratamento	149,639	11	13,604	2,6722	0,003715
Error	753,446	148	5,091		

Anexo XVI-Análise de componentes principais (PCA) ensaio II.

Factor Loadings (Unrotated) (Global_Vivas_aclim_março5.sta)				
Extraction: Principal components				
(Marked loadings are >,700000)				
Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3	
Clone	-0,498354	0,594997	-0,144666	
Tratamento	0,466394	0,663422	0,011840	
Sobrv Med %	-0,184895	-0,772356	0,098439	
SL (cm)	-0,820225	-0,122235	-0,050527	
LLR	-0,568278	0,224676	-0,410278	
Av.PRaiz	-0,623654	0,258350	0,022318	
Aval.P.Aerea	-0,609466	-0,286310	0,164258	
NPR	-0,494540	0,290040	0,459449	
Callus	-0,008171	-0,261971	-0,775289	
Myc (Estab.)	0,002436	-0,148619	0,369032	
Expl.Var	2,500812	1,779664	1,177469	
Prp.Totl	0,250081	0,177966	0,117747	

Eigenvalues (Global_Vivas_aclim_março5.sta)				
Extraction: Principal components				
Value	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %
1	2,500812	25,00812	2,500812	25,00812
2	1,779664	17,79664	4,280475	42,80475
3	1,177469	11,77469	5,457945	54,57945

Anexo XVII-Resultados da análise dos substratos no laboratório de solos da ESAC.

Nº Lab.	Ref.	pH (1:5, v/v)	CE, mS/cm (1:5, v/v)	P2O5 (mg/L), tal qual	Ca (mg/L), tal qual	CaO, mg/L (x 1,399)	Mg (mg/L), tq	MgO (x 1,658)	K (mg/L), tq	K2O (x 1,204)	Na (mg/L), tq
O 2389	S1.0	5,8	0,73	199	304	425	107	177	199	239	19
O 2390	S1.1	6,2	0,75	211	261	364	85	141	211	253	108
O 2391	S2.1	5,9	0,50	221	106	148	19	31	313	376	81
O 2392	S3.1	4,1	1,04	15	45	63	6	10	24	28	50
O 2393	S4	3,9	0,19	13	51	72	18	29	8	9	21
O 2394	S5	3,3	1,51	4248	826	1156	233	385	78	94	63
O 2395	S6	4,7	1,58	4781	1216	1702	106	175	112	135	76
O 2396	S7	4,8	1,29	4564	1068	1493	117	193	112	135	90
O 2397	S8	6,0	0,15	19	106	148	9	14	53	63	44
O 2398	S9	5,8	0,54	259	149	209	24	39	422	507	70

Data de início análise: 01-03-2024		Data de saída: 19-03-2024		
Parâmetros	Nº Laboratório	O 2378		
		Doc. normativos/ Metodologia	Ref. "Siro florestal"	
Massa volúmica aparente compactada (MVAC) (g L ⁻¹)	(FCQAO, 19694)	409	-	-
Humidade (%)	EN 13040:1999 E	59,37	-	-
pH (1:5, v/v, 18,5°C)	Escala de Sørensen NP EN 12776:2000	6,1	-	-
C. Elétrica (1:5, v/v) (mS cm ⁻¹ , 25°C)	EN 13038:1999 E	0,49	-	-
Matéria orgânica (%)	EN 13039:1999 E	-	-	-
Carbono orgânico (%)	Combustão a 590°C (LECO*, 1997)	-	-	-
Azoto Kj. (% N)	Método Kjeldahl	-	-	-
C/N	Valor calculado	-	-	-
Fósforo extraível (mg P l ⁻¹)	Extração em H ₂ O: 1/5, v/v e doseamento por espectrofotometria de absorção molecular	120	equivalente a	274 mg P ₂ O ₅ l ⁻¹
Potássio extraível (mg K l ⁻¹)	Extração em H ₂ O: 1/5, v/v e doseamento por	316	equivalente a	381 mg K ₂ O l ⁻¹
Sódio extraível (mg Na l ⁻¹)	espectrofotometria de absorção atómica com chama	72	-	-
Cálcio extraível (mg Ca l ⁻¹)		188	equivalente a	263 mg CaO l ⁻¹
Magnésio extraível (mg Mg l ⁻¹)		27	equivalente a	45 mg MgO l ⁻¹

Nota: Os resultados apresentados referem-se às análises realizadas na amostra "tal qual".

Data de início análise: 01-03-2024		Data de saída: 19-03-2024		
Parâmetros	Nº Laboratório	O 2379		
		Doc. normativos/ Metodologia	Ref. "Turfa+Perlite; 50:50"	
Massa volúmica aparente compactada (MVAC) (g L ⁻¹)	(FCQAO, 19694)	164164	-	-
Humidade (%)	EN 13040:1999 E	44,11	-	-
pH (1:5, v/v, 18,5°C)	Escala de Sørensen NP EN 12776:2000	4,4	-	-
C. Elétrica (1:5, v/v) (mS cm ⁻¹ , 25°C)	EN 13038:1999 E	0,04	-	-
Matéria orgânica (%)	EN 13039:1999 E	-	-	-
Carbono orgânico (%)	Combustão a 590°C (LECO*, 1997)	-	-	-
Azoto Kj. (% N)	Método Kjeldahl	-	-	-
C/N	Valor calculado	-	-	-
Fósforo extraível (mg P l ⁻¹)	Extração em H ₂ O: 1/5, v/v e doseamento por espectrofotometria de absorção molecular	1,25	equivalente a	2,86 mg P ₂ O ₅ l ⁻¹
Potássio extraível (mg K l ⁻¹)	Extração em H ₂ O: 1/5, v/v e doseamento por	7,36	equivalente a	8,86 mg K ₂ O l ⁻¹
Sódio extraível (mg Na l ⁻¹)	espectrofotometria de absorção atómica com chama	19	-	-
Cálcio extraível (mg Ca l ⁻¹)		20	equivalente a	28 mg CaO l ⁻¹
Magnésio extraível (mg Mg l ⁻¹)		1,35	equivalente a	2,24 mg MgO l ⁻¹

Nota: Os resultados apresentados referem-se às análises realizadas na amostra "tal qual".