

***Micropropagação e Germinação das Espécies Endémicas  
da Ilha da Berlenga***

Inês Maria De Almeida Franco

2019



***Micropropagação e Germinação das Espécies Endémicas  
da ilha da Berlenga***

Inês Maria De Almeida Franco

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Clélia Paulete Correia Neves Afonso e  
coorientação da Doutora Teresa Margarida Lopes da Silva Mougá

2019



# ***Micropropagação e germinação de Espécies Endémicas da ilha da Berlenga***

Copyright Inês Maria De Almeida Franco / Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e Instituto  
Politécnico de Leiria.

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Resumo

O decréscimo do número de exemplares de algumas das espécies vegetais endémicas da ilha da Berlenga é resultado do impacto exercido pelo Homem, sendo um cenário preocupante. A conservação destas espécies ainda é possível a partir de técnicas de cultura *in vitro*.

O objetivo principal deste trabalho foi o estabelecimento de protocolos que permitam a multiplicação por micropropagação ou por germinação de sementes, de três espécies endémicas da ilha da Berlenga, *Pulicaria microcephala*, *Armeria berlengensis* e *Herniaria berlengiana*, que se encontram categorizadas como espécies em risco de extinção ou criticamente ameaçadas.

No estabelecimento de novos cultivos, foi determinada a taxa de sucesso na desinfeção das três espécies, sendo que os melhores resultados obtidos foram de 24,4% para *P. microcephala*, 15,79% para *A. berlengensis* e 18,2% para *H. berlengiana*, com diferentes processos de desinfeção. Avaliou-se igualmente, a taxa de sucesso na germinação de *P. microcephala*, que variou entre 6,19 e 73,02%. Em *A. berlengensis* obtiveram-se valores inferiores de germinação (20%), facto que, em conjunto com uma taxa de fecundidade de 3,5%, corrobora a necessidade da micropropagação como estratégia para a recuperação desta espécie. Foram realizados ainda ensaios de aclimatização com *P. microcephala* e *A. berlengensis* e estudadas as taxas de sucesso dos mesmos. Em *P. microcephala* a taxa de sucesso chegou aos 90,90%, quando realizada com uma luminosidade de 5790 lux, no entanto, e apesar da taxa de sucesso é apenas de 63,64% em plantas que foram aclimatizadas no exterior com luminosidade, humidade e temperatura não controladas, natural, estas apresentaram maior quantidade de flores. As plantas de *A. berlengensis* de menores dimensões registaram os melhores resultados de aclimatização, com 80% de sucesso. Foi ainda estudada a adição ao meio de cultura para o desenvolvimento de *P. microcephala*, de hormonas de crescimento e NaCl, bem como testados diferentes valores de pH.

Este estudo demonstra que a micropropagação, seguida de aclimatização, é a melhor solução até agora encontrada para contribuir na conservação destas três espécies.

**Palavras-chave:** Cultura *in vitro*; Conservação; Berlenga; *Pulicaria microcephala*; *Armeria berlengensis*; *Herniaria berlengiana*





## Abstract

The decrease in the number of specimens of some of the endemic plant species of Berlenga Island is a result of the impact exerted by man, being a worrying scenario. The conservation of this species it's still possible using in vitro techniques.

The main objective of this work was the establishment of protocols that allow micropropagation or seed germination of three endemic species of Berlenga Island, *Pulicaria microcephala*, *Armeria berlengensis* and *Herniaria berlengiana*, which are categorized as endangered species or critically endangered.

In the establishment of new cultures, the disinfection success rate of the three species was determined, and the best results were 24.4% for *P. microcephala*, 15.79% for *A. berlengensis* and 18.2% for *H. berlengiana*, with different disinfection processes. The success rate of *P. microcephala* germination, which ranged from 6.19 to 73.02%, was also evaluated. In *A. berlengensis*, lower germination values were obtained (20%), which, together with a fertility rate of 3.5%, corroborates the need for micropropagation as a strategy for the recovery of this species. Acclimatization assays were also performed with *P. microcephala* and *A. berlengensis* and their success rates were studied. In *P. microcephala* the success rate reached 90.90% when performed with a luminosity of 5790 lux, however, the success rate is only 63.64% in plants which were acclimatized outdoors with uncontrolled luminosity, humidity and temperature, but it presented a larger number of flowers. The smaller *A. berlengensis* plants had the best acclimatization results, 80% success. The addition to culture medium for the development of *P. microcephala*, of growth hormones and NaCl, as well as different pH values were also studied.

This study demonstrates that micropropagation followed by acclimatization is the best solution found so far to contribute to the conservation of these three species.

**Keywords:** In vitro culture; Nature conservation; Berlenga; *Pulicaria microcephala*; *Armeria berlengensis*; *Herniaria berlengiana*



# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução Geral</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Reserva Natural das Berlengas</i>	3
1.2	<i>Caso de Estudo: Pulicaria microcephala</i>	4
1.3	<i>Caso de Estudo: Armeria berlengensis</i>	5
1.4	<i>Caso de Estudo: Herniaria berlengiana</i>	6
1.5	<i>Ações de melhoramento – Projeto Life+Berlengas</i>	7
1.6	<i>Micropropagação e germinação de sementes</i>	8
1.7	<i>Objetivos</i>	10
<b>2</b>	<b>Materiais e Metodologia Geral</b>	<b>13</b>
2.1	<i>Preparação de Meios de Cultura</i>	15
2.1.1	MS.1	15
2.1.2	MS.2	15
2.1.3	MS.3	15
2.1.4	MS.4	15
2.2	<i>Recolha de explantes</i>	15
2.3	<i>Desinfecção e estabelecimento in vitro</i>	16
2.4	<i>Condições de cultura in vitro</i>	16
2.5	<i>Aclimatização a condições ex vitro</i>	17
2.6	<i>Análise estatística</i>	17
2.7	<i>Local de recolha dos explantes</i>	18
2.8	<i>Local de recolha das amostras de solo</i>	19
<b>3</b>	<b>Desinfecção e germinação de sementes</b>	<b>21</b>
3.1	<i>Introdução</i>	23
3.2	<i>Materiais e Metodologias</i>	24
3.2.1	<i>Recolha e recuperação dos frutos de Pulicaria microcephala</i>	24
3.2.2	<i>Desinfecção dos frutos de Pulicaria microcephala</i>	24
3.2.3	<i>Recolha e recuperação de sementes de Armeria berlengensis</i>	25
3.2.4	<i>Desinfecção de sementes de Armeria berlengensis</i>	26
3.3	<i>Resultados e Discussão</i>	26
<b>4</b>	<b>Pulicaria microcephala</b>	<b>37</b>
4.1	<i>Introdução</i>	39
4.2	<i>Materiais e Metodologia</i>	40
4.2.1	<i>Recolha de explantes</i>	40
4.2.2	<i>Desinfecção e estabelecimento</i>	40
4.2.3	<i>Ação de hormonas vegetais no crescimento de Pulicaria microcephala</i>	40
4.2.4	<i>Aclimatização a condições ex vitro</i>	41
4.3	<i>Resultados e Discussão</i>	41
<b>5</b>	<b>Armeria berlengensis</b>	<b>47</b>
5.1	<i>Introdução</i>	49
5.2	<i>Materiais e Metodologias</i>	50

5.2.1	Recolha de Material	50
5.2.2	Desinfecção de <i>Armeria berlengensis</i>	50
5.2.3	Aclimatização	50
5.2.4	Indução de <i>calli</i>	51
5.3	<i>Resultados e Discussão</i>	51
<b>6</b>	<b><i>Herniaria berlengiana</i></b>	<b>61</b>
6.1	<i>Introdução</i>	63
6.2	<i>Materiais e Metodologias</i>	63
6.2.1	Recolha de Material	63
6.2.2	Desinfecção de <i>Herniaria berlengiana</i>	63
6.3	<i>Resultados e Discussão</i>	64
<b>7</b>	<b>Impacto do pH, salinidade e fonte de nutrientes em <i>Pulicaria microcephala</i></b>	<b>67</b>
7.1	<i>Introdução</i>	69
7.2	<i>Material e Metodologia</i>	71
7.2.1	Análise de amostras de solo da Berlenga	71
7.2.1.1	Recolha de material	71
7.2.1.1	Tratamento inicial das amostras	72
7.2.1.2	Textura de Campo	73
7.2.1.3	Quantificação da matéria orgânica	73
7.2.1.4	Determinação do pH	74
7.2.1.5	Determinação da Salinidade	74
7.2.2	Influência do pH e da Salinidade no crescimento de <i>Pulicaria microcephala</i>	75
7.3	<i>Resultados e Discussão</i>	75
7.3.1	Influência do pH e da Salinidade no crescimento de <i>Pulicaria microcephala</i>	82
<b>8</b>	<b>Discussão e Conclusões Gerais</b>	<b>85</b>
8.1	<i>Discussão e conclusões gerais</i>	87
8.2	<i>Perspetivas futuras</i>	89
<b>9</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>Anexos</b>	<b>101</b>

## Índice de Figuras

- Figura 2.1 Plantas adultas de *Pulicaria microcephala* (a), *Armeria berlangensis* (b) e *Herniaria berlangiana* (c) e respectivos explantes (d, e, f) 16
- Figura 2.2 Demonstração das intensidades luminosas observadas durante o processo de aclimatização para estudo do impacto da luz com diferentes intensidades luminosas (Lux ): 3650 Lux (a), 5640 Lux (b), 5790 Lux (c), intensidade luminosa não controlada (d); fotos do estado inicial das plantas antes de se iniciar o processo de aclimatização ((a), (b), (c), (d)) foto do estado de desenvolvimento após um mês de aclimatização no exterior, sem intensidade luminosa e parâmetros de temperatura controlados. 17
- Figura 2.3 Mapa da zona de recolha do material biológico vegetal, explantes e infrutescências, de cada um dos casos de estudo: *Pulicaria microcephala*, *Armeria berlangensis* e *Herniaria berlangiana*. Adaptado do INCF (ICNF, 2019). 18
- Figura 2.4 Mapa da zona de recolha das amostras de solo de diversas zonas de interesse das ilhas da Berlenga. Adaptado do INCF (ICNF, 2019). 19
- Figura 3.1 Valores percentuais das Taxas de Germinação (cor verde), Taxa de Inviabilidade (cor cinza) e Taxa de Contaminação (cor laranja) para os vários processos de desinfeção aplicados a sementes de *Pulicaria microcephala*. 27
- Figura 3.2 Fruto de *Pulicaria microcephala* (lupa binocular com escala de 500µm) (a), plântula e sementeira (lupa binocular com ampliação de 32x) (b) e plântulas com 2 semanas (c). 30
- Figura 3.3 Valores percentuais das Taxas de Germinação (cor verde), Taxa de Inviabilidade (cor cinza) e Taxa de Contaminação (cor laranja) para os vários processos de desinfeção aplicados a diversos conjuntos de sementes de *Armeria berlangensis* em germinação em placa de Petri; 34
- Figura 3.4 Plântula de *Armeria berlangensis* (lupa binocular com ampliação 32x) 34
- Figura 3.5 Infrutescência (a), flores (b), ovário não fecundado (lupa binocular com ampliação 32x) (c) e semente (lupa binocular com ampliação 32x) (d) de *Armeria berlangensis*. 35
- Figura 4.1 Valores percentuais das Taxas de Viabilidade (verde) e Taxas de Inviabilidade (cinzento) para os vários processos de desinfeção de *Pulicaria microcephala*. 42
- Figura 4.2 Aspeto esperado para três explantes de *Pulicaria microcephala* em cultura *in vitro* em meio M.S.1 durante 1 mês (a) e dois meses (b); Aspeto esperado para três explantes de *Pulicaria microcephala* em cultura *in vitro* em meio M.S.1 suplementado com hormonas de crescimento, durante 1 mês (a) e dois meses (b); Aspeto vidrado (e1) e morfologia em roseta (e2) que certos explantes de *Pulicaria microcephala* apresentavam quando o meio de cultura não era o ideal para o seu desenvolvimento (M.S.1 com Hormonas de crescimento); Formação de *Callus* de *Pulicaria microcephala* em pormenor (f); Detalhe das flores de *Pulicaria microcephala* (g). 44
- Figura 4.3 Valores percentuais das Taxas de Viabilidade (cor verde) e Taxas de Inviabilidade (cor cinza) para os vários valores de Luminosidade (LUX) aplicados durante a aclimatização de *Pulicaria microcephala*. 45

Figura 4.4 exemplos de alturas finais dos exemplares de *Pulicaria microcephala* aclimatizados a 5640 (a) e 5790 LUX (b), e aclimatizados ao ar livre (Luz natural) (c) Imagens ilustrativas. 46

Figura 5.1 Valores percentuais das Taxas de Viabilidade (cor verde) e Taxas de Inviabilidade (cor cinza) para os vários processos de desinfecção aplicados a diversos explantes caulinares de *Armeria berlengensis*. Características dos processos nos materiais e metodologias. 52

Figura 5.2 Taxas de Viabilidade (cor verde) e Taxas de Inviabilidade (cor cinza) para os vários processos de desinfecção aplicados a folhas inteiras de *Armeria berlengensis*. Características dos processos nos materiais e metodologias. 53

Figura 5.3 Taxas de viabilidade de indução de *calli* em folhas com e sem bainha de *Armeria berlengensis* submetidas a desinfecção pelos processos designados por 1, 2 e 3; Características dos processos nos materiais e metodologias. 55

Figura 5.4 Taxas de indução de *calli* apresentadas pelas folhas e fragmentos foliares de *Armeria berlengensis* submetidos a um ensaio de indução de indiferenciação celular com a utilização do meio de cultura MS.3; Análise da taxa de indução em relação à orientação da folha (direita ou invertida), o estado da folha (saudável ou necrosa), existência de bainha (presença ou ausência) e à existência de cortes na folha (presença ou ausência) 57

Figura 5.5 Exemplo das plantas da espécie *Armeria berlengensis* designadas por grandes (a) e por pequenas (b). 59

Figura 5.6 Valores percentuais das taxas de viabilidade do processo de aclimatização de *Armeria berlengensis* a condições *ex vitro*. 59

Figura 6.1 Taxas de Viabilidade (cor verde) e Taxas de Inviabilidade (cor cinza) para os vários processos de desinfecção aplicados a diversos exemplares de *Herniaria berlengiana*. Características dos processos nos materiais e metodologias, Tabela 5.I. 65

Figura.7.1 Valores Percentuais da quantidade de Terra Fina (cor verde) e de Terra Grosseira (cor cinza) que cada amostra, A a L. 76

Figura 7.2 Valores percentuais da quantidade de matéria orgânica existente em cada uma das amostras, A - L. 78

Figura 7.3 amostras de solo misturadas com a quantidade de água necessária para as análises de pH 79

Figura 7.4 Valor médio do tamanho do ramo de maior comprimento de *Pulicaria microcephala* submetida a diferentes combinações de valores de pH 5 (cor verde) e pH6 (cor cinza) com valores de Salinidade de 0,0; 2,5; 5,0 e 10ppm. \*Diferenças estatisticamente significativas com a combinação pH5 e Salinidade 0,00ppm (ANOVA, comparações de *Pairwise*, *p-value* < 0,05; Valores apresentados na forma média ± desvio-padrão. 83

## Índice de Tabelas

Tabela 3-I Agentes de desinfecção utilizados em cada um dos processos de desinfecção dos frutos de <i>P. microcephala</i> , com indicação dos tempos de contacto e concentração do agente de desinfecção.	25
Tabela 3-II - Agentes de desinfecção utilizados em cada um dos processos realizados para desinfetar sementes de <i>Armeria berlangensis</i> , por ordem de utilização e com os tempos de contacto e respetivas concentrações.	26
Tabela 3-III Dados totais numéricos, médias e desvios padrão da recuperação de sementes de <i>Armeria berlangensis</i> , nomeadamente o número de infrutescências totais estudadas, flores e número de sementes obtidas.	31
Tabela 3-IV Dados percentuais das taxas de fecundação de <i>Armeria berlangensis</i> , no total e das taxas de fecundação, flores vazias, observação de ovários e flores deterioradas de 19 infrutescências estudadas em pormenor.	32
Tabela 4-I - Agentes de desinfecção utilizados em <i>P. microcephala</i> , com indicação dos tempos de imersão em cada uma das soluções e respetivas concentrações.	40
Tabela 4-II Designação e especificação dos teores de auxinas e de cinetina que foram adicionadas ao meio de cultura MS.1 para se estudar a sua influência sobre <i>Pulicaria microcephala</i> .	41
Tabela 5-I Agentes de desinfecção utilizados nos processos de desinfecção de <i>Armeria berlangensis</i> , com indicação dos tempos de imersão e concentrações.	50
Tabela 6-I Desinfetantes utilizados em cada um dos processos com as suas respetivas concentrações, por ordem de utilização e tempos de exposição do material vegetal.	64
Tabela 7-I Código atribuído a cada uma das amostras de solo recolhido com a indicação do tipo de vegetação predominante e também alguma indicação geográfica e observações feitas no local.	72
Tabela 7-II Método para determinação da textura pelo tato pelas características apresentadas (adaptado de Ribeiro <i>et al.</i> , 2013 e Cooper, 2015)	73
Tabela 7-III Classificação de amostras de terra com base no teor em percentagem de matéria orgânica e na textura de campo (adaptado de Ribeiro <i>et al.</i> , 2013)	74
Tabela 7-IV Valor médio de pH e de salinidade (ppm) e os desvios-padrão de cada amostra, A a L. Para as amostras G e I não foi possível determinar o valor de salinidade.	80





## Lista de Abreviaturas

°C – graus Celsius

Min - minuto

MS – Meio de Cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)

NAA – ácido 1-naftalenoacético

IAA – ácido Indole-3-acético

IBA – ácido Indole-3-butírico

KIN – Cinetina

MV – Multiplicação vegetativa – Clones da espécie *Pulicaria microcephala* que provêm de explantes desinfetados, adaptados a condições *in vitro* e micropropagados com sucesso

N – Número de amostras

PGS – Primeira geração de Semente - Plantas da espécie *Pulicaria microcephala* que provêm de plantas que se desenvolveram de sementes germinadas após os ensaios de germinação

2-4D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2-iP - N6-(Delta 2-Isopentenil)-Adenina



---

# 1 Introdução Geral



## 1.1 Reserva Natural das Berlengas

O arquipélago das Berlengas é um conjunto de pequenas ilhas que se localiza a cerca de 10 quilómetros do litoral atlântico português, ao largo de Peniche. É constituída pela ilha da Berlenga, as Estelas, pelos ilhéus principais Farilhões e Forçadas, bem como diversos ilhéus mais pequenos. A ilha da Berlenga tem uma área de aproximadamente 79 hectares (ha) e é caracterizada por encostas escarpadas e uma zona de planalto central (Lecoq, 2010; ICNF, 2019) maioritariamente constituída por uma rocha magmática, o granito vermelho. O clima é temperado marítimo, caracterizado por verões frescos, onde a temperatura média não ascende aos 32°C e não baixa dos 20°C, os invernos são tédidos com a temperatura entre os 0°C e os 10°C. Nevoeiro e vento são condições climáticas frequentes e os ventos são geralmente de norte na primavera e no verão, sendo de sudoeste e oeste no outono e inverno. A chuva é frequente no inverno dando depois lugar a períodos de aridez (Amado *et al.*, 2007; Câmara Municipal de Peniche, 2008; Nascimento, 2016).

Em dezembro de 1998, a ilha da Berlenga, os seus ilhéus e área marítima circundante com cerca de 9456 ha foram classificados como áreas protegidas, constituindo a Reserva Natural das Berlengas. Este estatuto visa proteger estas áreas, dos efeitos do turismo de massas, protegendo as espécies de fauna e flora que aqui se encontram e para as quais este habitat é um ponto chave (Nascimento, 2016).

O aumento da afluência de turistas à Reserva constitui um dos maiores problemas que o Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF) se depara neste arquipélago, já que apesar de todas as políticas restritivas aplicadas, é necessária vigilância, pois muitos visitantes não cumprem as regras estabelecidas. Em certas zonas da ilha é notória a presença de trilho não reconhecidos pela Reserva, devidos à passagem diária e indevida por parte de visitantes. Este comportamento é especialmente prejudicial para duas espécies endémicas deste arquipélago, a *Armeria berlengensis* e *Herniaria berlengiana*, que, e em especial a última, se encontram em zonas com reduzido coberto vegetal, perto dos trilhos pré-existentes e em locais facilmente acessíveis aos visitantes. Este tipo de comportamento não é, no entanto, o único problema que as espécies de flora endémica da Berlenga têm de enfrentar e que as coloca em risco de extinção (Amaro, 2015; Santos, 2015; ICNF, 2019; SPEA, 2019). Revela-se ainda um fator crucial o combate às espécies invasoras introduzidas intencionalmente na ilha, como o *Carpobrotus edulis*, que serviria para segurar as arribas, ou o *Oryctolagus cuniculos* (coelho bravo) que ao proliferar livremente na ilha, sem predadores, poderia ser alvo de caça e fonte de alimentação para quem ali vivia. Outras ameaças não

intencionais mas também consequência direta da atividade humana, são a presença da espécie *Rattus rattus* (rato preto), introduzida por embarcações ou a população de *Larus michaellis* (gaivota-de-patas-amarelas), cuja presença em números elevados se deve principalmente à proximidade de lixeiras a céu aberto, e consequente disponibilidade de alimento (Morais *et al.*, 1998; Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004; Nascimento, 2018; ICNF, 2019; SPEA, 2019a).

## 1.2 Caso de Estudo: *Pulicaria microcephala*

A *Pulicaria microcephala* (Lange, 1883) faz parte da família Asteraceae (Hassler, 2019). O género *Pulicaria* é um dos 3 maiores dentro da tribo Inuleae (Pereira Coutinho e Dinis, 2009; Turland *et al.*, 2018), no qual se inserem cerca de 80 espécies com distribuição entre a Europa, Norte de África e Ásia. Este grupo taxonómico apresenta várias dúvidas a nível de nomenclatura, já que é um táxon parafilético (inclui um grupo de descendentes de um único ancestral comum), mas não todas as espécies (Hörandl e Stuessy, 2010), como demonstram estudos em sistemática filogenética (Anderberg *et al.*, 2005; Francisco-Ortega *et al.*, 2001; e Pereira Coutinho e Dinis, 2009). Apesar de ser um dos endemismos da ilha das Berlengas mais abundantes, está indicada como estando em estado vulnerável, segundo os critérios da IUCN (Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004)

De realçar que estas dúvidas a nível da nomenclatura são importantes, e que ainda não existe consenso na classificação atribuída à espécie de *Pulicaria*, endémica da ilha das Berlengas, a *Pulicaria microcephala* (Almada *et al.*, 1995). Almada e os colaboradores (1995), afirmam que seria importante averiguar geneticamente, se realmente as diferenças morfológicas encontradas nos seus estudos são ecotípicas, fixas geneticamente (Quinn, 1978; Lowry, 2012), ou se são reversíveis (ecofénon), consequência do habitat (Almada *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 2012). No entanto, afirmam que com base nas medições realizadas e nos resultados obtidos, principalmente para os parâmetros que dizem respeito às estruturas reprodutoras, a *P. microcephala* e *P. papulosa* são de facto duas espécies distintas, como afirmado por Lange em 1883. Pelo estudo da viabilidade do pólen do género *Pulicaria*, Pereira Coutinho e Dinis (2009), sustentam também a existência da *Pulicaria microcephala* como uma espécie independente.

Almada e colaboradores (1995), definiram a descrição mais completa desta espécie endémica das Berlengas. São plantas que podem adquirir até 40 cm de altura, densamente ramificadas e folhosas, desde a base com forma pulvinar e folhas sensíveis, pedúnculos floríferos curtos (3 a 47mm) com 1 a 3 brácteas. Podem ter até 200 capítulos com involúcros de 5 a 9,4 mm,

línulas amarelas com comprimento superior ao do invólucro, entre 1,6 a 2,6mm, sendo este último multisseriado. São planta bastante aromáticas e que apresentam floração de junho a agosto (Flora-on, 2019a). A espécie é terófito, apresentando um ciclo anual em que a fase de dormência é sob a forma de semente, debaixo de terra, e as gemas de renova provêm da germinação das sementes. Esta espécie tem uma distribuição geográfica bastante reduzida, encontra-se em zonas rochosas e de encostas, nas ilhas das Berlengas, nomeadamente na ilha velha (Almada *et al.*, 1995; Daveau, 1883). É comum em clareiras e nas arribas, nomeadamente na zona de planalto, principalmente perto da zona militar da ilha da Berlenga (Flora-on, 2019a).

### 1.3 Caso de Estudo: *Armeria berlengensis*

A espécie *Armeria berlengensis* Daveau (1884) faz também parte de uma família difícil de classificar, já que é apontada como modelo ideal para estudo do processo de hibridação, por este ocorrer frequentemente na família Plumbaginaceae (Castroviejo *et al.*, 1990; Flora-on, 2019b). Esta espécie encontra-se na *Red list* como estando criticamente ameaçada CR B2ab (i, ii, iii, v) (Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004; Caldas, 2011a). O seu nome comum é Arméria das Berlengas (Berlengas, 2019).

Esta espécie lenhosa é caracterizada como sendo um subarbusto caméfito (plantas herbáceas perenes com as gemas de renovo sob o solo) em forma de coxim que pode alcançar os 40cm de altura, as suas flores podem apresentar tonalidades entre o branco e o rosa, organizadas em inflorescências com numerosas flores. Além da variação de cor nas flores é possível também observar que existem duas subespécies diferentes, a *Armeria berlengensis* subsp. *villosa* que apresenta as suas folhas com vilosidades, aparentando um aspeto aveludado, e a *Armeria berlengensis* subsp. *glabra*, que não apresenta essas vilosidades e por isso tem um aspeto brilhante (Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004; ICN, 2006; Caldas, 2011a; Berlengas, 2019; ICNF, 2019; SPEA, 2019).

A área de distribuição, apesar de não ser grande a nível de cobertura, ocorre um pouco por toda a ilha das Berlengas, bem como nas Estelas e nos Farilhões. Anteriormente, existia um local onde esta espécie era muito abundante, conhecido como o Vale das Armérias, no entanto, tem-se assistido ao declínio da população dessa área. A zona tem algum substrato, e existem muitos coelhos e gaivotas, que contribuem para o declínio desta espécie vegetal mesmo nos locais de maior abundância (Castroviejo *et al.*, 1990; Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004; ICN, 2006; Caldas, 2011a; Berlengas, 2019; ICNF, 2019; SPEA, 2019c;). É mais encontrada em zonas de ravina, afloramentos rochosos, cascalheiras consolidadas e zonas

com pouca acumulação de solo e particularmente viradas a norte e sujeitas à salsugem (Berlengas, 2019).

A floração desta espécie é apontada para junho e julho (Flora on2) no entanto é possível observar indivíduos em floração durante todo o ano (observação pessoal).

#### **1.4 Caso de Estudo: *Herniaria berlingiana***

A *Herniaria berlingiana* (Chaudhri) Franco (Chaudhri, 1968; Amaral-Franco, 1971) faz parte da família Caryophyllaceae e é também designada por outros autores como *Herniaria lusitanica* Chaudhri ssp. *berlingiana* Chaudhri (Chaudhri, 1968; Castroviejo *et al.*, 1990). Vulgarmente é conhecida por erva-turca-das-berlengas (Espírito Santo *et al.*, 2012). É uma espécie endémica do Arquipélago das Berlengas, sendo possível observá-la na ilha Berlenga, nos Farilhões e no ilhéu da Inês (Castroviejo *et al.*, 1990; Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004; Caldas, 2011b).

É das três espécies em estudo a que possui a menor área de dispersão e o menor porte. A área geográfica de alcance é de 0,89m<sup>2</sup>, que é traduzido numa área de ocupação de 3km<sup>2</sup> (Comission of the European Communities, 2009 *in* Caldas, 2011b). Esta espécie é caracterizada como bienal ou perene, com folha carnuda, floração em junho e julho, nitrófila e nunca ocorre em densidades populacionais para se considerar abundante. É uma espécie adaptada a solos esqueléticos, caracterizados por pouca acumulação de solo ou este é muito compacto, onde se desenvolve em roseta e mantém o porte pequeno. Este tipo de solos é mais frequente na Berlenga em fendas no granito e nos trilhos pedonais, o que se torna também uma desvantagem, visto que, os trilhos são limpos de forma não seletiva e o chorão (*Carpobrotus edulis*) se expande e cobre os trilhos e as zonas de fendas graníticas (Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004; Caldas, 2011b).

Normalmente a *H. berlingiana* só é encontrada em zonas onde a vegetação não é abundante à semelhança do que se observa com a espécie *Herniaria glabra*, a espécie do mesmo género que é possível observar em diversas zonas de Peniche.

Devido às ameaças provocadas pelo Homem e o facto de não ser muito abundante esta espécie, *H. berlingiana*, está protegida a nível europeu pela Diretiva Habitats (92/43/CEE), tendo sido transposta para a lei portuguesa (Decreto-Lei nº140/99 de 24 de abril, republicado pelo Decreto-Lei nº 49/2005 de 24 de fevereiro – Anexos B-II e B-IV , sendo caracterizada como Vulnerável VU D2 (Ramos Lopes e Carvalho, 1990; Walter e Gillet, (eds.) 1997;



Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004) ou Em Risco EN (Caldas, 2011b), sendo por isso necessário realizar esforços adicionais para a sua conservação.

### **1.5 Ações de melhoramento – Projeto Life+Berlengas**

A tendência para a extinção de espécies vegetais numa ilha é bastante conhecida e estudada. Esta suscetibilidade parece ser consequência das condições específicas do *habitat* ser uma ilha. O isolamento leva a populações com um número reduzido de indivíduos e frequentemente a fenómenos de especiação (Piñeiro *et al.*, 2009). Este isolamento apenas é quebrado pelas aves e pela possibilidade de existirem embarcações a atracar ou alguma semente mais resistente ser arrastada pelas correntes marítimas. Quanto menor o número de espécimes menor será a variabilidade genética, o que aliado a fenómenos de especiação, torna impossível o repovoamento com outra população mais saudável, e consequentemente a extinção torna-se um perigo iminente. Agravando este cenário, encontra-se a introdução de espécies exóticas por parte do Homem e a destruição de *habitat* que estas espécies causam. (Piñeiro *et al.*, 2009)

Este trabalho é parte integrante de um projeto cofinanciado pela Comissão Europeia ao abrigo do programa LIFE+ de conservação que decorreu no arquipélago das Berlengas de 1 de junho de 2014 até 30 de setembro de 2018. O Projeto LIFE+Berlengas foi coordenado pela SPEA, Sociedade Portuguesa para o Estudo das Aves e contou com a parceria do Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, da Câmara Municipal de Peniche e da Faculdade de Ciências Sociais e Humanas da Universidade Nova de Lisboa, tendo ainda a Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria como observador externo (SPEA, 2019a).

O projeto LIFE+Berlengas visou contribuir para uma gestão sustentável da Zona de Proteção Especial das Berlengas, conservando os habitats, populações de aves marinhas nidificantes nesta região e os endemismos. Pretendia também atuar a nível da erradicação ou pelo menos minimização das principais ameaças que afetam as condições naturais do arquipélago, promovendo também a utilização sustentável dos recursos e focando os esforços nas três principais ameaças: pesca, atividades criativas e turismo (Berlengas, 2019).

Um dos objetivos do programa de conservação da ilha da Berlenga, mais intimamente ligado a este presente trabalho é evitar a contaminação genética das espécies endémicas por parte das que têm o *genus* mais próximo (nomeadamente da costa de Peniche). Mantendo em mente que a entidade gestora da Reserva Natural da Berlenga pretende multiplicar estas

espécies em viveiro, será vantajoso também estabelecer formas e metodologias de micropropagação estas espécies em laboratório, para aumentar o número de exemplares para repovoamento. Atualmente quase toda a flora endémica se encontra em perigo devido à presença de *Carpobrotus edulis*, já que este compete pelo espaço e pelos nutrientes e tem um crescimento rápido e um porte maior do que a maioria das espécies de plantas que existem na Berlenga (Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004). Para preservar a flora nativa, é necessário antes de mais conhecer a sua distribuição, padrões e crescimento e se as espécies se encontram geneticamente contaminadas. Pode ser importante no caso de uma população isolada, saber se se trata de um espécime híbrido e eventualmente estéril, evitando neste caso que este seja multiplicado. Esta informação é importante para a conservação da flora da ilha da Berlenga para que nenhum esforço seja desperdiçado numa variante não fértil e que nenhum DNA externo contamine a população endémica (Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004).

Uma questão importante, quando se efetua um trabalho de conservação, é se a rara distribuição das plantas é paralela a baixos níveis de diversidade genética (Piñero *et al.*, 2009) e se existe um efeito barreira pelo oceano ou se as aves marítimas, como a gaivota de patas amarelas (*Larus michahelis*), atuam como difusoras de sementes e pólen (Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004, Nieto, 2014). Isto é ponderado para a ilha da Berlenga, uma vez que esta ave viaja diariamente entre Peniche e Berlenga, nidificando em cima de alguns exemplares de *Armeria* (Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004). Logo, é possível que ocorra hibridação entre espécies da ilha da Berlenga e as espécies da costa de Peniche. O mesmo poderá acontecer para as outras duas espécies em estudo, a *Pulicaria microcephala* e *Herniaria berlengiana*

É muito comum, nas plantas, que espécies do mesmo género não sejam totalmente isoladas reprodutivamente, e estas quando os seus raios geográficos se sobrepõem, hibridam, sendo que um elevado número de parâmetros pode influenciar este fenómeno (Piñero *et al.*, 2011; Tauleigne-Gomes e Lefèbvre, 2005; Tauleigne-Gomes e Lefèbvre, 2008). A hibridização é uma componente fundamental da evolução das plantas vasculares como estimado por número de cromossomas e normalmente identificado em *Armeria* (Castroviejo *et al.*, 1990; Nieto *et al.*, 2002). Se a hibridação é frequente e não resultar em espécimes não adaptados, pode ter um papel importante na especiação e evolução (Nieto *et al.*, 2002).

## **1.6 Micropropagação e germinação de sementes**

Os métodos de micropropagação têm vindo a tornar-se importantes economicamente, como técnicas que permitem a rápida multiplicação de clones selecionados, garantindo o acesso a material vegetal livre de doenças em números elevados e num curto espaço de tempo. Os

métodos economicamente aceitáveis para a micropropagação de plantas superiores são baseados na capacidade de totipotência e diferenciação celular, permitindo que os explantes quebrem os fenómenos de dominância apical, originando o desenvolvimento de rebentos axilares, os quais são divididos, de modo a obter um número elevado de novos rebentos, que são depois enraizados, aclimatizados e estabelecidos no solo (Doods e Roberts, 1985; Eddo, 1993; Neves, 2000; Lucas *et al.*, 2007). A cultura de tecidos *in vitro* consiste no cultivo de tecidos ou órgãos vegetais (explantes) num meio de cultura definido, sob condições ambientais e assépticas controladas (IAPTC, 1985).

Estas ferramentas de obtenção de novos indivíduos de forma mais rápida e isenta de patologias (Doods e Roberts, 1985; Neves, 2000) são muitas vezes a resposta para espécies vegetais em vias de extinção, apesar do risco associado à geração de clones e à sua implementação em condições naturais. Assim, torna-se necessário que os clones sejam obtidos a partir do maior número possível de plantas-mãe (a origem do material vegetal, em muitos casos de conservação, são plantas em que o estado fitossanitário não é o ideal e que provavelmente irão ser mais difíceis de implementar em condições de assepsia (Deberg e Maene, 1981)). Quanto maior a variabilidade genética que se permitir a espécie manter após a intervenção, melhor. Não valerá a pena introduzir na ilha 100 plantas provenientes de uma só planta-mãe, já que terá a mesma informação genética e se por alguma razão surgir uma mudança no habitat para a qual esta está menos adaptada, todo o esforço de repovoamento terá sido em vão.

Para que se consiga realizar a micropropagação é necessário cumprir as fases de Cultura *in vitro*, sendo elas 4 (Deberg e Maene, 1981). A Fase 0 consiste na preparação das plantas mãe, escolhendo as plantas que apresentem um melhor aspeto e que não aparentem conter agentes patogénicos, já que estas provavelmente irão apresentar um estado fitossanitário superior. A fase seguinte, a fase 1, é a implementação dos tecidos em condições de assepsia e o seu estabelecimento no meio de cultura, normalmente sendo considerado a porção de tecido escolhido, um explante, e sendo constituído muitas vezes por pelo menos um gomo axilar ou apical. A Fase 2 é a multiplicação *in vitro* propriamente dita do material vegetal, pela proliferação do material vegetal corretamente implementado, mantendo plantas em cultura pelo corte sucessivo de porções com pelo menos um gomo axilar ou apical e esperando que ocorra a fase 3 (dividida de duas partes, consiste no alongamento dos explantes e na indução da rizogénese (enraizamento) para que já não seja um explante mas sim um planta totalmente formada, um clone da planta-mãe) para que se possa novamente cortar e manter o ciclo de divisão até se obter um *stock* que permita manter a multiplicação e passar algumas das

plantas para a fase 4. Esta última fase é a aclimatização a condições *ex vitro*, sendo fundamental que as plantas se adaptem de forma gradual às condições ambientais, já que enquanto em condições *in vitro* estas permanecem em condições heterotróficas, recorrendo quase exclusivamente ao meio de cultura como fonte de carbono e energia e ao passar para *ex vitro* passam para condições autotróficas (Hartman *et al.*, 1990).

Existe ainda a possibilidade de realizar a cultura *in vitro*, não a partir de explantes primários como folhas ou caules, mas sim de sementes, iniciando-se na mesma com a implementação do material vegetal em condições de assepsia, mas com a desinfeção realizada em sementes. As sementes são colocadas em meio de cultura e após a germinação pode-se realizar as fases 2, 3 e 4 da forma usual. Este método além de permitir que a desinfeção seja mais agressiva e, à partida, mais eficaz, com uma taxa de sucesso superior, permite também iniciar o processo de micropropagação com uma maior taxa de variabilidade genética e/ou estado de maturação semelhante (Sakhanokho *et al.*, 2001).

## 1.7 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é o estabelecimento de protocolos que permitam a multiplicação das três espécies endémicas da ilha da Berlenga, a *Pulicaria microcephala*, a *Armeria berlegensis* e a *Herniaria berlegiana*. Este trabalho faz parte integrante do projeto LIFE+Berlengas.

Para cumprir o objetivo da multiplicação é necessário estabelecer tarefas e metas a alcançar, com vista a entender o que será necessário e otimizar procedimentos para um futuro projeto de repovoamento.

Os objetivos complementares passam pelo estabelecimento de um protocolo de desinfeção dos diversos explantes recolhidos na ilha, para as 3 espécies em estudo. Nos casos concretos de *Pulicaria microcephala* e *Armeria berlegensis* procurou-se estabelecer um protocolo de desinfeção de sementes, avaliando as taxas de germinação associadas, assim como avaliar as taxas de enraizamento e de sobrevivência, e quais as condições de aclimatização ideais. Adicionalmente, procurou-se determinar qual o melhor processo para obtenção de novo material genético entre os três estudados: desinfeção de explantes caulinares, desinfeção de explantes foliares e indução de *calli* ou desinfeção e germinação de sementes. No caso concreto da *Pulicaria microcephala*, o objetivo passou pela avaliação de qual a melhor composição do meio de cultura e as condições ideais para a multiplicação e micropropagação, no que diz respeito a valores de luminosidade, temperatura, meio de cultura, pH e salinidade.

Procurou-se ainda estudar o efeito de diferentes combinações e concentrações de hormonas de crescimento, no crescimento, alongamento e aspeto morfológico. Em *Armeria berlengensis*, procurou-se, ainda, avaliar a taxa de esterilidade e de fertilização das flores e avaliar as taxas de germinação de sementes e eficácia dos processos de desinfeção das mesmas. Foi ainda possível analisar os solos da ilha, para melhor tentar simular as condições de habitat aquando da aclimatização *ex vitro*.



---

## **2 Materiais e Metodologia Geral**





## **2.1 Preparação de Meios de Cultura**

### **2.1.1 MS.1**

Meio de Murashige & Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com vitaminas Gamborg B5 (formulação em anexo) e com 30g/L de sacarose. O valor do pH foi acertado a 5.7, sendo posteriormente adicionado fitoagar a uma concentração de 6g/L. Após a dissolução do fitoagar por aquecimento, o meio foi dispensado em frasco de vidro e sujeito a autoclavagem a 121°C durante 20min.

### **2.1.2 MS.2**

O Meio MS.2 é o meio MS suplementado com Vitaminas Gamborg B5, e com 30g/L de sacarose. O valor de pH foi ajustado a 5.7. Após o acerto do pH é adicionada o fitoagar a uma concentração de 10g/L. O meio depois de autoclavado a 121°C durante 20min é dispensado em placas de Petri de 90mm.

### **2.1.3 MS.3**

O Meio MS.3 é o meio MS suplementado com vitaminas Gamborg B5 ao qual foram adicionadas duas hormonas de crescimento, 2,4-D a 5,37µM e NAA a 2,69µM, para induzir a desdiferenciação celular, e logo o desenvolvimento de *callus*. O meio foi também suplementado com 30g/L de sacarose e o pH acertado a 5.7 sendo depois adicionado fitoagar a uma de concentração 10g/L. Este meio foi autoclavado durante 20min a 121°C e de seguida distribuído em placas de Petri de 90mm.

### **2.1.4 MS.4**

O Meio MS.4 é o meio MS suplementado com vitaminas Gamborg B5 e MES (Formulação em anexo), sem a adição de hormonas de crescimento. O meio de cultura é preparado com 30g/L de sacarose e depois é acertado o seu pH a um valor de 5 ou 6, consoante o pretendido. Após o acerto do pH é adicionado o fitoagar a uma concentração de 10g/L. O meio é dispensado em frascos de vidro de cultura e depois autoclavado a 121°C durante 20min.

## **2.2 Recolha de explantes**

Os explantes foram recolhidos com o auxílio de uma tesoura, tendo sido recolhidos em média, 3 ramos por planta, os quais foram colocados em frasco de amostragem. Os rebentos foram constituídos por pelo menos o gomo apical e algumas folhas como se pode observar na Figura

2.1. Os explantes foram armazenados a 4°C, por um período máximo 24 horas. Nas semanas antecedentes às recolhas não se registou pluviosidade na área de recolha, e por isso o teor de humidade a que as plantas estiveram sujeitas foi baixo.

### 2.3 Desinfeção e estabelecimento *in vitro*

Para iniciar a desinfeção, os explantes foram lavados em água corrente, para remover as impurezas, sem danificar os tecidos. Os raminhos foram separados aleatoriamente em grupos consoante o processo de desinfeção a realizar em cada ensaio. Após a desinfeção, os explantes foram colocados em frascos de cultura de vidro com 30 ml de meio MS.1 (Figura 2.1).

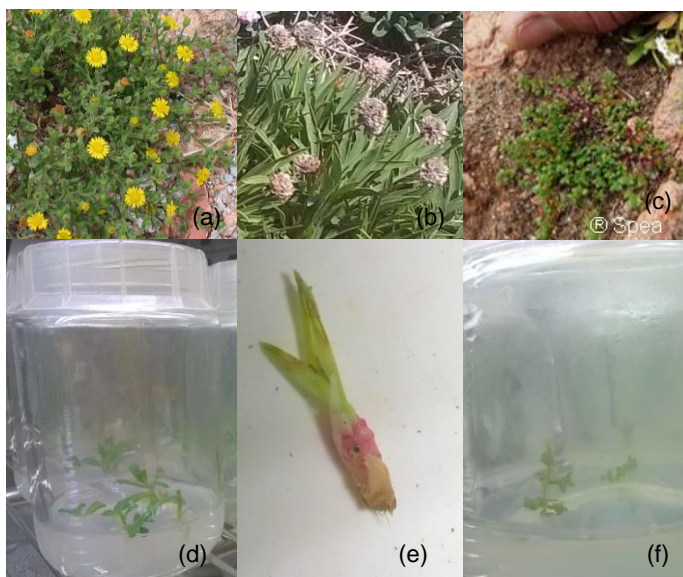


Figura 2.1 Plantas adultas de *Pulicaria microcephala* (a), *Armeria berlengensis* (b) e *Herniaria berlengiana* (c) e respetivos explantes (d, e, f)

### 2.4 Condições de cultura *in vitro*

Os frascos de cultura, os tubos e as placas de Petri foram mantidos em câmaras de crescimento a uma temperatura controlada de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  com um fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, uma intensidade luminosa de aproximadamente 4000 Lux com lâmpadas de luz fria e uma humidade de 60% ou numa sala de temperatura e humidade controlada nas mesmas condições.

As plantas sujeitas a micropropagação foram sempre sub-cultivadas em intervalos de 4 semanas. Aquando das subculturas de *Pulicaria microcephala* e de *Herniaria berlengiana* foram cortadas porções com pelo menos 2 centímetros de altura, sem ramificações e com pelo menos um gomo axilar, podendo ou não conter o gomo apical. A micropropagação de *Armeria berlengensis* foi feita pela remoção dos rebentos laterais.

A lista de reagentes e equipamentos e respetivas especificações técnicas encontra-se em anexo (Anexo III).



Figura 2.2 Demonstração das intensidades luminosas observadas durante o processo de aclimatização para estudo do impacto da luz com diferentes intensidades luminosas (Lux ): 3650 Lux (a), 5640 Lux (b), 5790 Lux (c), intensidade luminosa não controlada (d); fotos do estado inicial das plantas antes de se iniciar o processo de aclimatização ((a), (b), (c), (d)) foto do estado de desenvolvimento após um mês de aclimatização no exterior, sem intensidade luminosa e parâmetros de temperatura controlados.

## 2.5 Aclimatização a condições *ex vitro*

A aclimatização foi feita com recurso a vasos/floreiras com uma mistura de 1:5 de perlite: terra de jardinagem. Esta mistura foi regada com solução de fertilizante comercial na concentração recomendada pelo fabricante. Após a seleção das plantas que iriam ser aclimatizadas, feita de forma aleatória, os rebentos foram retirados dos frascos de cultivo e o meio foi removido cuidadosamente com água destilada, procurando não danificar as raízes. Os rebentos foram colocados na terra e os recipientes foram cobertos com filme de plástico e vedados com fita-cola. Este procedimento visa manter a humidade no interior dos recipientes a níveis de saturação semelhantes aos existentes dentro dos frascos de cultura *in vitro*.

Após 4 semanas, durante as quais as plantas foram regadas com solução nutritiva, iniciou-se a perfuração dos plásticos utilizados para tapar as floreiras. Durante as 6 semanas seguintes foram gradualmente feitos furos e golpes no plástico, visando a diminuição da humidade nas floreiras, permitindo a emissão de novas folhas e a sobrevivência das plantas em condições *ex vitro* (Figura 2.2).

## 2.6 Análise estatística

Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no programa IBM SPSS Statistics 24 (IBM Corporation, Nova Iorque, Estados Unidos da América). O nível de significância foi estipulado como sendo  $\alpha = 0,05$ . Os dados foram analisados relativamente à sua distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Se esses pressupostos se

cumprissem, realizaram-se testes paramétricos, caso contrário, usaram-se testes não paramétricos correspondentes (Zar, 2009). Foram realizados testes estatísticos de Tabelas cruzadas nos quais foi tido em linha de conta o teste de Qui-quadrado de Pearson quando o pressuposto a) não é quebrado e menos de 20% das células esperavam uma contagem menor que 5 e o teste exato de Fisher quando este pressuposto é violado, nomeadamente pelo tamanho da amostra ser pequena. Foram realizados testes estatísticos de Tabelas cruzadas (Qui-quadrado de Pearson) e correlações não paramétricas (correlação de Spearman) quando não se conseguia retirar conclusões com o primeiro teste. Para todos os ensaios realizados, apenas apresentados os resultados dessas avaliações quando foi possível a sua realização. Para o ensaio de influência das hormonas de crescimento sobre o desenvolvimento de *Pulicaria microcephala* (capítulo 4) foram aplicadas análises de variância (Anova) a 1 fator, sendo este a conjugação de hormonas utilizada. Para o ensaio de influência do valor de pH e da concentração de NaCl no meio de cultura para micropropagação multiplicação e crescimento de *Pulicaria microcephala* foi realizada uma análise de variância a 2 fatores (valor de pH e concentração de NaCl).

## 2.7 Local de recolha dos explantes

As recolhas do material vegetal utilizados nos diferentes procedimentos deste trabalho foram realizadas na ilha da Berlenga, e na Ilha Velha (Figura 2.3).



Figura 2.3 Mapa da zona de recolha do material biológico vegetal, explantes e infrutescências, de cada um dos casos de estudo: *Pulicaria microcephala*, *Armeria berlengensis* e *Herniaria berlengiana*. Adaptado do INCF (ICNF, 2019).

## 2.8 Local de recolha das amostras de solo

A recolha de amostras de terra foi realizada que na Berlenga quer na Ilha Velha. Os locais foram escolhidos com base no tipo de vegetação e no tipo de inclinação do terreno (Figura 2.4).



— Caminho pavimentado  
 - - - Terra batida  
 — Linha de água  
 ■ R.N. das Berlengas

1 Farol das Berlengas  
 2 Forte de São João Baptista  
 3 Buzinas

- |   |  |   |
|---|--|---|
| <b>A</b> Vale das Armérias – sem armérias       | <b>E</b> Clareira                            | <b>I</b> Miradouro do Melreu                  |
| <b>B</b> Vale dos Fetos                         | <b>F</b> Início do trilho das Buzinas        | <b>J</b> Trilho das Buzinas                   |
| <b>C</b> Remoção de <i>C. edulis</i> – 1 semana | <b>G</b> Planalto                            | <b>K</b> Cerro do Cão                         |
| <b>D</b> Vale das Armérias – com armérias       | <b>H</b> Remoção de <i>C. edulis</i> – 1 ano | <b>L</b> Remoção de <i>C. edulis</i> – 2 anos |

Figura 2.4 Mapa da zona de recolha das amostras de solo de diversas zonas de interesse das ilhas da Berlenga. Adaptado do INCF (ICNF, 2019).



---

### **3 Desinfecção e germinação de sementes**





### 3.1 Introdução

Nas espécies vegetais sem forma de propagação vegetativa natural, um dos principais problemas para a sobrevivência em meio natural, no seu habitat, é a limitada capacidade de regeneração da população por semente, temporal e espacialmente (Hölzel e Otte, 2004). Este é um dos fatores mais importantes para a diminuição da diversidade genética em comunidades de plantas e, em última análise pode levar à especiação. O fenómeno pode ser agravado se existir muito consumo ou danificação por parte de um agente externo, como um roedor a danificar as raízes ou a se alimentar da espécie vegetal, uma ave a fazer ninho sobre a planta ou efeitos antropogénicos como a desflorestação. A propagação por semente está muitas vezes predestinada a falhar, já que, apenas as melhores e mais resistentes conseguem germinar numa comunidade vegetativa bem estabelecida. (Grubb, 1977; Rusch e Fernández-Palacios, 1995; Kotorová e Lepš, 1999; Stampfli e Zeiter, 1999; Touzard *et al.*, 2002). Para combater este problema muitas espécies conseguiram adaptar-se para que as sementes produzidas tenham a capacidade de identificar as condições ideais para a sua germinação (Grime, 2001, Hölzel e Otte, 2004)

Os mecanismos de quebra de dormência das sementes, como a deteção de períodos de frio, ou calor, (estratificação) ou outros fatores ambientais como fogo, concentração de nitratos, entre outros ajudam as sementes a germinar a altura correta para a sua espécie, quando naquele local não ocorrer tanta competição e as condições são mais favoráveis ao desenvolvimento das plântulas. Sendo estes mecanismos identificados como de maior importância principalmente em zonas temperadas, como é o caso de Portugal, nomeadamente da Ilha das Berlengas (Thompson *et al.*, 1977; Grime *et al.*, 1981; Milberg, 1994; Schütz, 1997; Baskin e Baskin, 2001; Knödler, 2001; Jensen, 2001; Hroudová e Zákřavsky, 2003; Hölzel e Otte, 2004).

Entender o que desencadeia a germinação de sementes de uma espécie é uma das chaves para se entender o declínio, a persistência ou a capacidade invasora de uma determinada espécie (Schütz, 2000). Em projetos de conservação e de repovoamento as características de germinação também são particularmente relevantes. Quer seja para a libertação das sementes no habitat natural, quer seja para a sua germinação em laboratório, o sucesso dos procedimentos está dependente dos conhecimentos e da capacidade que se tem para criar as condições ótimas de cultivo, imitando o mais possível o modo como as sementes dessas espécies germinam (Bakker e Berendse 1999; Patzelt *et al.*, 2001).

Ensaio de germinação de espécies de plantas dos géneros *Pulicaria* e *Armeria* são relativamente raros. Dina Henriques e os seus colaboradores, em 2017 publicaram um trabalho onde realizavam germinação de *Armeria maderensis*, com diferentes processos de quebra de dormência das sementes, em terra. Outro trabalho com este género, mas com a espécie *Armeria caespitosa* realizou a germinação entre folhas de papel de filtro húmido (Giménez-Benavides *et al.*, 2005). Em 2010 Godefroid e colaboradores germinaram sementes de *Pulicaria vulgaris* em placas de Petri com uma solução de 1% de agar e anteriormente Evans e Etherington em 1990 germinaram em solo e em folhas de papel de filtro, sementes de *Pulicaria dysenterica*. Estas espécies são frequentemente germinadas em laboratório, mas com um objetivo de obter plantas para a realização de outros trabalhos e não estudar a sua germinação (Brewin *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho foi estudar a melhor forma de germinar sementes de *Pulicaria microcephala* e *Armeria berlengensis* com vista o repovoamento destas espécies na Ilha das Berlengas. Além disso pretendeu-se avaliar a taxa de fecundação de *A. berlengensis*, já que devido à possibilidade de hibridação (Tauleigne-Gomes e Lefèbvre, 2005) o seu declínio em número populacional (Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004), se poderá dever à escassa produção de sementes por parte da espécie.

## **3.2 Materiais e Metodologias**

### **3.2.1 Recolha e recuperação dos frutos de *Pulicaria microcephala***

Aquando da recolha de infrutescências de *Pulicaria microcephala*, foram cortadas várias porções vegetativas, provenientes de diferentes plantas-mãe e de seguida essas mesmas estruturas foram guardadas a 4°C. Para que se conseguisse separar os frutos das infrutescências, foi necessário libertar cuidadosamente os frutos dos cálices de forma manual e de seguida fazer a passagem por três crivos, um de 1mm, outro de 0.5mm e finalmente de 0.25mm. Apesar da crivagem, muitas pétalas não foram removidas com sucesso o que levou à desinfeção das mesmas juntamente com os frutos. No processo de colocação das sementes no meio de cultura foi necessário realizar uma seleção dos frutos e separação das pétalas (adaptado de Terry e Sutcliffe, 2014).

### **3.2.2 Desinfeção dos frutos de *Pulicaria microcephala***

Para desinfetar dos frutos de *P. microcephala* foram testados 7 processos diferentes, os quais se encontram descritos na Tabela 3-1 (quanto ao tipo de substância ativa utilizada, concentração e tempo de exposição). Após desinfeção, as sementes foram colocadas em 5

placas de Petri com aproximadamente 20 sementes por placa de meio MS.1, para cada um dos processos de desinfecção realizados.

As sementes foram desinfetadas e colocadas em placa de Petri com água destilada, sendo de seguida colocadas no meio de cultivo. A experiência decorreu durante 6 semanas e a germinação foi definida como bem-sucedida após o surgimento da radícula. Diariamente foi feito o registo de novas germinações, até passarem 5 dias seguidos sem registos adicionais de germinação (processo adaptado de Hölzel e Otte, 2004; Davies *et al.*, 2015).

Tabela 3-I Agentes de desinfecção utilizados em cada um dos processos de desinfecção dos frutos de *P. microcephala*, com indicação dos tempos de contacto e concentração do agente de desinfecção.

	Processo 1	Processo 2	Processo 3	Processo 4	Processo 5	Processo 6	Processo 7
<b>Etanol (96%)</b>	1min	5min	5min	5min	1min	1min	5min
<b>Hipoclorito de sódio (20%)</b>	20min	25min	25min	25min	20min	20min	25min
<b>Ridomil Gold 1,75g/L</b>	-	-	1min	-	-	-	-
<b>Ridomil Gold 2,5g/L</b>	-	-	-	1min	-	1min	-
<b>Pomarsol ultra D 0,2g/L</b>	-	-	-	-	1min	1min	1min
	4x4min Água destilada estéril						

### 3.2.3 Recolha e recuperação de sementes de *Armeria berlangensis*

Para se proceder à desinfecção de sementes de *Armeria berlangensis* foi necessário inicialmente realizar a recolha das infrutescências, na altura certa de maturação das sementes. Procedeu-se à contagem de infrutescências recolhidas e o total de flores que compunham essas mesmas infrutescências. Estes dados foram necessários para se calcular a taxa de fecundação desta espécie e determinar qual a taxa de produção de semente. A totalidade de flores recolhidas foi aberta com o auxílio de uma agulha de dissecação e uma pinça de pontas finas, sob uma lupa binocular, procedendo-se à recuperação das sementes. De forma aleatória foram escolhidas 19 infrutescências para que essa abertura e recolha de sementes fosse acompanhada de uma contabilização mais pormenorizada da quantidade de ovários encontrados (flores que provavelmente não foram fecundadas), flores que estivessem deterioradas, flores que contivessem no seu interior uma semente e também flores que não

apresentassem nenhuma estrutura reprodutiva no seu interior, nem ovários nem semente, que se encontrassem vazias. As sementes foram de seguida contadas e acondicionadas a 4°C até se proceder à sua desinfeção. (adaptado de Terry e Sutcliffe, 2014).

Apesar da necessidade de abrir as flores uma a uma para confirmar a presença ou ausência de semente no seu interior, foi possível observar que, aquando da ausência de semente e existência de ovário, este era visível pela existência de uma estrutura na forma de cruz no interior da flor. Como a semente desta espécie é uma estrutura de maiores dimensões, em relação aos ovários da mesma, foi possível depreender se a flor teria ou não semente no seu interior.

### 3.2.4 Desinfeção de sementes de *Armeria berlengensis*

Foram realizados 5 processos de desinfeção, com as especificações discriminadas na Tabela 3-II quanto à substância ativa utilizada na desinfeção, concentração e tempo de exposição das sementes à mesma. Após desinfeção, as sementes foram colocadas individualmente em frascos de cultura com cerca de 30ml de meio MS.1.

A experiência durou no total 8 semanas e a germinação foi definida como bem-sucedida após o surgimento da radícula. Foi averiguado diariamente o aparecimento de novas germinações, até passarem 5 dias seguidos sem registos de germinações (processo adaptado de Hölzel e Otte, 2004 e Davies *et al.*, 2015).

Tabela 3-II - Agentes de desinfeção utilizados em cada um dos processos realizados para desinfetar sementes de *Armeria berlengensis*, por ordem de utilização e com os tempos de contacto e respetivas concentrações.

Processo 1		Processo 2		Processo 3		Processo 4		Processo 5	
	-		-			24 horas	Papel de filtro húmido	2 horas	Submersão em água destilada esterilizada
<b>1 mim</b>	Etanol 96%	1 min	Etanol 96%	1 min	Etanol 96%	1 min	Etanol 70%	1 min	Etanol 70%
<b>20 min</b>	Hipoclorito de sódio 20%	10 min	Hipoclorito de sódio 20%	20 min	Hipoclorito de sódio 10%	5 min	Hipoclorito de sódio 10%	5 min	Hipoclorito de sódio 10%
<b>4x4min Água destilada estéril</b>									

## 3.3 Resultados e Discussão

Num trabalho de repovoamento e de tentativa de preservação de uma determinada espécie vegetal, é comum a utilização de técnicas como a micropropagação. Esta permite a obtenção

de elevado número de espécimes num curto intervalo de tempo, sendo estes livres de agentes patogénicos. Num ambiente insular e em que as espécies são endémicas apenas a uma determinada ilha a criação de indivíduos geneticamente iguais, quando se parte inicialmente de um número reduzido de plantas mãe é um inconveniente e por isso pode-se partir de germinação *in vitro* como fonte de material vegetal.

Um total de 4218 frutos (N) de *P. microcephala* foram desinfetados e divididos por sete processos diferentes. Tendo sido apenas observado, quando ocorria germinação, que apenas uma plântula era gerada por fruto. Os resultados relativos à influência do processo de desinfecção, na germinação das sementes, foram classificados em três categorias nominais: contaminada, inviável e germinada. Para analisar os resultados este ensaio foi realizado o teste estatístico de Tabelas cruzadas (N= 4218 frutos), no qual foi analisado o teste do Qui-Quadrado de Pearson, já que apenas 2 células (9,5%) esperavam uma contagem de cinco, sendo a contagem mínima esperada de 1,71. Segundo os dados obtidos a viabilidade das sementes e sua consequente germinação é dependente do processo utilizados (N=4218,  $\chi^2 = 454,706$  e p-valor:0,000) (Qui-quadrado de Pearson) (gl=12), demonstrando assim que o uso combinado dos dois fungicidas (Ridomil Gold e Pomarsol ultra D), é o mais benéfico para o sucesso do processo de desinfecção (processo 6), obtendo-se uma taxa de germinação de 73.02% e uma taxa de contaminação de 2.56%.

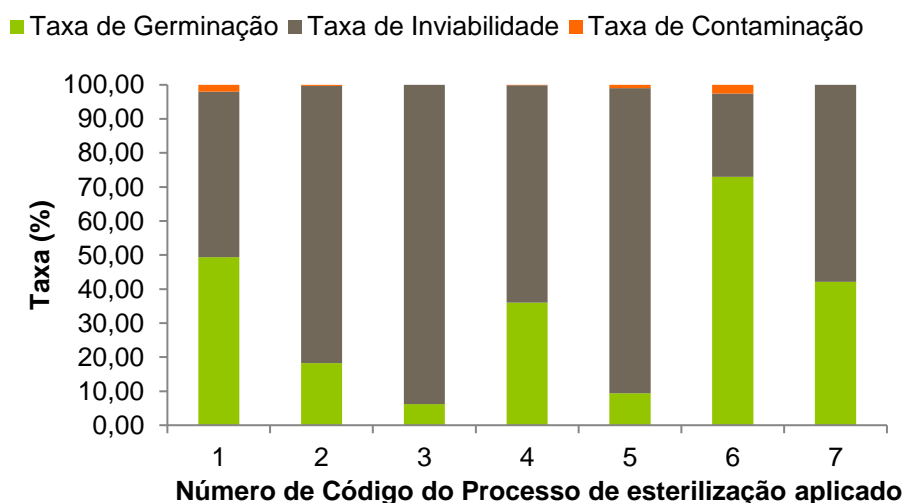


Figura 3.1 Valores percentuais das Taxas de Germinação (cor verde), Taxa de Inviabilidade (cor cinza) e Taxa de Contaminação (cor laranja) para os vários processos de desinfecção aplicados a sementes de *Pulicaria microcephala*.

Entre os processos 1, 5, 6 e 7 a diferença é a não utilização, a utilização de um fungicida ou a combinação de dois (processo 6). Segundo Godefroid e os seus colaboradores (2010) *Pulicaria vulgaris* germinada segundo o processo por eles utilizado (sem pré-tratamentos) tendo obtido uma taxa de sucesso de germinação de 54%, sendo esta inferior à obtida no presente trabalho para *Pulicaria microcephala*, quando utilizados os parâmetros de desinfecção do processo 6. Qualquer outro dos processos aqui testados apresentou uma taxa de sucesso de germinação inferior à obtida por esses investigadores. Seria interessante e para melhor se poder comparar os resultados realizar a germinação de *P. microcephala* sem qualquer pré-tratamento, bem como num meio de cultura menos rico, para entender se as taxas de contaminação e as taxas de germinação seriam semelhantes ao aqui descrito ou se eventualmente poderemos simplificar ainda mais o processo como fizeram Godefroid e colaboradores (2010).

Evans e Etherington em 1990 mencionam a necessidade/importância da existência de água no solo onde a *Pulicaria dysenterica* foi por eles colocada para germinar. Nas melhores condições obtiveram uma taxa de sucesso de aproximadamente 70%. Semelhante à obtida para *Pulicaria microcephala* no presente trabalho, o que sugere que alguma da água dos processos de desinfecção possa estar a ser absorvida pelas sementes e/ou que o teor de água do meio de cultura é suficiente para a germinação de sementes desta espécie, sendo que seria interessante realizar um pré-passo de embebição (semelhante ao que se realizou posteriormente para *Armeria berlangensis*) de forma a entender se esta taxa de sucesso de 73,02% poderia ser ainda maior. Foi encontrada dependência da taxa de viabilidade de germinação com o processo utilizado ( $N=2120, x^2=114,764$  e  $p\text{-value}=0,000$ ) (Qui-quadrado de Pearson) ( $gl=6$ ). Nestes processos e apesar da combinação dos dois fungicidas estudados ser o melhor processo, é possível verificar que o fungicida Ridomil Gold usado isoladamente permite obter uma maior taxa de viabilidade da germinação (processo 7 - 42,14%), do que o fungicida Pomarsol ultra D (processo 5 – 9,45%).

Com as novas diretrizes legais para o uso de fungicidas e sabendo os danos que estes podem causar ao meio ambiente, apesar de ser maior a taxa de sucesso com a utilização de ambos, é sugerido a utilização do processo 7 utilizando somente um fungicida (com taxa de contaminação 0,000). Apesar da taxa de sucesso ter sido inferior ao processo 1, a sua taxa de germinação é de aproximadamente 50% (49,42%).

Posteriormente realizaram-se testes de Tabelas cruzadas para comparações mais específicas. Os processos 1 e 2 variaram apenas no tempo da exposição das sementes à

solução de etanol e à solução de hipoclorito de sódio (processo 1- 1 min e 20 min respectivamente, o processo 2- 5 min e 25 min respectivamente (Tabela 3-I).

Com base nos resultados obtidos, a viabilidade da germinação das sementes, após os processos de desinfecção é dependente deste e apesar de apresentar uma taxa de contaminação maior, de 2,02% em vez de 0,29%, no processo 1, com menor tempo de exposição aos desinfetantes, verificou-se uma maior viabilidade das sementes e uma taxa de germinação superior. Constatou-se que foi inclusivamente 2,7 vezes superior, 49,42% em oposição a 18,28% (N =1343,  $\chi^2=42.554$  e p-value 0,000) (Qui- quadrado de Pearson) (gl=2). Estes dados levam a pensar que, com o aumento da exposição poderá estar a ocorrer a absorção dos agentes de desinfecção por parte das sementes, contribuindo para a redução da taxa de viabilidade da germinação. Apesar destes compostos serem necessários para a remoção das possíveis ceras existentes em redor das sementes, utilizados em demasia podem prejudicar a germinação das mesmas (Yang *et al.*, 2013). A premissa inicial era que maior tempo de exposição, dentro de valores razoáveis (sem que se atinjam níveis tóxicos), melhor a taxa de germinação, por isso, os processos 3 e 4 também foram realizados com 5 min numa solução de etanol a 96% e 25 min numa solução de hipoclorito de sódio a 20%. A diferença entre os processos 2, 3 e 4 é a ausência de fungicida, ou a sua utilização durante 1 minuto com concentrações de 1,75g/L ou 2,5g/L respectivamente. O melhor processo foi o que utilizou uma maior concentração de fungicida. Com base na correlação de Spearman (N=2098), obteve-se um coeficiente de correlação de -0,190 (p-value=0,000 (a correlação é significativa no nível 0,01, 2 extremidades)). A taxa de germinação obtida para o processo 4 foi de 36,01%.

Foram contabilizados também os frutos (Figura 3.2 (a)) recolhidos de 10 capítulos de *Pulicaria microcephala* e a média de sementes obtida para cada capítulo foi de aproximadamente  $42 \pm 21$  sementes. Contudo, alguns capítulos apresentavam apenas 13 ou 16 sementes, o que leva a pensar que várias sementes terão caído antes de ter sido efetuada a recolha, durante a recolha/transporte e manuseamento. (Média= 42,200 e desvio padrão =21,761). O elevado número de sementes por capítulo é uma estratégia evolutiva apontada para plantas da família Asteraceae, por isso é natural que *P. microcephala* siga a tendência e apresente um elevado número de sementes (Baker *et al.*, 1994)

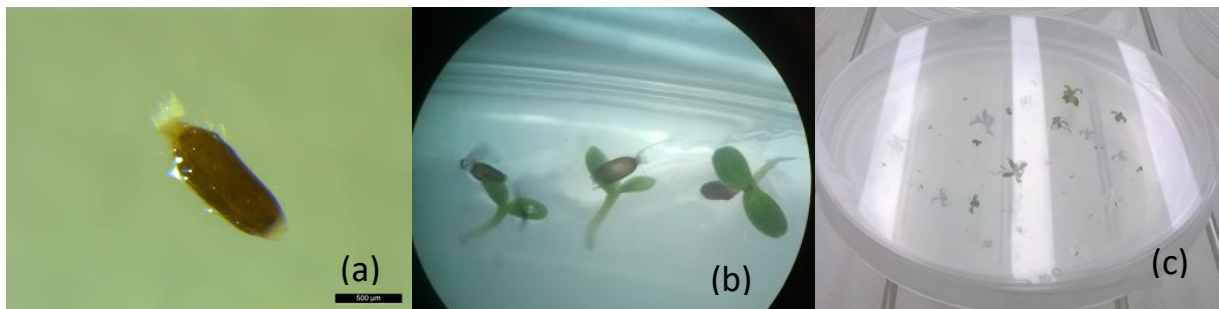


Figura 3.2 Fruto de *Pulicaria microcephala* (lupa binocular com escala de 500µm) (a), plântula e sementeira (lupa binocular com ampliação de 32x) (b) e plântulas com 2 semanas (c).

Depois de se ter estudado a germinação de *Pulicaria microcephala*, iniciaram-se os ensaios com a *Armeria berlengensis*. Após a recolha, separação das flores das infrutescências e a sua abertura foi possível contabilizar o número de infrutescências totais estudadas, flores abertas (quer as que não se soltaram das infrutescências quer as que estavam soltas no saco de transporte), e o número de sementes obtidas (Tabela 3-III). Foi também realizado um estudo mais pormenorizado a 19 infrutescências no que diz respeito a número de flores, quais as que se encontravam vazias, as que tinham ovário evidente, as que se encontravam deterioradas e as que continham semente (Tabela 3-III).

Foi determinada a taxa de fecundação para a espécie *Armeria berlengensis* com base no número total de sementes encontradas a partir das 4721 flores abertas (Tabela 3-IV), provenientes das 98 infrutescências recolhidas (Tabela 3-IV) na ilha. Esta taxa de fecundação foi de 3,5%. Quando este cálculo foi realizado para as 19 infrutescências analisadas em pormenor o valor foi ligeiramente mais baixo, de 3,4%. Foram escolhidas ao acaso 19 infrutescências e, das 678 flores recolhidas, 343 apresentavam ovário não fecundado e apenas 23 continham semente, o que dá uma média de 1 semente por infrutescência. Das 678 flores, 207 encontravam-se vazias (sem colora) e 105 deterioradas. No entanto, não se poderá afirmar que estas não teriam tido semente, uma vez que nas deterioradas poderia ter sido a semente o material vegetal a apodrecer e as vazias poderiam ter libertado a semente ainda no terreno ou no saco de transporte. Neste, foram recolhidas 66 sementes de flores, sem que se fizesse distinção entre as sementes que saíram por si e/ou as que se encontravam ainda na flor, mas soltas do capítulo. Assim sendo, este trabalho pode estar a subestimar a quantidade das sementes e por consequência a taxa de fertilização desta espécie. No entanto, e comparando os dados obtidos, o valor encontrado de sementes é muito inferior ao registado para *Armeria maritima* de em média 29 sementes por infrutescência (Baker *et al.*, 1994). Baker e colaboradores (1994) apontam ainda que obtiveram uma diferença entre o número de sementes obtidas para flores selvagens e flores germinadas a partir destas mas mantidas



*off-situ* quer em vasos quer em terra, e que este facto se poderá ter devido à falta de insetos polinizadores neste último local, o que seria interessante averiguar se poderá estar a ocorrer o mesmo na ilha das Berlengas e a polinização não estar a ser tão bem sucedida, por esse motivo.

Tabela 3-III Dados totais numéricos, médias e desvios padrão da recuperação de sementes de *Armeria berlengensis*, nomeadamente o número de infrutescências totais estudadas, flores e número de sementes obtidas.

		Número	Média por infrutescência	Desvio padrão
<b>Infrutescências estudadas</b>		98	-	-
<b>Flores</b>	Total	4721	48,173	26,921
	Em infrutescência	3496	35,673	26,376
	Soltas no saco de transporte	1225	Não aplicável	Não aplicável
<b>Sementes obtidas</b>	Total	164	1,673	1,783
	Em infrutescência	98	1,000	1,874
	Soltas nos sacos de transporte	66	Não aplicável	Não aplicável
<b>Análise detalhada das Infrutescências</b>		19	-	-
<b>Flores</b>	Total	678	35,684	30,515
	Vazias	207	10,895	13,860
	Com ovário (sem semente)	343	18,053	17,449
	Deterioradas	105	5,526	5,762
	Sementes obtidas	23	1,211	2,284

Mesmo que se considere que todas ou pelo menos algumas das flores vazias continham sementes, a taxa de fecundação por infrutescência variaria entre 3,4 e 34% aproximadamente. Deste modo, seria possível recuperar entre 1 a 12 sementes por infrutescência, que em média apresenta aproximadamente  $40 \pm 26$  flores. Dados que já se assemelhariam aos obtidos para *Armeria maritima* (Baker *et al.*, 1994).

Das 4721 flores abertas, 1225 (Tabela 3-IV) encontravam-se soltas no saco de transporte. Comparando o número de sementes encontradas na fração de flores soltas e na fração de flores que se encontravam nas infrutescências pós transporte, consegue-se observar que cerca de 5,39% das flores soltas continham sementes, mas apenas 2,80% das flores das infrutescências apresentavam sementes. Este dado pode corroborar a ideia de que as flores vazias já libertaram a sua semente. Pode igualmente indicar, que as flores mais maduras, já

com semente, se libertam da infrutescência com maior facilidade para promover a dispersão da semente. Como é possível observar na Tabela V, a taxa de observação de ovários é de 50,59% o que parece indicar, que cerca de metade das flores analisadas não foram fecundadas, ou ainda não teriam desenvolvido a semente. Para plantas que não realizam a autopolinização a consequência é a baixa fertilização o que se manifesta em baixo teor de sementes e num elevado teor de flores com ovário, como é o caso das espécies do género *Armeria* (Sutherland e Delph, 1986; Richards, 1986)

Tabela 3-IV Dados percentuais das taxas de fecundação de *Armeria berlengensis*, no total e das taxas de fecundação, flores vazias, observação de ovários e flores deterioradas de 19 infrutescências estudadas em pormenor.

	Taxa	Valor (%)
<b>Total</b>	Fecundação	3,474
<b>Das flores analisadas em pormenor</b>	Fecundação	3,392
	Flores vazias	30,531
	Observação de ovários	50,590
	Flores deterioradas	15,487

Uma das razões para o estado vulnerável que é atribuído a esta espécie endémica da Berlenga, poderá ser então a pouca quantidade de sementes que esta produz com sucesso. A taxa de fecundação é de aproximadamente de 3,47%, em conjunto também com a taxa de sucesso de germinação das mesmas. Não se pode esquecer as outras ameaças externas já referidas, nomeadamente *Larus* sp. (Nascimento, 2018; ICNF, 2019; SPEA, 2019; Berlengas, 2019), ou mesmo o facto da *Armeria berlengensis*, pertencer a um género que é indicado como propenso a hibridação interespecífica. Existem estudos a comprovar hibridação entre espécies francesas e da costa portuguesa, nomeadamente da Ericeira (Tauleigne-Gomes e Lefèbvre, 2008). Esta hibridação poderá também ser um motivo pelo qual se recolhem poucas sementes e a taxa de fecundação seja reduzida, já que organismos híbridos não são férteis. Esta afirmação é reforçada pelo facto de, ao realizar las contagens em várias infrutescências, 100% das flores não continham semente. Das 19 infrutescências analisadas em pormenor, obtiveram-se apenas 23 sementes, no entanto, em 10 das infrutescências, mais de 50% não tinham sementes, e em algumas o número de flores vazias ultrapassava o de ovários observados, enquanto noutras a situação era invertida. O número máximo obtido numa infrutescência foi de 10 sementes em 70 flores, sendo que 16 flores estavam vazias, 44 continham ovário e nenhuma se encontrava danificado. Essas 16 flores vazias, como referido anteriormente, poderiam ter contido sementes antes da recolha do material ter sido realizada.

No que diz respeito às desinfecções realizadas, a taxa de germinação máxima obtida para *A. berlengensis* em meio de cultura MS foi de 20%. Este valor foi obtido através de 2 processos diferentes, o 3 e o 5.

Após a realização dos processos 1 e 2, foi possível observar que as sementes turgiam, logo após a imersão na solução de hipoclorito de sódio, o que provavelmente reduz a taxa de germinação (processo 1, 3,33%; processo 2, 0,00%), por via de efeitos tóxicos. No entanto, o trabalho de Brewin e colaboradores (2003) menciona a germinação de sementes de *Armeria maritima* após a sua imersão numa solução de 30% (v/v) de Domestos, o mesmo composto utilizado neste trabalho experimental, durante 5 minutos, por isso seria interessante estudar tempos de exposição inferiores.

A confirmação desse efeito tóxico veio da realização do processo 3 onde ao diminuir a concentração de hipoclorito de sódio a taxa de germinação aumentou. Isto sugere a absorção do hipoclorito de sódio e o seu impacto sobre o sucesso da germinação. Numa tentativa de reduzir a concentração dos desinfetantes e o tempo de exposição, visando aumentar a taxa de sucesso da germinação foi feita outra variação nos processos 4 e 5, acrescentando um passo de hidratação pré-desinfecção. Este passo foi realizado para que não fossem absorvidos os desinfetantes e para testar a necessidade de se realizar a quebra da dormência das sementes, causando turgescência das mesmas (já que este é um passo chave para a germinação de sementes) (Evans e Etherington, 1990). No processo 4, as sementes hidrataram entre folhas de papel de filtro húmidas com água destilada durante 24 horas. No processo 5 as sementes foram totalmente submersas em água destilada durante 2 horas. Em ambos os casos as sementes sofreram turgescência, não sendo depois observadas variações, à vista desarmada, quando as sementes foram submetidas à desinfecção. No entanto, os resultados obtidos para o processo 4, parecem indicar que a quantidade de água absorvida por meio de papel de filtro, não foi suficiente para impedir a absorção do etanol e/ou hipoclorito de sódio. Ao se comparar estes dados com as observações feitas por Henriques *et al.*, (2017) a taxa de germinação das sementes de *A. berlengensis* é substancialmente mais baixa do que a que esse grupo obteve para a *Armeria mederensis*. O valor máximo de taxa de germinação para esta espécie endémica da ilha da Madeira foi de 98% quando realizada uma estratificação a frio (três meses a temperaturas entre o 1 e os 6°C) o que poderá ser um teste futuro para se entender se *A. berlengensis* também beneficiará desse tratamento e não só da hidratação por imersão.

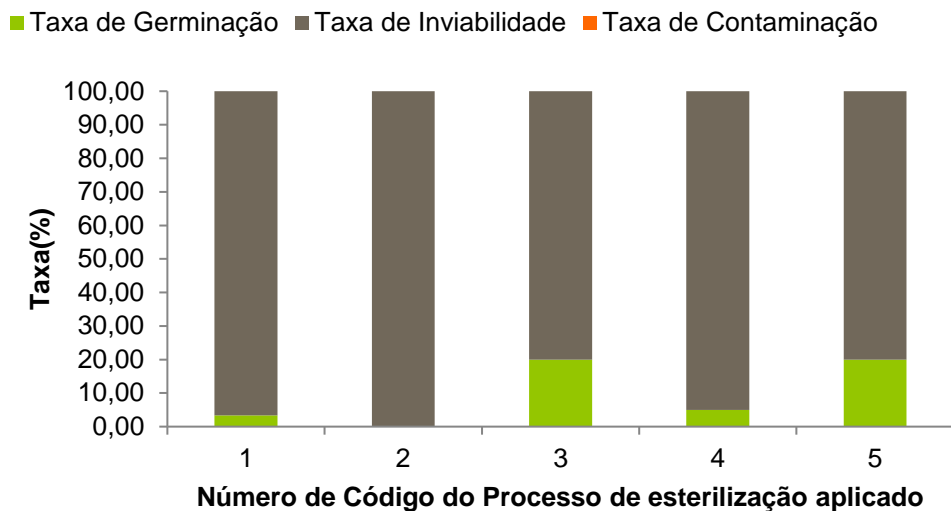


Figura 3.3 Valores percentuais das Taxas de Germinação (cor verde), Taxa de Inviabilidade (cor cinza) e Taxa de Contaminação (cor laranja) para os vários processos de desinfecção aplicados a diversos conjuntos de sementes de *Armeria berlengensis* em germinação em placa de Petri;

Foram realizados testes estatísticos de Tabelas cruzadas (Qui-quadrado de Pearson) e correlações não paramétricas (correlação de Spearman) quando não se conseguia retirar conclusões com o primeiro teste. Estes foram realizados para os 5 processos (Tabela 3-1) em comparação uns com os outros, bem como, comparações mais específicas entre os processos 1, 2 e 3 e os processos 4 e 5. Apesar de alguns processos terem maior taxa de germinação, segundo a análise estatística aplicada, esta não é explicada/dependente do processo de desinfecção aplicado. Este dado em conjunto com o facto de que a taxa de



Figura 3.4 Plântula de *Armeria berlengensis* (lupa binocular com ampliação 32x)

contaminação ser 0,00% para todos os processos, permite afirmar que a escolha do processo a realizar num trabalho futuro, poder-se-á fazer entre os processos 3 e 5, sendo recomendado o processo 5 uma vez que as concentrações de desinfetantes são menores, apesar de ser mais demorado. Como a maioria das sementes foi removidas à mão, com o auxílio de uma agulha de dissecação e pinça (Figura 3.5), foi observada por vezes a presença de uma película a envolver a semente e em contacto com o ovário, sendo possível pensar que algumas sementes não estavam ainda maduras. Foram, inclusivamente, recolhidas 3 sementes que aparentavam estar vazias.

Em oposição ao realizado para as sementes de *P. microcephala*, não foram utilizados fungicidas na desinfecção das sementes de *A. berlengensis*. O processo designado por número 1 em ambas as espécies é o mesmo, sendo o ponto de partida para a espécie da qual se possui muito menos sementes, para tentar desinfetar e implementar em meio de cultura MS.

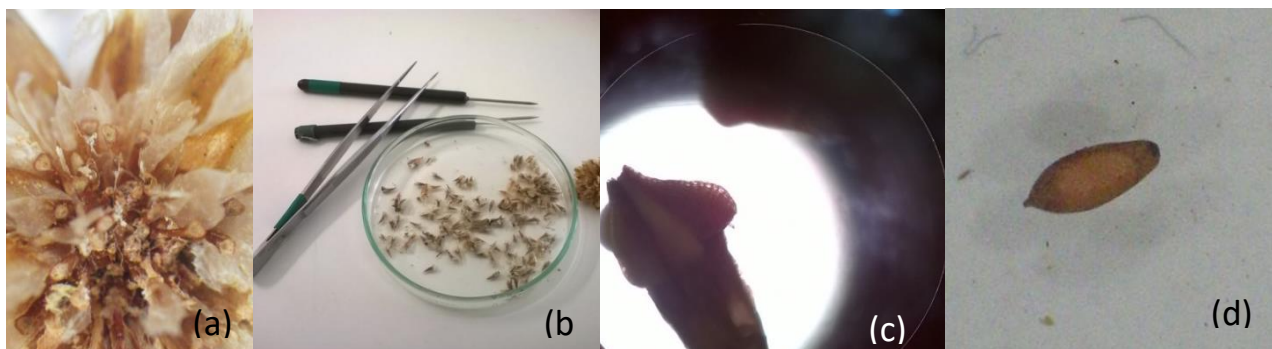


Figura 3.5 Infrutescência (a), flores (b), ovário não fecundado (lupa binocular com ampliação 32x) (c) e semente (lupa binocular com ampliação 32x) (d) de *Armeria berlengensis*.

A não utilização de fungicidas nas sementes de *A. berlengensis* justificou-se pela taxa de contaminação ter sido 0,00% nos processos 1 e 2. Como para os 5 processos realizados não se obtiveram sementes contaminadas, não se testaram com esses produtos.

Em suma e apesar da reduzida produção de sementes por parte dos exemplares de *Armeria berlengensis* a espécie ainda se reproduz sexualmente e é possível a germinação das suas sementes em condições de assepsia, podendo ser este um processo utilizado para combater a extinção da espécie. Para *Pulicaria microcephala*, e apesar de o estado de conservação não ser tão preocupante, o método de germinação foi bem-sucedido e por isso é apontado como um bom método para eventual programa de repovoamento.



---

#### **4 *Pulicaria microcephala***





## 4.1 Introdução

O género *Pulicaria* é conhecido pelas suas inúmeras aplicações, principalmente no que diz respeito à extração de óleos essenciais e aplicações de extratos destas espécies como agentes antibacterianos e antioxidantes (Fawzy *et al.*, 2013; Foudah *et al.*, 2016; Hussien *et al.*, 2016; Shahat *et al.*, 2017; Nikpay e Soltani, 2018). No entanto, poucos são os trabalhos de micropropagação para produção de novos exemplares que se encontram publicados.

Um desses raros exemplos, é a *Pulicaria incisa*, estudada em 2018 por Ghareb, e que é uma espécie rara, nativa do Egipto. A micropropagação desta espécie foi bem-sucedida com a utilização de hormonas de crescimento como o 2-iP e IBA, respetivamente para o estabelecimento/multiplicação e para o enraizamento (Ghareb, 2018).

Normalmente em cultura de tecidos vegetais são adicionadas hormonas de crescimento aos meios de cultivo, para que os explantes se desenvolvam pela via morfogénica desejada. Estes compostos, possuem um papel importante na coordenação do crescimento e da organogénese, controlando muitos processos bioquímicos e fisiológicos na planta (Went e Thimann, 1937; Lucas *et al.*, 2007). Particularmente as citocininas são uma classe de reguladores de crescimento com capacidade de induzir a divisão celular em tecidos vegetais, sendo importantes em processos de organogénese (Lucas *et al.*, 2007), e retardando a senescência (Lack e Evans, 2001). As auxinas têm como principal efeito a regulação do alongamento celular mas, as raízes são o tecido mais sensível a este tipo de hormona, sendo fundamental a sua presença para que se formem os rebentos radiculares adventícios. As auxinas são também responsáveis pelos fenómenos de dominância apical (Lack e Evans, 2001).

O objetivo específico destes ensaios foi, pois, avaliar o sucesso de diversos processos de desinfeção e instalação *in vitro* de explantes de *Pulicaria microcephala*, tendo em vista o estabelecimento de protocolos de desinfeção eficazes e repetíveis. Adicionalmente foi testada a necessidade de utilização de hormonas de crescimento para o desenvolvimento correto desta espécie em cultura *in vitro*, assim como a capacidade de adaptação destas culturas a condições *ex vitro*, fechando assim o ciclo de micropropagação.

## 4.2 Materiais e Metodologia

### 4.2.1 Recolha de explantes

Nos dias 10 e 22 de maio de 2017 foi recolhido o material biológico de *Pulicaria microcephala*, com o objetivo de instalar esta espécie em cultura asséptica. A recolha foi realizada de acordo com os procedimentos descritos no capítulo 2.

### 4.2.2 Desinfecção e estabelecimento

Foram realizados no total 6 processos de desinfecção distintos, com as especificações discriminadas na Tabela 4-I quanto à substância ativa utilizada na desinfecção, concentração e tempo de exposição. Foram colocados 3 explantes caulinares em cada frasco de cultura.

Tabela 4-I - Agentes de desinfecção utilizados em *P. microcephala*, com indicação dos tempos de imersão em cada uma das soluções e respetivas concentrações.

Processo 1		Processo 2		Processo 3		Processo 4		Processo 5		Processo 6	
1min	Etanol 96%	1min	Etanol 96%	1min	Etanol 96%	1min	Etanol 70%	1min	Etanol 70%	1min	Etanol 96%
20min	Hipoclorito de sódio 20%	20min	Hipoclorito de sódio 20%	20min	Hipoclorito de sódio 10%	10min	Hipoclorito de sódio 10%	10min	Hipoclorito de sódio 10%	20min	Hipoclorito de sódio 20%
1min	Ridomil Gold 2,5g/L	1min	Peróxido de hidrogénio 10%	-	-	-	-	1min	Ridomil Gold 1,75g/L	-	-
4x4min Água destilada estéril											

### 4.2.3 Ação de hormonas vegetais no crescimento de *Pulicaria microcephala*

Para se entender se as plantas da espécie *P. microcephala* em cultura *in vitro* beneficiam da presença de hormonas de crescimento foi estudo qual o composto e a melhor concentração de citoquina e das auxinas estudadas, tendo por base o meio MS.1, e que se encontram indicados na Tabela 4-II.

Tabela 4-II Designação e especificação dos teores de auxinas e de cinetina que foram adicionadas ao meio de cultura MS.1 para se estudar a sua influência sobre *Pulicaria microcephala*.

		NAA			IAA			IBA		
	(mg/L)	16,7	33,3	66,7	3,3	6,7	13,3	3,3	6,7	13,3
	6,7	A	B	C	J	K	L	S	T	U
<b>KIN</b>	13,3	D	E	F	M	N	O	V	W	X
	26,7	G	H	I	P	Q	R	Y	Z	ZZ

Foram realizados dois ensaios com hormonas de crescimento, um de exposição inicial, onde rebentos que não tinham sido expostos a hormonas de crescimento, foram colocados em meios com as concentrações descritas na Tabela 4-II, denominado ensaio A, e um ensaio de reexposição ao mesmo meio de cultura, designado de ensaio B. Neste ensaio os rebentos originados pelos explantes colocados em meio de cultura com uma determinada combinação e concentração no ensaio A foram colocados novamente nas mesmas condições. É de reforçar que os explantes foram cortados todos com um tamanho idêntico e sem ramificações para que o estado inicial dos explantes em cada um dos ensaios fosse comparável. Nos dois ensaios foram recolhidos dados referentes ao tamanho máximo dos rebentos em centímetros e o número de ramos a que o explante inicialmente colocado no meio, deu origem. O número de ramos foi contabilizado pela realização de um corte basal, seguido de contagem do número de explantes obtidos. O tamanho máximo foi medido por uma craveira desde a base do rebento, até ao topo do gomo apical.

#### 4.2.4 Aclimatização a condições *ex vitro*

O processo de aclimatização está descrito no capítulo 2. Durante o processo de aclimatização foram utilizadas diferentes intensidades luminosas (Lux): 3650 Lux, 5640 Lux, 5790 Lux, luz natural (os vasos foram colocados no exterior) (Figura 2.2).

### 4.3 Resultados e Discussão

Tendo em conta que o estado fitossanitário da planta é um facto crucial para o sucesso do processo de instalação em condições *in vitro*, procurou-se que os tecidos recolhidos em campo estivessem o mais possível limpos e sãos.

Os resultados obtidos nos diferentes procedimentos de desinfeção encontram-se descritos na Figura 4.2. Ao analisar esta Figura é necessário ter em conta que a taxa de viabilidade corresponde à percentagem de explantes sãos e a taxa de inviabilidade engloba a taxa de

contaminação microbiana e a taxa de morte dos explantes (devida à exposição aos compostos usados na desinfeção e/ou tempos de desinfeção demasiado elevados).

Os processos 4, 5 e 6 não permitiram a implementação bem-sucedida dos explantes em cultura *in vitro* (resultados na Figura 4.1), deduzindo-se pelo aspeto dos mesmos que os tratamentos foram demasiado agressivos, causando a sua morte. Os resultados obtidos não parecem estar diretamente relacionados com o estado fitossanitário das plantas, mas sim como tipo de tratamento a que foram sujeitas. Nos processos 1, 2 e 3 alguns explantes sobreviveram sem contaminação e foi possível estabelecer a cultura *in vitro* com sucesso.

Tendo em conta que a maioria das contaminações observadas durante a realização deste ensaio foram de natureza fúngica, não é surpreendente que o processo que melhor permitiu a adaptação a cultura *in vitro* da espécie *P. microcephala* recorra a um fungicida, com o princípio ativo Mancozebe a 64%. Este processo é o processo 1 onde aproximadamente um em cada quatro explantes (24,4%) (Figura 4.1) foram instalados em cultura asséptica com sucesso.

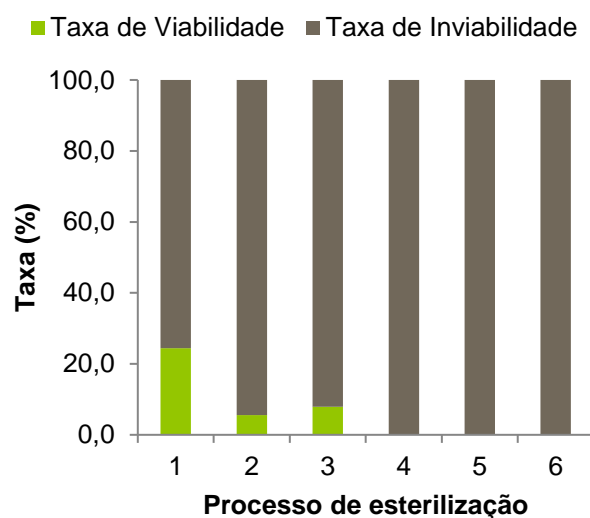


Figura 4.1 Valores percentuais das Taxas de Viabilidade (verde) e Taxas de Inviabilidade (cinzento) para os vários processos de desinfeção de *Pulicaria microcephala*.

No ensaio com hormonas de crescimento é possível observar que no que diz respeito ao tamanho médio dos rebentos no final de cada ciclo de cultivo, o meio de cultura sem hormonas de crescimento foi o que permitiu aos explantes alongarem de forma mais acentuada (Anexo IV, Anexo VII e Anexo IX), quer no ensaio A quer no B. Sendo os valores obtidos significativamente superiores aos obtidos para as outras 27 conjugações, excetuando a situação B (1,33mg/L de KIN e 33,3mg /L de NAA). Esta conjugação específica poderá ser

próxima do ideal para estas plantas, não sendo, no entanto, muito diferente do meio controlo sem hormonas, após algumas gerações no mesmo meio de cultura. Num estudo feito com *Pulicaria incisa* foi estudado o efeito de 2-iP e desta hormona em conjugação com NAA verificando-se que o melhor tratamento é 0,25mg/L de 2-iP, originando rebentos mais altos, (em média 5,4 cm) em comparação com uma média de 4,0 cm quando o meio de cultura não continha hormonas (Ghareb, 2018). Estes valores de alongamento são semelhantes aos encontrados para *Pulicaria microcephala* na situação controlo com uma média de 4,38 cm. Note-se que as concentrações utilizadas por Ghareb (2018) são substancialmente inferiores ao estudado neste trabalho, o que poderá indicar que esta espécie não necessita da suplementação do meio de cultura com hormonas quando se pretende que as plantas mantenham a morfologia encontrada na natureza, facilitando a aclimatização e a colocação das plantas no habitat natural (Figura 4.2). Seria interessante perceber se o uso de 2-iP seria benéfico para o desenvolvimento de *P. microcephala*, como foi registado em *P. incisa* (Ghareb, 2018).

Na maioria das situações estudadas ocorreu um incremento na taxa de alongamento do caule no segundo ciclo de cultivo, o que indica a gradual adaptação das plantas ao meio a que são expostas, sendo nalguns casos significativo. Estes dados são semelhantes aos encontrados em *P. incisa*, na qual após 4 subculturas sucessivas se observaram decréscimos no tamanho dos rebentos. No mesmo ensaio foram contabilizados os rebentos originados a partir de cada explante e apenas na sétima passagem o número médio de rebentos diminuiu (Ghareb, 2018). No presente trabalho, para *Pulicaria microcephala*, no ensaio B também foram obtidos maior número médio de rebentos quando comparados com o ensaio A.

O objetivo inicial da micropropagação é a obtenção do maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo. Quando se analisa o número médio de rebentos obtidos em cada subcultura, podemos verificar que a maioria das combinações permite obter um elevado número de ramos a partir da mesma planta, quando comparado com a situação controlo sem hormonas. Um maior número de ramos de plantas é vantajoso, tendo em conta que o principal objetivo é obtenção de espécimes para repovoamento. A combinação que deu origem um maior número de rebentos foi a P, em média 12,5 rebentos, no ensaio A e a situação Q, em média 22,3 rebentos, no ensaio B em comparação com os 6,4 e 6,1 da situação controlo no ensaio A e B, respetivamente. Para *Pulicaria vulgaris* a melhor combinação e concentração de hormonas de crescimento encontrada por El-Tarras e colaboradores (2015) foi de 0,1 mg/l Kin + 3,0 mg/l 2-iP, com uma média de 3,75 rebentos novos em comparação com os 6,40 que se obteve neste trabalho para a *P. microcephala*, para a situação controlo e os valores

superiores dos outros tratamentos. As situações P e Q contêm uma combinação de KIN e IAA o que poderá demonstrar que esta combinação beneficiará a geração de um maior número de rebentos para que se realize a micropropagação de *P. microcephala* com um maior rendimento. A situação controlo, sem hormonas, é apontada como ideal para ser a última passagem para que a morfologia seja a mais parecida com a natural e o tamanho das plantas seja maior.

Comparando também a morfologia das duas plantas, observa-se que no estudo conduzido por El-Tarras (2015) os explantes demonstravam massas celulares indiferenciadas na zona em que o caule contactava com o meio de cultura, à semelhança do que ocorreu com as situações que não o controlo, no presente trabalho, como é possível observar na Figura 4.2.

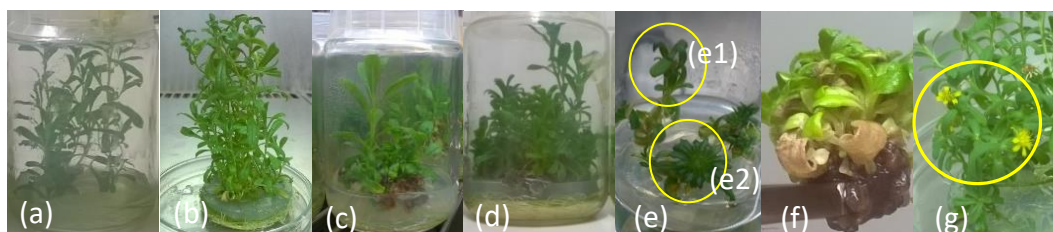


Figura 4.2 Aspeto esperado para três explantes de *Pulicaria microcephala* em cultura *in vitro* em meio M.S.1 durante 1 mês (a) e dois meses (b); Aspeto esperado para três explantes de *Pulicaria microcephala* em cultura *in vitro* em meio M.S.1 suplementado com hormonas de crescimento, durante 1 mês (a) e dois meses (b); Aspeto vidrado (e1) e morfologia em roseta (e2) que certos explantes de *Pulicaria microcephala* apresentavam quando o meio de cultura não era o ideal para o seu desenvolvimento (M.S.1 com Hormonas de crescimento); Formação de *Callus* de *Pulicaria microcephala* em pormenor (f); Detalhe das flores de *Pulicaria microcephala* (g).

Neste trabalho não foram medidos os comprimentos das raízes nem avaliada de forma quantitativa a taxa de desenvolvimento radicular, no entanto é possível observar a formação de raízes no meio com IBA o que vai ao encontro do estudado por Ghareb (2018) para *P. incisa*, para a qual este investigador afirma que uma concentração de 0,2mg/L de IBA beneficia o processo de enraizamento.

Após a implementação dos explantes em cultura *in vitro*, estes foram micropropagados de rotina, com uma taxa multiplicação próxima de 3. Este fator, associado ao sucesso da fase de aclimatização, permitiu fechar o ciclo de multiplicação e antever a possibilidade destes processos permitirem gerar um número de plantas suficientes para efeitos de repovoamento nas ilhas. Assim, uma boa prática para o futuro, a fim de aumentar a distribuição desta espécie na ilha, poderá passar pela micropropagação.

Em adição às plantas que foram micropropagadas ao longo deste trabalho (MV), também várias plantas obtidas por desinfeção e germinação de sementes de *P. microcephala*, plantas

ditas PGS, foram aclimatizadas a fim de se entender a viabilidade destas. As plantas PGS apresentaram uma morfologia diferente das plantas MV (Figura 2.2 (d) e (e)), que não se traduzem em diferenças no sucesso de aclimatização, não se fazendo por isso a sua distinção.

A situação onde se verificou maior sucesso da aclimatização foi a de 5790LUX, com uma taxa de sucesso de aproximadamente 91%. Comparando com a situação com luminosidade estudada de 5640LUX, em que o sucesso é de cerca de 51%, observa-se que a intensidade luminosa é um fator importante para o sucesso da aclimatização desta espécie (Figura 4.3).

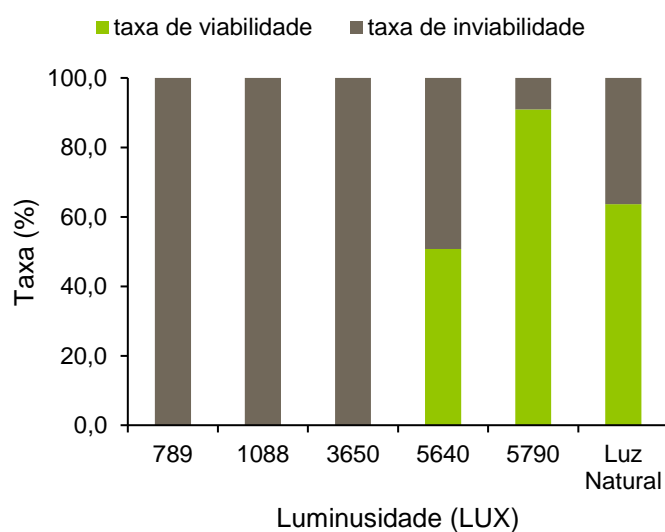


Figura 4.3 Valores percentuais das Taxas de Viabilidade (cor verde) e Taxas de Inviabilidade (cor cinza) para os vários valores de Luminosidade (LUX) aplicados durante a aclimatização de *Pulicaria microcephala*.

Na situação de Luz não controlada (luz natural) as plantas foram sujeitas a mudanças de temperatura e intensidade luminosa, inclusivamente à exposição direta do sol. Esta não foi a situação que obteve maior taxa de sucesso, cerca de 64% (Figura 4.3) mas sim a que produziu plantas de maior tamanho, como é possível observar nas fotografias da Figura 4.2, bem como o maior número de flores. O aparecimento de sistemas de reprodução é importante para os processos de repovoamento, já que, ao colocar plantas com um maior número de flores, no *habitat* natural de *Pulicaria microcephala*, maior será a probabilidade de regeneração natural da espécie.

Neste trabalho a taxa de sucesso de aclimatização, foi superior à alcançada por Ghareb para *P. incisa* (2018), de cerca de 70%. Mesmo que se considere os 64% da situação de luz e ambiente natural a taxa de sucesso obtida para *P. microcephala* a taxa de sucesso não é

muito inferior à obtida por esse investigador. Este é um sinal encorajador para a possibilidade de repovoamento da ilha da Berlenga com esta espécie.



Figura 4.4 exemplos de alturas finais dos exemplares de *Pulicaria microcephala* aclimatizados a 5640 (a) e 5790 LUX (b), e aclimatizados ao ar livre (Luz natural) (c) Imagens ilustrativas.

Durante a fase de desenvolvimento das plantas em condições *in vitro*, as plantas podem adquirir aspetos morfológicos diferentes do observado no meio natural, já que as condições a que estão sujeitos não são idênticas às do *habitat* natural. A elevada taxa de humidade, a baixa luminosidade (principalmente devido a iluminação artificial) e outras condições que muitas das vezes possam ocorrer no meio natural (vento, pluviosidade, interação com outros seres vivos, entre outros) são algumas das condições que não são iguais em culturas *in* e *ex vitro* (Neves, 2000). O crescimento em autotrofia e a reduzida taxa de fotossíntese (Figura 4.2 (f)) assim como o aparecimento de estruturas em roseta (Figura 4.2 (e2)) ou vitrificação (Figura 4.2(e1)) em comparação com o aspeto morfológico semelhante ao observado para *Pulicaria microcephala* na ilha da Berlenga (Figura 4.2 (a, b, e)), são algumas das consequências possíveis aquando da micropropagação, principalmente se pouco se souber sobre a micropropagação da espécie, como é o caso.

Em conclusão é possível realizar a micropropagação de *P. microcephala* sem que seja necessário recorrer a hormonas de crescimento, sendo estas benéficas para certos objetivos, ou alterações significativas ao meio de cultura habitualmente utilizado em cultura de tecidos vegetais, bem como aclimatizar com sucesso as plantas às condições *ex vitro*, conseguindo assim delinear um protocolo de micropropagação.



---

## **5 *Armeria berlengensis***



## 5.1 Introdução

Devido á importância que a *Armeria berlengensis* tem no habitat da ilha das Berlengas e a necessidade de que conseguir realizar o seu repovoamento, já que o número de exemplares tem vindo a diminuir drasticamente (Tauleigne-Gomes *et al.*, 2004, ICNF, 2019), foi feita uma pesquisa para avaliar se para o *genus* *Armeria* já existiam estudos de micropropagação, no entanto são poucos os estudos publicados (Gourguillon *et al.*, 2018).

O género *Armeria* já foi estudado a nível genético (Tauleigne-Gomes e Lefèbvre, 2005; Tauleigne-Gomes e Lefèbvre, 2008), principalmente com o objetivo de se entender o processo de hibridação entre espécies vegetais congéneres, já que este é apontada como *genus* exemplo. Também existem estudos de tolerância a compostos tóxicos, como o cobre por exemplo (Brewin, 2003) e indução de *callus* para produção de maiores quantidades de massa celular com vista a produção secundária de metabolitos *in vitro* em *Armeria maritima* (Gourguillon *et al.*, 2018).

A indução de *calli* é uma forma de propagação de tecidos vegetais que tem vindo a ganhar notoriedade, visto que com menor espaço e recursos é possível produzir um maior volume de células. Após a propagação celular, se o objetivo for a produção de plântulas para posteriormente estudar algum comportamento ou aplicação, ou simplesmente criar clones para prosseguir para a fase 4 da cultura de tecidos, é necessário estudar também a diferenciação celular e entender como a partir de células vegetais totipotentes se poderá desenvolver um indivíduo completo. A indução de desdiferenciação celular (desenvolvimento de *calli*) pode ser realizado em meio líquido ou sólido e a partir de diferentes partes da planta (raiz, pedúnculo, folha) ou até mesmo da raiz ((Aly *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2012; Ahlawat *et al.*, 2017; Farhadi *et al.*, 2017; Gourguillon *et al.*, 2018).

O objetivo deste trabalho foi, pois, avaliar o sucesso de diversos processos de desinfeção de *Armeria berlengensis* e aferir o sucesso da sua adaptação às condições *in vitro* utilizadas, tendo em vista o estabelecimento de protocolos de desinfeção de explantes recolhidos na ilha das Berlengas, bem como a sua posterior adaptação a condições *ex vitro*. Também se pretende entender a capacidade de desdiferenciação celular desta espécie para futuros cultivos por propagação de *calli*.

## 5.2 Materiais e Metodologias

### 5.2.1 Recolha de Material

A recolha de material biológico utilizado na desinfeção, com o objetivo de instalar as plantas em cultura *in vitro*, foi realizada a 23 de janeiro e a 27 de maio de 2017, nas condições descritas no capítulo 2.

### 5.2.2 Desinfeção de *Armeria berlengensis*

Para iniciar a desinfeção foi necessário separar cada rebento das suas folhas exteriores, deixando apenas uma a duas folhas, removendo-se e descartando-se as folhas externas. De seguida procedeu-se como descrito no capítulo 2. Foram realizados 3 processos de desinfeção com as especificações na Tabela 5-I, a nível de composição dos desinfetantes e suas concentrações e o tempo de exposição das folhas (explantes foliares) e dos rebentos (explantes caulinares) aos mesmos.

Tabela 5-I Agentes de desinfeção utilizados nos processos de desinfeção de *Armeria berlengensis*, com indicação dos tempos de imersão e concentrações.

Processo 1		Processo 2		Processo 3	
1min	Etanol 96%	1min	Etanol 96%	1min	Etanol 96%
20min	Lixívia 20%	20min	Lixívia 20%	20min	Lixívia 20%
1min	Ridomil Gold 2,5g/L	1min	Peróxido de hidrogénio 10%		
<b>4x4min Água destilada estéril</b>					

Após terem sido desinfetados, os explantes caulinares foram colocados em tubos de ensaio de 20 ml com cerca de 5 mL de meio MS.1, um em cada frasco. Os explantes foliares foram colocados em tubos de ensaio com 5 ml de meio MS.1, um em cada tubo, para averiguar se ocorria enraizamento, bem como, em placas de Petri de 90 mm, com meio de cultura MS.3 para induzir a desdiferenciação celular para o desenvolvimento de *callus*, sendo que cada placa continha entre 5 e 6 explantes.

### 5.2.3 Aclimatização

A aclimatização foi realizada como descrito no capítulo 2. Para esta espécie fez-se a distinção entre plantas pequenas, com poucas folhas, sem ramificações e no máximo 2 cm de altura e exemplares grandes, com mais folhas, ramificações e altura.

#### 5.2.4 Indução de *calli*

Para a indução de *calli* utilizou-se meio MS.3 e utilizaram-se folhas dos clones de *Armeria berlengensis*, já existentes em cultura e registou-se o desenvolvimento de *callus* ao final de um mês de cultivo. Foram instaladas folhas inteiras, e folhas cortadas para se averiguar os locais onde os *callus* se desenvolveriam.

### 5.3 Resultados e Discussão

A vilosidade é a característica morfológica mais importante quando se fala da espécie *Armeria berlengensis*, já que, separa as *Armeria berlengensis* subsp. *glabra* da *Armeria berlengensis* subsp. *villosa*, esta última apresenta vilosidades nas folhas, conferindo-lhe um toque aveludado e um tom de verde mais escuro. No entanto devido à escassez de material vegetal, a preocupação para afetar o menos possível as plantas estabelecidas na ilha e as taxas de sucesso no processo de desinfecção e implementação de explantes em cultura *in vitro*, não se realizará diferenças entre estas duas subespécies. Embora a recolha deva ser feita de forma aleatória, é necessário escolher plantas limpas e sãs pois a sua desinfecção será, à partida, mais fácil e a taxa de sucesso bastante maior. O estado fitossanitário inicial da planta é um fator muito importante para o sucesso do processo, conforme anteriormente referido.

Antes de serem desinfetados os explantes foram submetidos a uma limpeza prévia, que consistiu na remoção e descarte das folhas exteriores. O explante isolado continha, assim, 2 a 3 folhas pequenas em botão, para que a desinfecção fosse mais eficaz, devido ao maior contacto com o líquido de desinfecção e as folhas interiores.

Nesta espécie as folhas com bainha possuem a capacidade de gerar raiz e de desenvolver uma nova planta, capacidade que foi observada em laboratório. Foi avaliada esta possibilidade já que, é mais fácil desinfetar as folhas do que os explantes e se a taxa de sucesso excedesse a dos explantes e as plântulas se desenvolvessem corretamente, seria um método mais fácil e que necessitaria de uma menor quantidade de material vegetal. Significando isto que ao invés de se ter de se cortar 3 ramos por planta-mãe, seria possível apenas retirar um ramo com gomo apical e depois desinfetar as folhas desse ramo, causando assim um menor impacto negativo à planta. Como referido, várias plantas na ilha estão a morrer, umas por causas de as gaivotas fazerem os ninhos sobre elas, outras por causas que ainda carecem de investigar (observação em campo). Por estes motivos quanto menor for o impacto causado pelos estudos de conservação, e quanto menor quantidade de material vegetal se necessitar, melhor para o ecossistema da ilha da Berlenga. Apesar do

enraizamento ter ocorrido sem a utilização de hormonas de crescimento seria interessante num trabalho futuro estudar o impacto que estas pudessem exercer sobre este processo.

Na tentativa de estabelecimento de *A. berlengensis* em cultura *in vitro*, o processo 2 foi o mais eficaz, obtendo-se com este processo uma taxa de sucesso de cerca de 15,8% (Figura 5.1), mesmo assim um valor bastante baixo. Com o processo 1 apenas se obteve uma taxa de sucesso de aproximadamente 7,7% e com o processo 3, a taxa de sucesso foi nula. Estes valores demonstram que os explantes apresentam uma morfologia que dificulta a sua desinfeção (Figura 2.1 e)). Apesar do processo 2 ser indicado como o melhor, não foram demonstradas evidências estatísticas de que a taxa de viabilidade de estabelecimento de explantes de *A. berlengensis* fosse somente dependente do processo de desinfeção utilizado.

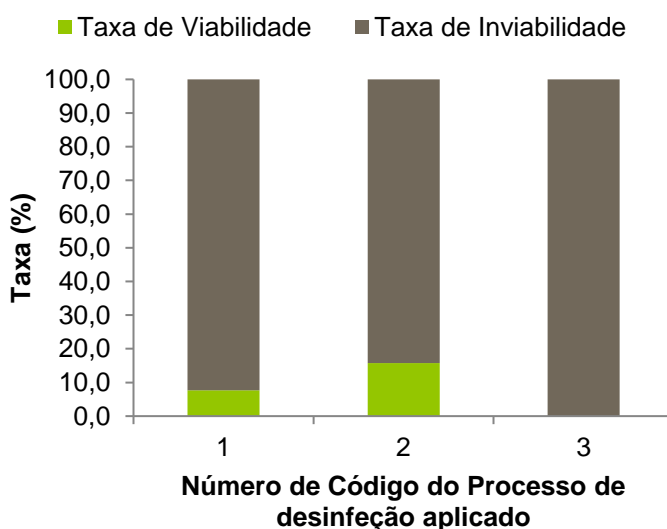


Figura 5.1 Valores percentuais das Taxas de Viabilidade (cor verde) e Taxas de Inviabilidade (cor cinza) para os vários processos de desinfeção aplicados a diversos explantes caulinares de *Armeria berlengensis*. Características dos processos nos materiais e metodologias.

Seria importante repetir estes processos, para se entender se existe realmente alguma relação, ou se, a taxa de viabilidade é influenciada pela quantidade de folhas removidas e/ou pelo estado fitossanitário dos exemplares recolhidos.

Além da sua morfologia, a necessidade de não comprometer a viabilidade da planta-mãe pela remoção excessiva de folhas e o facto desta espécie apresentar ainda uma substância viscosa que não é facilmente removida pela solução de etanol nem pela solução de hipoclorito de sódio, poderão estar na origem das baixas taxas de sucesso. Este composto em redor do caule é evidente aquando da remoção das folhas exteriores dos rebentos para a obtenção dos explantes. Este pode não ter sido removido pelos agentes de desinfeção que foram

utilizados e acima disso pode, pela sua consistência pegajosa, permitir a aderência de agentes infecciosos, que irão proliferar no meio de cultura MS.

O peróxido de hidrogénio utilizado no processo 2 parece ter sido vantajoso para o processo e facilitar a desinfeção dos explantes. A adição do passo com o fungicida Ridomil Gold (Processo 1) aparenta, para esta espécie não ser vantajoso (taxa de viabilidade de 21,74%), em relação à adição do passo com o peróxido de hidrogénio (processo 2) (taxa de viabilidade de 33,33%) ou mesmo em comparação com o processo com apenas dois passos, o Etanol e o hipoclorito de sódio (processo 3) (taxa de viabilidade de 33,33%), no caso da desinfeção das folhas. Como este composto é nocivo para o ambiente e já que o processo 1 obteve uma menor taxa de sucesso este não é apontado como sendo uma boa opção para prosseguir, já que se procura um processo mais económico e ecológico.

À semelhança do observado para os explantes caulinares quando se realizaram as análises estatísticas, não foram encontradas dependências significativas da taxa de viabilidade de desinfeção e implementação em cultura *in vitro*, para com o processo de desinfeção utilizado, ou seja, estatisticamente é indiferente qual o processo que é utilizado.

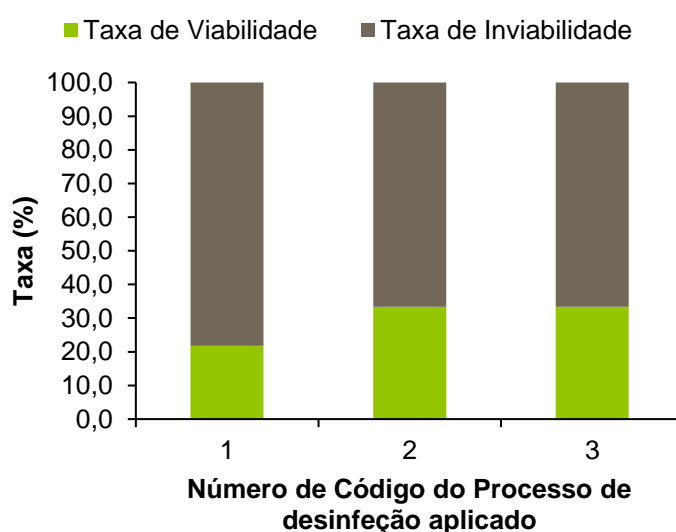


Figura 5.2 Taxas de Viabilidade (cor verde) e Taxas de Inviabilidade (cor cinza) para os vários processos de desinfeção aplicados a folhas inteiras de *Armeria berlangensis*. Características dos processos nos materiais e metodologias.

As taxas de sucesso de estabelecimento *in vitro* de *A. berlangensis* é maior no caso das folhas do que no caso dos caules, quando comparados os 3 processos. Tendo em conta que para os processos 2 e 3 as taxas de viabilidade chegam aos 33% aproximadamente (Figura 5.2), já que, a taxa de viabilidade das folhas de *A. berlangensis* apenas engloba plantas que não

contaminaram e que criaram raiz, estes são os procedimentos que são indicados como sendo os melhores. Como os dois processos, o 2 e o 3, demonstraram a mesma taxa de viabilidade, mas o processo 2 utiliza mais um produto desinfetante, o peróxido de hidrogénio, aponta-se o processo 3 como o mais indicado, para que seja possível não utilizar reagentes sem que estes realmente beneficiem o processo de desinfecção e implementação de material vegetal em condições de assepsia.

Foi feita ainda uma tentativa de entender a taxa de sucesso de folhas provenientes de plantas já implementadas em cultura darem origem a novas plantas, a taxa de sucesso de micropropagação por este mecanismo de regeneração desta espécie. Este evento parece ter influência de diferentes fatores, nomeadamente em como a folha foi removida, e como é colocada no meio de cultura. Por vezes as folhas eram colocadas com a bainha a tocar no meio, mas ao secarem um pouco esta deixava de tocar no meio de cultura e já não se desenvolvia. Foi testado também a possibilidade de colocar a folha ligeiramente sob o meio de cultura, mas não houve indicações de que isso beneficiasse o processo, antes pelo contrário. Este é um processo que se gostaria de ver aprofundado no futuro.

Após a implementação em cultura *in vitro* alguns explantes caulinares cresceram até alcançarem cerca de 6 cm de altura. Desses explantes, ao longo do tempo, foi possível remover rebentos para se continuar a propagação em assepsia, com um máximo registado de 1 explante apresentar 3 rebentos que foram colocados em novos frascos, no espaço de 1 mês. No entanto esta formação de rebentos não seguiu nenhuma lógica temporal que fosse detetada, já que alguns dos explantes não continham rebentos, durante as mudanças de meios, vários meses seguidos e outros a cada mês era possível remover pelo menos um rebento. Este comportamento poderá ser explicado pela dominância apical e o facto de não se ter, muitas das vezes, cortado o gomo apical dos rebentos de *A. berlengensis* para realizar passagens e multiplicação, já que os explantes apresentavam um crescimento lento e por isso, muitas das vezes, em várias passagens sucessivas, apenas se mudava de meio para restabelecer os níveis de nutrientes. A dominância apical é a promoção de um estado latente nos gomos axilares ou laterais, por parte do gomo apical, este controlo é feito por auxinas que são transportadas no sentido descendente no caule. Aquando da remoção do gomo apical ou se ocorrer algum dano no mesmo, os gomos axilares iniciam o seu crescimento. (Phillips, 1975; Cline, 1994; Barbier *et al.*, 2017). Além das hormonas de crescimento pensa-se que a necessidade de açúcar para o desenvolvimento do gomo apical é um dos fatores que mais regula a dormência dos gomos axilares (Barbier *et al.*, 2017). Para combater a fraca ramificação de *Armeria berlengensis* e a baixa taxa de multiplicação, seria interessante



averiguar esta dominância, quer pelo enriquecimento do meio de cultura com citocininas, quer pelo corte do gomo apical para se tentar fomentar a ramificação e assim a taxa de multiplicação ser superior.

Em simultâneo a se ter desinfetado folhas de *A. berlengensis* em tubo de ensaio, e cujos resultados foram acima descritos, também foram colocadas algumas folhas, provenientes dos mesmos processos de desinfecção em placa de Petri. Algumas destas folhas foram cortadas em fragmentos que posteriormente foram divididos em dois grupos, os que continham bainha (folhas inteiras ou fragmentos inferiores) e os fragmentos foliares sem bainha (fragmentos com pelo menos um corte e o ápice da folha, ou no caso de folhas mais compridas o centro da folha com dois cortes).

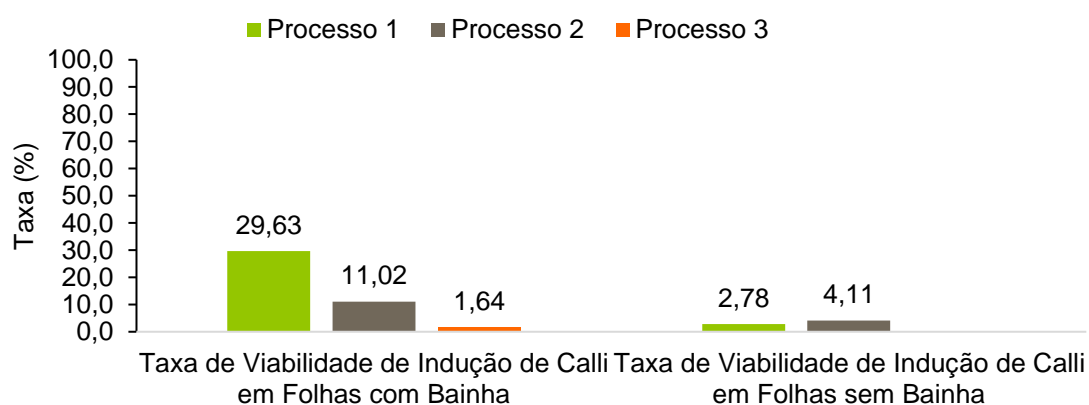


Figura 5.3 Taxas de viabilidade de indução de *calli* em folhas com e sem bainha de *Armeria berlengensis* submetidas a desinfecção pelos processos designados por 1, 2 e 3; Características dos processos nos materiais e metodologias.

Das folhas desinfetadas pelos processos 1, 2 e 3 foi depois analisada a capacidade de desdiferenciação em *calli* (Figura 5.3) que, se conseguida, poderia permitir a organogénese e regeneração de plantas completas.

Na Figura 5.3 é possível observar as taxas de sucesso de indução de *calli* nos fragmentos sujeitos a desinfecção pelos 3 processos estudados. Estes dados contemplam todas as induções, incluindo as que ocorreram em fragmentos que morreram, contaminaram ou que foram descartados por estarem em contacto com os últimos. Conseguiu-se observar (Figura 5.3) que o processo que permitiu uma maior indução de *calli* foi o processo anteriormente apontado como o menos indicado para trabalhos futuros, o processo 1 com a utilização do fungicida Ridomil Gold. Em folhas com bainha este processo demonstrou uma taxa de viabilidade de indução de *calli* de cerca de 30% e de cerca de 3% em folhas sem bainha. O processo 2, em que se utiliza peróxido de hidrogénio, apresentou uma taxa de indução de *calli*

de aproximadamente 11% em fragmentos com bainha e 4% em fragmentos sem bainha. O processo 3, apenas etanol e hipoclorito de sódio demonstrou uma taxa de indução de *calli* de 1,64% em fragmentos com bainha e 0% em fragmentos sem bainha.

Este gráfico apresenta a taxa de sucesso geral de indução de *calli*, sendo que contempla as folhas que foram descartadas e que estavam mortas ou infetadas e que mesmo assim desenvolveram *calli*.

Estes dados parecem indicar que o peróxido de hidrogénio utilizado no processo 2 poderá estar a prejudicar a viabilidade das células no local dos cortes. O mesmo poderá ser afirmado para o Ridomil Gold, onde a descida da taxa de viabilidade de indução de *calli* é ainda mais acentuada. Segundo os dados da Figura 5.3 as células da zona da bainha aparentam ser mais resistentes aos dois desinfetantes. Para este tipo de ensaios e se a diferenciação programada resultar para se obter novas plantas a partir destas massas celulares, os fragmentos que aparentam ser mais interessantes são, efetivamente, os que contêm bainha.

A formação de *calli* está normalmente associada a feridas ou agressão no material vegetal e nesses locais é que se desenvolvem os *calli*. Este facto vai ao encontro dos registos que a zona da bainha, que foi danificada para se conseguir separar a mesma do caule, pode ser uma zona que promove a indução de *calli*. Uma das vantagens da utilização de *calli* no desenvolvimento de novas plantas é que pelo processo de dediferenciação e sucessiva diferenciação celular podem ocorrer variações genéticas e assim os rebentos gerados não serão clones da planta-mãe, assim como o facto de se poder multiplicar estas massas celulares com um rendimento superior ao obtido por micropropagação (Santos *et al.*, 2005; Beltrão *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2013). Isto poderá ser útil no processo de obtenção de exemplares para repovoamento de *A. berlengensis* na ilha da Berlenga, já que a taxa de sucesso de implementação em cultura *in vitro* é bastante baixa, o que significa que se dará origem a clones de poucas plantas-mãe, pelo processo de micropropagação.

Para confirmar qual a taxa de indução de *calli* e averiguar das condições estudadas as que poderiam influenciar esta indução foi redesenhado o ensaio, mas, desta vez com folhas provenientes de plantas que já se encontravam em cultura *in vitro*. Os parâmetros estudados foram individualmente analisados e cada um tinha apenas duas categorias nominais, em que depois foi registado se o fragmento continha (presença) ou não (ausência) *calli*. As categorias são a orientação da folha (direita ou invertida), o estado da folha (saudável ou necrosa), existência de bainha (presença ou ausência) e a existência de cortes na folha (presença ou ausência) (Figura 5.4).

Neste ensaio foi realizado um teste estatístico de Tabelas cruzadas com um total de amostras de 58 fragmentos de folhas de *Armeria berlangensis* (N=58), no qual foi tido em linha de conta o teste de Qui-quadrado de Pearson quando o pressuposto a) não é quebrado e menos de 20% das células esperavam uma contagem menor que 5 e o teste exato de Fisher quando este pressuposto é violado, nomeadamente pelo tamanho da amostra ser pequena.

Pela análise dos dados estatísticos a indução de desdiferenciação celular, indução do aparecimento de *calli* em fragmentos de folhas de *A. berlangensis*, parece estar relacionada (ser dependente) com a presença de bainha (N=33,  $X^2=15,209$  e  $p\text{-value}=0,000$ ) (Teste do qui-quadrado de Pearson) e com o bom estado da folha (folhas saudáveis têm maior probabilidade de desenvolver *calli*) (N=40 e  $p\text{-value}=0,000$ ) (teste exato de Fisher). De todos

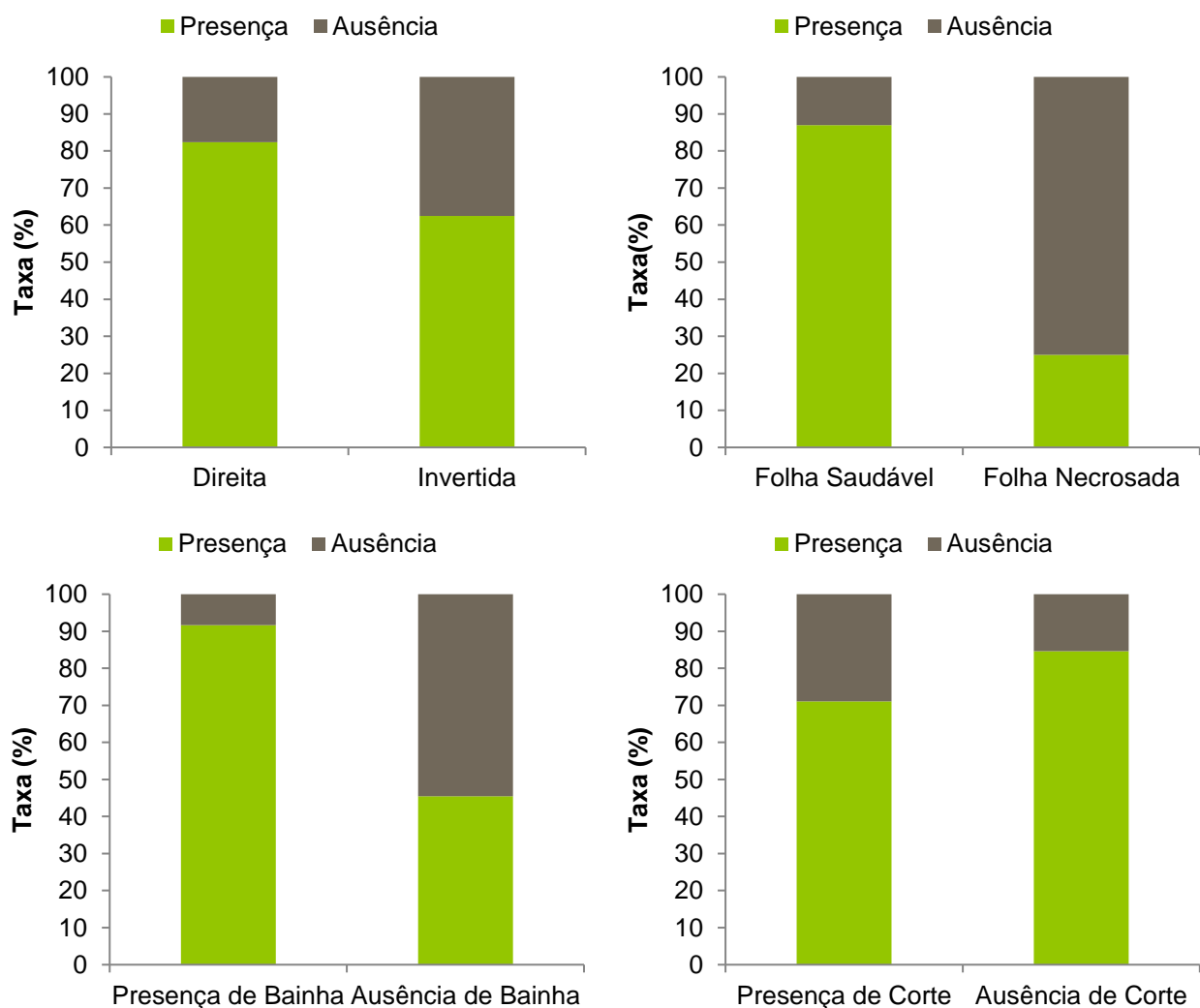


Figura 5.4 Taxas de indução de *calli* apresentadas pelas folhas e fragmentos foliares de *Armeria berlangensis* submetidos a um ensaio de indução de indiferenciação celular com a utilização do meio de cultura MS.3; Análise da taxa de indução em relação à orientação da folha (direita ou invertida), o estado da folha (saudável ou necrosa), existência de bainha (presença ou ausência) e à existência de cortes na folha (presença ou ausência)

os fragmentos analisados (Figura 5.4) a probabilidade de encontrar um que tenha bainha e no qual a indução de *calli* tenha sido bem-sucedida é de 56,9% e a probabilidade de encontrar um fragmento que seja saudável e no qual a desdiferenciação celular tenha ocorrido é de 69,0%. Estas probabilidades são explicadas pelas categorias analisadas, presença de bainha e estado da folha. Por outro lado, a categoria indução de *calli* é independente das categorias orientação do fragmento foliar e presença ou ausência de cortes no fragmento, ou seja, estas duas categorias não explicam a indução de *calli* e por isso a presença ou ausência de *calli* é independente destas categorias. Assim sendo indica-se como preferencial para este tipo de ensaios e método de micropropagação, material vegetal caracterizado por folhas pequenas, em bom estado de conservação e com bainha.

Apesar das concentrações de hormonas utilizadas não terem sido as mesmas, Gourguillon e os seus colaboradores (2018) também obtiveram, com sucesso, indução de *calli*, neste caso em *Armeria maritima*. Apresentaram médias de indução destas estruturas indiferenciadas de aproximadamente 50% em folhas que provinham de cultura *in vitro* e de aproximadamente 43% para folhas que vinham de plantas de campo. Estes valores são superiores aos encontrados para *Armeria berlengensis*. Seria interessante repetir estes ensaios com as mesmas combinações de hormonas e concentrações para se poder afirmar (ou não) se a espécie endémica da Berlenga é mais ou menos propensa a sofrer desdiferenciação.

Por fim foi testada a taxa de sucesso da aclimatização desta espécie, *A. berlengensis*, com das plantas que foram micropropagadas a partir dos explantes caulinares. Para este efeito as plantas foram divididas em duas categorias consoante o tamanho que apresentavam, pequenas e grandes. As pequenas apenas tinham um caule sem ramificações e no máximo 3 cm de altura aproximadamente, enquanto as plantas categorizadas como grandes tinham um caule com pelo menos uma ramificação e uma altura superior a 3 cm, com um máximo de 6 cm aproximadamente (Figura 5.5). Os resultados deste ensaio poderão não ser representativos, já que, se obtiveram poucos rebentos de *A. berlengensis* e por isso apenas se pode fazer a aclimatização com um número reduzido de plantas.



Figura 5.5 Exemplo das plantas da espécie *Armeria berlengensis* designadas por grandes (a) e por pequenas (b).

No caso das plantas categorizadas como pequenas, a taxa de sucesso do processo de aclimatização foi de 80%, como é visível na Figura 5.6. Ao contrário do que aconteceu com os pequenos exemplares, os exemplares denominados de grandes, com mais folhas e ramificações, não tiveram um sucesso elevado, sendo que a taxa de sucesso de aclimatização destas plantas em solo foi de apenas 16,7% o que é bastante baixo. Esta baixa taxa de viabilidade dever-se-á provavelmente à maior dificuldade na remoção total do meio de cultura. A remoção de meio de cultura torna-se mais difícil devido ao tamanho da planta e das ramificações que estas apresentam, devido à sua morfologia, mas também porque esta espécie, neste estado de maturação é propensa à queda de folhas e por isso a lavagem do meio de cultura tem de ser feita com cuidado.

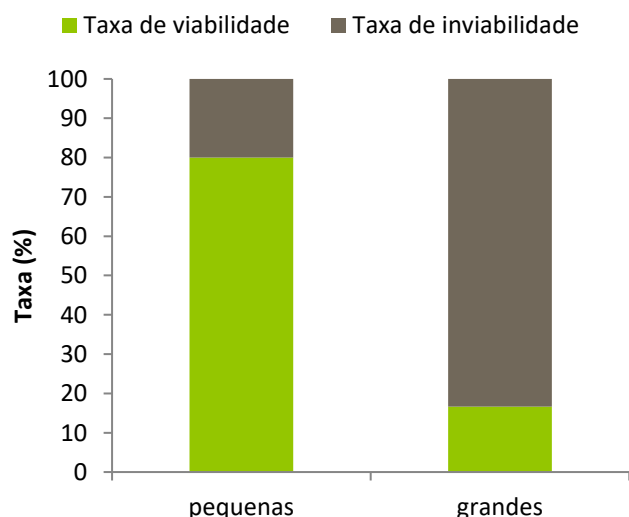


Figura 5.6 Valores percentuais das taxas de viabilidade do processo de aclimatização de *Armeria berlengensis* a condições *ex vitro*.

De um ponto de vista de um melhor aproveitamento de todos os recursos que se recolham na Ilha da Berlenga e se traga para o laboratório é apontado como melhor manter as plantas

maiores para a reprodução vegetativa pela remoção dos rebentos e a aclimatização desses mesmos rebentos, com o objetivo da sua implementação na ilha (Figura 5.5).

Em suma é possível implementar explantes de *Armeria berlengensis* em cultura *in vitro* através da desinfecção dos mesmos com o processo designado por 2, bem como proceder à desdiferenciação celular a partir de folhas, sendo que se deverá ter em conta que folhas de menores dimensões ou fragmentos que apresentem bainha influenciam positivamente o processo e que o estado fitossanitário do material vegetal é fundamental. A fase 4 do processo de cultura *in vitro* é preferível ser realizada com plantas de menores dimensões para que a taxa de sucesso seja superior.

---

## **6 *Herniaria berlengiana***





## 6.1 Introdução

A espécie *Herniaria berlengiana*, devido à sua raridade, dispersão geográfica restrita e estatuto de espécie ameaçada, representa um valioso recurso.

O género *Herniaria* foi alvo de estudos que visam determinar o seu potencial biotecnológico, nomeadamente na área da medicina, tendo sido dado uma ênfase especial aos seus óleos essenciais (Hammami, *et al.* 2015; Mani e Mahalingam, 2017; Al-Snafi, 2018). A nível de estudos que visem a multiplicação vegetativa e estabelecimento de indivíduos em laboratório, não foi encontrada informação científica.

Numa técnica como a micropropagação, o meio de cultura e os seus constituintes bem como os processos de desinfeção utilizados e até o dia de recolha do material (condições meteorológicas e tipo de clima) influenciam o sucesso do processo. O facto de a pouca informação disponível, ser relativa a estudos em espécies de outros pontos geográficos e de outros géneros apenas permite ter umas linhas de guia, não sendo garantia de sucesso.

Pelo facto de esta espécie ser muito difícil de manipular e de distribuição muito restrita, foram feitos ensaios prévios com uma espécie semelhante, do ponto de vista filogenético e ecológico – *Herniaria maritima*. Os resultados obtidos poderão ser extrapolados para a *Herniaria berlengiana*, no entanto estes resultados não se encontram ainda publicados.

O objetivo deste trabalho foi, pois, avaliar o sucesso de diversos processos de desinfeção de *Herniaria berlengiana* e aferir o sucesso da sua adaptação às condições *in vitro* utilizadas, tendo em vista o estabelecimento de protocolos de desinfeção de explantes recolhidos na ilha das Berlengas.

## 6.2 Materiais e Metodologias

### 6.2.1 Recolha de Material

A recolha de material vegetal, constituído por partes aéreas de *Herniaria berlengiana*, foi efetuada no dia 27 de maio. A recolha foi realizada como se encontra descrito no capítulo 2.

### 6.2.2 Desinfeção de *Herniaria berlengiana*

Os rebentos foram preparados como descrito no capítulo 2 e de seguida realizaram-se 4 processos com as especificações descritas na Tabela 5.1, com variação dos agentes

desinfetantes e suas concentrações e tempos de exposição. Após a desinfecção, os explantes foram colocados em placas de Petri de 90 mm, com meio de cultura MS.2.

Tabela 6-I Desinfetantes utilizados em cada um dos processos com as suas respectivas concentrações, por ordem de utilização e tempos de exposição do material vegetal.

Processo 1		Processo 2		Processo 3		Processo 4	
1min	Etanol 96%	1min	Etanol 96%	5min	Etanol 70%	5min	Etanol 70%
20min	Hipoclorito de Sódio 20%	20min	Hipoclorito de Sódio 20%	20min	Hipoclorito de Sódio 20%	20min	Hipoclorito de Sódio 20%
1min	Pomarsol ultra D 0,2g/L	-	-	1min	Pomarsol ultra D 0,2g/L	-	-
4x4min Água destilada estéril							

### 6.3 Resultados e Discussão

A espécie *Herniaria berlingiana* é bastante rara o que torna a sua adaptação a condições *in-vitro* muito importante quanto à conservação da espécie.

Para testar diferentes condições de instalação em assepsia de *Herniaria berlingiana* foram utilizados quatro métodos (descritos na Tabela 6.I). Sabe-se que o dia da recolha, o tipo de material recolhido (estado fitossanitário e biológico da planta-mãe, bem como influências abióticas e bióticas externas à planta) e o local de recolha influenciam a taxa de sucesso do processo de desinfecção, bem como pelo tipo de agente desinfetante, a sua concentração, o tempo de exposição e a possível combinação de diferentes desinfetantes a que o material biológico, neste caso os explantes, estão sujeitos.

Com a análise dos dados obtidos na desinfecção de *Herniaria berlingiana*, Figura 6.1, observa-se que o processo que obteve uma maior taxa de viabilidade (Taxa de sucesso de estabelecimento de *H. berlingiana* em condições de assepsia) foi o processo 3 (taxa de viabilidade de 18,18%), seguido pelo processo 2 (taxa de viabilidade de 17,14%) e com uma taxa inferior, o processo 4 (taxa de viabilidade de 8,57%). O processo 1 não foi bem-sucedido (taxa de viabilidade de 0,00%). No entanto após a realização da análise estatística de Tabelas cruzadas, não foi encontrada dependência direta entre o sucesso do método e o processo de desinfecção utilizado.

Para os processos 1 e 2 a presença do fungicida apenas prejudica o sucesso do processo, mas quando a concentração de etanol é menor (processos 3 e 4) o fungicida permite uma maior viabilidade no estabelecimento dos explantes de *H. berlingiana* em cultura *in vitro*. Quando se compara os processos 1 e 3 observa-se que o aumento do tempo de exposição e a redução da concentração de etanol de 96% para 70%, aumenta a taxa de sucesso do processo de desinfeção. Tal parece demonstrar que o etanol mais diluído danifica menos os explantes e, portanto, aumenta a viabilidade do processo, uma vez que o número de explantes desinfetados pelo processo 3 é maior do que com o processo 1 e o número de explantes mortos no processo 3 é menor do que no processo 1 o que se traduz numa maior taxa de viabilidade do processo. Esta justificação apenas é verdade para os processos 1 e 3 onde os explantes foram também sujeitos ao fungicida. Como o fungicida Pomarsol Ultra D (Bayer, 2009) é de contacto e de prevenção, não seria previsto que este fosse absorvido pelos explantes. No entanto, e apesar de não ser um fungicida sistémico, parece ter sido absorvido pelos tecidos durante a realização do processo de desinfeção 1, o que leva a crer que a utilização de uma solução de etanol a 96% poderá ter facilitado a posterior absorção do fungicida, inviabilizando o processo de desinfeção. Os adjuvantes presentes no fungicida, nomeadamente agentes molhantes poderão também ajudar no contacto com os tecidos.

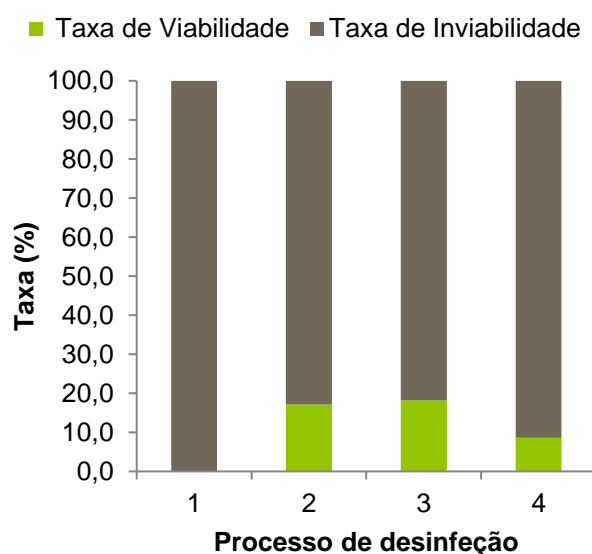


Figura 6.1 Taxas de Viabilidade (cor verde) e Taxas de Inviabilidade (cor cinza) para os vários processos de desinfeção aplicados a diversos exemplares de *Herniaria berlingiana*. Características dos processos nos matérias e metodologias, Tabela 5.1.

Para os processos sem fungicida (2 e 4), observa-se na Figura 6.1 que o processo 2 (maior concentração de etanol utilizada, 96%) é o processo que apresenta uma maior taxa de

viabilidade e de entre os dois processos, e que o processo 4 foi o que apresentou a maior taxa de mortalidade.

Por ter uma taxa de viabilidade muito semelhante à do processo 3 e, ao contrário deste último, não recorrer ao uso de fungicidas (que carecem de autorizações legais e formações para a sua aquisição e utilização) o processo 2 é o melhor para futuros trabalhos com esta espécie, permitindo à partida uma taxa de sucesso de aproximadamente 17% na implementação de explantes de *Herniaria berlingiana* a condições de cultura *in vitro*, com o objetivo final de multiplicação vegetativa, com vista o repovoamento na ilha da Berlenga.

Conseguiu-se responder ao objetivo de estabelecer um protocolo de desinfeção e implementação em cultura *in vitro* de explantes caulinares de *Herniaria berlingiana*, tendo em vista a micropropagação e o repovoamento desta espécie.

---

**7 Impacto do pH, salinidade e fonte de nutrientes em  
*Pulicaria microcephala***



## 7.1 Introdução

A conservação de espécies endêmicas, particularmente as que se encontram em vias de extinção, com recurso a estratégias de repovoamento não é um conceito novo. Muitos dos trabalhos realizados neste âmbito recorrem a técnicas de micropropagação, que permitem a obtenção de exemplares livres de agentes patogénicos e em grandes quantidades (Tavares, *et al.*, 2010, Gantait, *et al.*, 2012, Jacygrad, *et al.*, 2012, Laghmouchi, *et al.*, 2017).

As plantas micropropagadas podem apresentar fenótipos diferentes daqueles que são observados no meio natural, nomeadamente a adoção de padrões de crescimento diferentes e/ou modificação na morfologia de uma ou mais estruturas (El-Zefzafy, *et al.*, 2015; Harmon e Daigh, 2017). Estas diferenças são adaptações ao meio cultura e condições ambientais existentes na cultura *in vitro* (El-Zefzafy, *et al.*, 2015), podendo estas não ser as ideais (Friedman *et al.*, 1989, Dagar, 2005). Estas espécies são normalmente designadas de facultativas, sendo por exemplo designadas de halófitos facultativos, no caso de se estar a falar de tolerância ao sal, (Friedman *et al.*, 1989, Dagar, 2005, Bose, *et al.*, 2014). É por isso necessário compreender que parâmetros abióticos influenciam, e em que medida, o desenvolvimento de uma dada espécie em cultura (Harmon e Daigh, 2017). A capacidade adaptativa é muito importante e quanto maior a plasticidade da espécie para os diferentes fatores, maior a sua adaptabilidade e maior a probabilidade de sobrevivência em condições que se tornem desfavoráveis (Stanienė *et al.*, 2007).

A luminosidade, a temperatura, a fonte de carbono, os sais disponíveis, o valor de pH do meio de cultura e a salinidade - ou teor de Cloreto de Sódio (NaCl) - no meio de cultura são dos parâmetros abióticos mais estudados e controlados em culturas de células e tecidos vegetais (Gantait, *et al.*, 2012; El-Zefzafy, *et al.*, 2015; Laghmouchi, *et al.*, 2017). Por vezes e principalmente na fase de aclimatização pode ter-se em atenção, ainda, o teor de humidade, arejamento ou vento, dependendo das condições presentes no habitat natural da espécie em estudo.

Sendo a Ilha da Berlenga o *habitat* em estudo neste trabalho é importante registar não só os parâmetros mais importantes para o estudo da cultura *in vitro*, mas também, ter em conta o tipo de clima, de solo e que parâmetros de salinidade e pH estão presentes nesta Reserva Natural. O clima da Ilha é mediterrânico, mas fortemente marcado pela influência do Oceano Atlântico, sobretudo a presença de ventos fortes frequentes que fustigam principalmente a costa norte e noroeste da ilha, mais expostas aos elementos. Essa exposição inclui a água do mar, que pela ação da rebentação das ondas e da sua interação com o vento, se dispersa

por grande parte da ilha (Amado, *et al.*, 2007; Daliakopoulos, *et al.*, 2016). Por este motivo, o teor de cloreto de sódio é um dos parâmetros estudados neste trabalho, juntamente com o teor em matéria orgânica e valores de pH, bem como o tipo de textura do solo de diversas zonas da ilha. Estes são parâmetros comumente estudados para realizar a caracterização de solos, principalmente que se destinem à jardinagem e agricultura. Estes parâmetros podem influenciar o tipo de plantas que melhor se adaptem a um solo em particular (Parton, *et al.*, 1987; Daliakopoulos, *et al.*, 2016; Nouri, *et al.*, 2017).

A formação de um solo deriva da ação conjunta de seis fatores, da rocha-mãe que lhe dá origem (por exemplo granito ou basalto), do clima a que está sujeito, da topografia, e dos organismos que sobre, sob e intra-habitam. Depende também da atividade humana e do seu grau de maturação (Zheng, *et al.*, 2016; Gehring, 2017).

A textura do solo, também designada textura de campo, permite avaliar a parcela de terra fina (granulometria inferior a 2 milímetros) presente numa amostra. A textura pode influenciar a retenção de água no solo e o desenvolvimento das raízes. Um solo argiloso irá reter uma quantidade superior de água do que um solo arenoso, o que irá influenciar o teor de humidade a que as espécies estarão expostas (Ribeiro *et al.*, 2013; Cooper, 2015).

O teor de matéria orgânica pode ser avaliado pelo processo de queima, que embora associado a erros, é um processo ainda amplamente realizado (Silva, *et al.*, 1999; Miyazawa, *et al.*, 2000). Estes erros podem ocorrer no processo de pesagem, quer antes da incineração, quer após a incineração (Silva, *et al.*, 1999; Miyazawa, *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2013; Cooper, 2015;). Este parâmetro abiótico influencia a produtividade e o crescimento das espécies pois condiciona a disponibilidade de nutrientes. Este facto leva a que, à semelhança do que ocorre na agricultura, se recorra a fertilizantes quando se realiza o passo de aclimatização para que se aumente a viabilidade das plantas e se garanta o sucesso do processo (Miyazawa, *et al.*, 2000).

O estudo do pH é importante porque influencia a absorção de nutrientes, por parte das plantas, sendo que em solos ácidos estão mais disponíveis metais, tóxicos para muitas espécies vegetais (Dítě, *et al.*, 2011; Daliakopoulos, *et al.*, 2016; Hamzehpour, *et al.*, 2013), como por exemplo o cobre, do que em solos alcalinos (Stanienė *et al.*, 2007). No entanto existem espécies do género *Vaccinium* que estão adaptadas a solos ácidos e cuja produtividade é afetada se o pH do solo for, por exemplo, superior a 5,5 (Tsuda, *et al.*, 2014).



A Salinidade é um parâmetro abiótico bastante estudado (Harmon e Daigh, 2017, Laghmouchi, *et al.*, 2017) e que implica uma maior despesa, apresentando maiores desafios para ser corrigida, principalmente em solos arenosos e franco-arenosos. É um dos fatores que causa maior stress na vegetação não halófitas (Daliakopoulos, *et al.*, 2016, Nouri, *et al.*, 2017). Este stress salino é aumentado quando em interação com falta de nutrientes, escassez de água e solos alcalinos (Daliakopoulos, *et al.*, 2016, Nouri, *et al.*, 2017). Os sais, são compostos formados por iões de Sódio, Potássio, Cálcio, Magnésio, Cloro e outros, os quais se encontram presentes nos solos de forma natural (Brady and Weil, 2008, Gehring, 2017). Os solos arenosos e franco-arenosos por serem de fraca aglomeração permitem mais facilmente o processo de lixiviação o que leva ao escoamento dos sais (Brady and Weil, 2008, Gehring, 2017).

Este trabalho tem como objetivo caracterizar amostras de solo da Ilha da Berlenga, em 12 pontos de interesse, selecionados tendo em conta o processo futuro de repovoamento de três espécies endémicas e em vias de extinção, *Pulicaria microcephala*, *Armeria berlengensis* e *Herniaria berlingiana*. Foram determinados os seguintes parâmetros: textura, teor de matéria orgânica, salinidade e valor de pH. O conhecimento dos parâmetros permitirá uma otimização dos valores de pH e salinidade dos meios de cultura utilizados na multiplicação das espécies alvo, sendo estudado o impacto destes no desenvolvimento de *P. microcephala*.

## **7.2 Material e Metodologia**

### **7.2.1 Análise de amostras de solo da Berlenga**

#### **7.2.1.1 Recolha de material**

As amostras de terra foram recolhidas numa semana sem chuva, com o auxílio de uma pá de jardinagem e separadas em sacos devidamente identificados. Foram recolhidas amostras com pesos compreendidos entre 0,5-2 Kg. Os locais de recolha estão assinalados no mapa que se encontra no capítulo Materiais e Metodologias (capítulo 2) e foram escolhidos pela sua localização e pelo tipo de vegetação presente (Tabela I) (Quelhas dos Santos, 1991; Ribeiro *et al.*, 2013).

Tabela 7-I Código atribuído a cada uma das amostras de solo recolhido com a indicação do tipo de vegetação predominante e também alguma indicação geográfica e observações feitas no local.

Tipo de vegetação predominante	identificação gráfica do local	Código
<b><i>Armeria berlangensis.</i></b>	Cerro do Cão - zona de <i>Armeria berlangensis</i> subsp. <i>Villosa</i>	A
	Vale das Armérias - zona de exclusão com <i>Armeria berlangensis</i>	B
	Miradouro em cima do bairro - zona de <i>Armeria berlangensis</i> subsp. <i>villosa</i> e <i>Armeria berlangensis</i> subsp. <i>Glabra</i>	C
<b><i>Pulicaria microcephala.</i></b>	subida da Placa das Buzinas para o Cerro do Cão	D
sem vegetação	clareira da ilha velha - muitas gaivotas	E
	placa do caminho das buzinas - pedra desfeita	F
<b><i>Carpobrotus edulis</i></b>	1 semana - Acima do Bairro dos Pescadores (fevereiro 2017)	G
	1 ano - Casa da Encosta/Capitania (fevereiro 2016)	H
	2 anos - Zona das Letras, no G de Berlengas (2015)	I
vegetação indiferenciada	Vale dos Fetos - zona de coelhos	J
	Vale das Armérias - Zona de exclusão sem <i>Armeria berlangensis</i>	K
	Planalto em frente à Cisterna Velha	L

#### 7.2.1.1 Tratamento inicial das amostras

Após o transporte das amostras de terra para o laboratório, estas foram submetidas a um processo de secagem por exposição ao ar, à temperatura ambiente, durante uma semana. Após a secagem, a terra foi crivada com o auxílio de um crivo de malha 2 mm. Deste procedimento resultou a separação de duas frações: terra fina ( $\emptyset < 2\text{mm}$ ) e elementos grosseiros ( $\emptyset > 2\text{mm}$ ). Foi utilizado um pilão para desagregar os aglomerados de terra. (Ribeiro *et al.*, 2013, Novoa, *et. al.*, 2013).

A percentagem de terra fina foi calculada pela equação:

$$\% \text{ de terra fina} = \frac{\text{massa de terra original}}{\text{massa de terra fina}} * 100$$

### 7.2.1.2 Textura de Campo

A textura de campo foi aferida a partir de informações que obtida quando se analisa o “comportamento” da parcela de terra fina da amostra quanto à possibilidade de se moldar. Uma porção desta amostra é humedecida e moldada em filamento, e de seguida dobrada em argola. Foi utilizado o quadro 1 em anexo para a determinação da textura das amostras.

Tabela 7-II Método para determinação da textura pelo tato pelas características apresentadas (adaptado de Ribeiro *et al.*, 2013 e Cooper, 2015)

<b>Características observadas</b>	<b>Textura de Campo</b>
Não se pode moldar em filamento Não é pegajosa	Arenosa
Fendilha quando se tenta moldar em filamento, que só se pode formar com muita dificuldade Não é pegajosa	Franco-arenosa
Pode moldar-se em filamento, mas com certa dificuldade Fendilha quando se tentar curvar em argola Não é pegajosa	Franca
Características intermédias entre a anterior e a seguinte	Franco-argilosa
Facilmente moldável em filamento alongado Pode curvar-se em argola com facilidade Pegajosa	Argilosa
Características intermédias entre a anterior e a seguinte	Argilosa-limosa
Facilmente moldável em filamento alongado Pode curvar-se em argola com facilidade Pouco pegajosa	Limosa

### 7.2.1.3 Quantificação da matéria orgânica

Com o intuito de se determinar o teor de matéria orgânica existente com cada uma das amostras de solo da Berlenga foi realizado um método gravimétrico de determinação direta, o método da calcinação. Este consiste em submeter uma quantidade conhecida de amostra a calcinação numa mufla elétrica a 500°C, durante 6 horas, para que toda a matéria orgânica seja destruída e assim pela diferença de pesos se obtenha a quantidade de matéria orgânica presente na amostra. As medições foram realizadas numa balança analítica. Para este ensaio foram submetidas ao processo de Calcinação dois cadinhos independentes de cada um dos

locais de recolha de amostras de solo com uma quantidade de terra inicial registada para cada uma das situações (n=2) (Quelhas dos Santos,1991, Ribeiro *et al.*, 2013).

A classificação das terras em relação ao teor de matéria orgânica é dada pela Tabela 7-III (adaptada de Ribeiro *et al.*, 2013).

Tabela 7-III Classificação de amostras de terra com base no teor em percentagem de matéria orgânica e na textura de campo (adaptado de Ribeiro *et al.*, 2013)

Teor de matéria orgânica (%)		Classificação
Terras de textura Arenosa e Franco-arenosa	Terras de textura Franca, Franco-argilosa, Argilosa, Argilosa-limosa e limosa	
≤0,5	≤1,0	Muito baixo
0,6-1,5	1,1-2,0	Baixo
1,6-3,0	2,1-4,0	Média
3,1-4,5	4,1-6,0	Alto
>4,5	>6,0	Muito alto

O teor de matéria orgânica, em percentagem, é calculado pela seguinte fórmula (Novoa, 2013):

$$\% \text{ de matéria orgânica} = \frac{\text{média dos pesos da terra após mufla}}{\text{média dos pesos da terra pré mufla}} * 100$$

#### 7.2.1.4 Determinação do pH

Para determinar o pH das várias amostras de solo da Berlenga foi utilizado um método laboratorial que consiste na suspensão de uma quantidade de terra fina conhecida de acordo com a fórmula:

$$pH = \text{terra fina (g)} \times 2,5 \text{ mL água destilada}$$

Para realizar a suspensão é necessário agitar a mesma de 15 em 15 minutos durante 1 hora. Após esse tempo é possível realizar a leitura do valor de pH com o auxílio de uma sonda para medição de CE/STD e pH. Foram realizadas 3 leituras por suspensão (Hamzhepour, *et. al.*, 2013).

#### 7.2.1.5 Determinação da Salinidade

Para a determinação da salinidade foram utilizadas as mesmas suspensões das amostras de terra utilizadas na aferição do pH e o mesmo procedimento. A salinidade foi medida pelo

parâmetro de condutividade em ppm (partes por mil) com uma sonda de pH e condutividade. Foram realizadas 3 leituras numa única suspensão de amostra (Hamzehpour, *et. al.*, 2013).

### 7.2.2 Influência do pH e da Salinidade no crescimento de *Pulicaria microcephala*

A avaliação da influência do valor de pH e da concentração de sais, nomeadamente NaCl, no crescimento da espécie *Pulicaria microcephala* foram avaliadas através da preparação de diversos meios MS.4, autoclavados a 121°C durante 20 minutos, com as concentrações de NaCl 0,00g/L, 2,50g/L, 5,00g/L e 10,00g/L e valores de pH 5 e pH 6. Para cada situação foram preparados 5 frascos e em cada um deles foram colocados três explantes (n=15), de acordo com o processo adaptado de Gantait, *et. al.* (2012).

Ao final de 2 meses, sem que se realizasse uma repicagem de manutenção no intervalo da cultura, a altura das plantas foi medida com uma craveira, para assim detetar a influência do pH e da salinidade no crescimento das plantas e possíveis interações dos parâmetros em estudo.

Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de variância com dois fatores (ANOVA F2), tendo todos os requisitos inerentes à realização do método (normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias) sido devidamente validados. Sempre que aplicável, o teste de comparações de Pairwise foi realizado. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de 5% (ou seja, sempre que p-value < 0,05). Quando aplicável, os resultados são apresentados na forma média  $\pm$  desvio-padrão (DP). Todos os cálculos foram realizados com IBM SPSS Statistics 24.

## 7.3 Resultados e Discussão

Para melhor se compreender o crescimento da espécie *Pulicaria microcephala* em cultura *in vitro* e se poder otimizar a maior quantidade de parâmetros possíveis, foram realizados testes de influência do pH e da salinidade do meio, bem como caracterizadas diversas amostras de Terra recolhidas em 12 zonas distintas da ilha da Berlenga (Figura 2.2). Estas análises de terra visam também um futuro estudo para a *Armeria berlengensis* e para a *Herniaria berlengiana*, sendo esse o motivo pelos quais os locais de recolha das amostras não terem sido escolhidos de forma aleatória, mas sim de forma ponderada a recolher dos diferentes tipos de solos onde é possível encontrar e onde se pode vir a repovoar as três espécies endémicas em estudo.

Realizou-se o estudo da textura de campo de cada uma das amostras de terra de diferentes zonas da Berlenga (Tabela anexo XI) observando-se que 50% das amostras correspondem a terras Franco-Arenosas (amostras B, E, G, I, J e K), 33% apresentam características de terras Arenosas (amostras A, F, H e L) e 17% das amostras recolhidas são terras Francas (C e D). Estes dados são importantes para que nos estudos futuros se utilize terras com as características mais adequadas à aclimatização de exemplares de *Pulicaria microcephala*, *Armeria berlengensis* e *Herniaria berlengiana*.

Os diferentes parâmetros estudados, nomeadamente a percentagem de terra fina e de terra Grosseira (Figura 7.1), em conjunto com os valores de matéria orgânica obtidos para cada amostra (Figura 7.2) e as informações da Tabela anexo XI, permitem-nos ter uma caracterização das amostras de uma forma geral. Estes parâmetros são importantes para o crescimento das plantas e as características de cada zona de recolha também poderão ser um dos motivos para o tipo de vegetação ou uma consequência do mesmo.

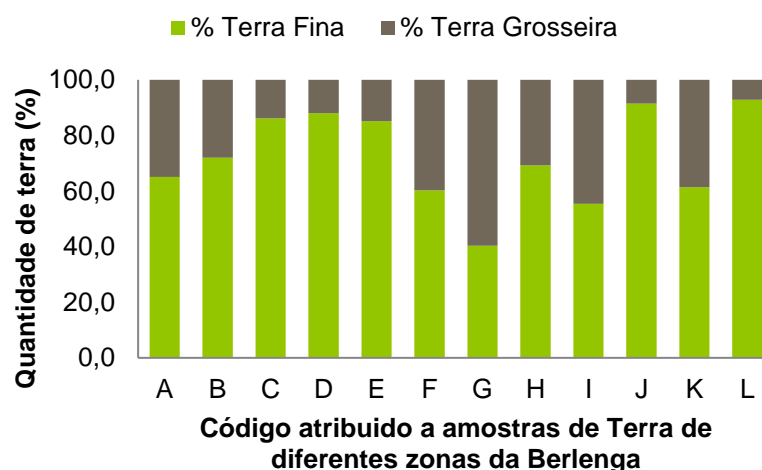


Figura.7.1 Valores Percentuais da quantidade de Terra Fina (cor verde) e de Terra Grosseira (cor cinza) que cada amostra, A a L.

Na maioria das amostras recolhidas não foram obtidos resultados inferiores a 60% de terra fina (Figura 7.1), dando o mínimo de aproximadamente 40% na amostra G, o que permitiu, com base na quantidade recolhida na ilha, realizar os testes seguintes (Quantificação da matéria orgânica, determinação do pH e determinação da Salinidade), já que estes apenas foram realizados nesta parcela.

O *Carpobrotus edulis* é uma espécie invasora proveniente da África do Sul (Novoa *et al.*, 2013) que apresenta um crescimento sobre as outras plantas (Rhodes, *et al.*, 2004), o que

representa uma característica evolutiva na competição espacial, principalmente numa ilha com a Berlenga, isolada e de dimensões reduzidas (Rhodes, et, al., 2004). Esta planta influenciou grandemente o solo da zona G, H e I, já que nestas se observou a presença abundante de matéria orgânica (Figura 7.2) a qual é constituída maioritariamente por partes da planta já secas (Oades, 1988). Esta afirmação é corroborada pelos valores obtidos para este parâmetro, apresentado na Figura 7.2. Tal resultado pôde ser observado em laboratório pela análise visual das amostras (Figura 7.3), indo ao encontro com o já registado por Ana Novoa *et al.* (2013). A percentagem de terra fina varia aproximadamente entre os 40,3% e os 69,2% (Figura 7.1), e contêm entre 62,3 e 86% de matéria orgânica (Figura 7.2). A Amostra H, de entre as três amostras referentes a zonas de remoção do chorão (G, H, I) é a que apresenta menor percentagem de matéria orgânica, sendo que isto poderá dever-se à remoção do chorão ter sido efetuada cerca de um ano antes da recolha da amostra. A amostra I (*C. edulis* removido dois anos antes da recolha da amostra) apresenta um valor de matéria orgânica superior à amostra H e semelhante à amostra da G (*C. edulis* removido uma semana antes da recolha da amostra) o que se poderá dever à presença de folhas secas (Novoa, *et, al.*, 2013) fruto da forma como foi feita a remoção desta espécie infestante. Anteriormente (amostra I) a remoção era apenas superficial, o *C. edulis* era enrolado sobre si e acabava por secar mantendo-se todo o material vegetal nos locais onde se encontravam esses rolos e não se removendo realmente (apenas se arrancava para que ele morresse e não proliferasse mais), posteriormente (amostras G e H) além do enrolamento, a matéria orgânica proveniente do crescimento desta espécie também foi removida, para que o solo da ilha ficasse exposto. Esta alteração no procedimento é importante já que, o chorão apresenta potencial alelopático (libertando algumas substâncias potencialmente nocivas ao desenvolvimento de outras espécies), e as alterações que promove no solo inibem a germinação e o desenvolvimento de novas plantas de outras espécies, em áreas onde este esteja a crescer ou onde se encontrem as suas folhas secas (Lichter, 1998, Hartmann, 2002, Bousquet-Mélou, et. al., 2005, Vila, et. al., 2006 Conser et, al., 2008, Novoa, et, al., 2012). Assim, principalmente, nas zonas onde foi removida esta espécie vegetal, será importante que o dos resíduos orgânicos seja mais baixo para que as espécies endógenas se possam desenvolver, observação também avançada por outros investigadores (Novoa, et, al., 2012, Novoa, et, al., 2013).

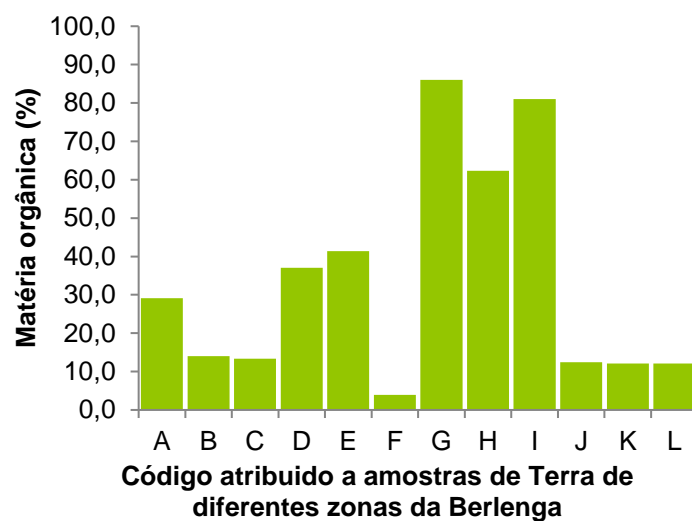


Figura 7.2 Valores percentuais da quantidade de matéria orgânica existente em cada uma das amostras, A - L.

Segundo o estudo de Ana Novoa *et al.*, (2013), que estudou o impacto de *C. edulis* em dunas costeiras, os locais onde se encontrava esta espécie invasora apresentavam valores de pH inferiores e valores de salinidade superiores aos apresentados pelas zonas não invadidas. Neste estudo as análises foram efetuadas logo após a remoção do chorão, sendo, pois, as condições comparáveis com as da recolha da amostra G. Os resultados de salinidade/conductividade não podem ser comparados com os de Ana Novoa *et al.* (2013) já que, não foi possível obter estes valores para a amostra G, onde a remoção de *C. edulis* teria ocorrida há uma semana. Para a amostra I também não foi possível realizar esta contabilização. Nestas amostras não se conseguiu preparar uma mistura aquosa que permitisse realizar a medição da condutividade, como é possível observar na Figura 7.3, formando-se uma pasta que apenas permitiu a medição dos valores de pH. Dever-se-ia ter removido as folhas secas desta espécie (*C. edulis*) antes de se realizar a recolha da amostra de terra, como foi feito por Ana Novoa, *et al.* (2013) para que não se recolhesse tanto material vegetal, mas apenas solo e assim se conseguisse utilizar o mesmo procedimento em todas as amostras. A avaliação dos valores de salinidade (amostras G e I) (Tabela 7-IV) seria muito interessante de se vir a realizar para que se pudesse comparar com este estudo (Novoa *et al.*, 2013) e entender até que ponto, apesar de este ter sido realizado em zonas dunares, os resultados são comparáveis, já que, a textura da terra destas amostras é Franco-Arenosa (amostras G e I) e Arenosa (amostra H) tal e qual como as dunas, zona de estudo de Novoa e colaboradores (2013).



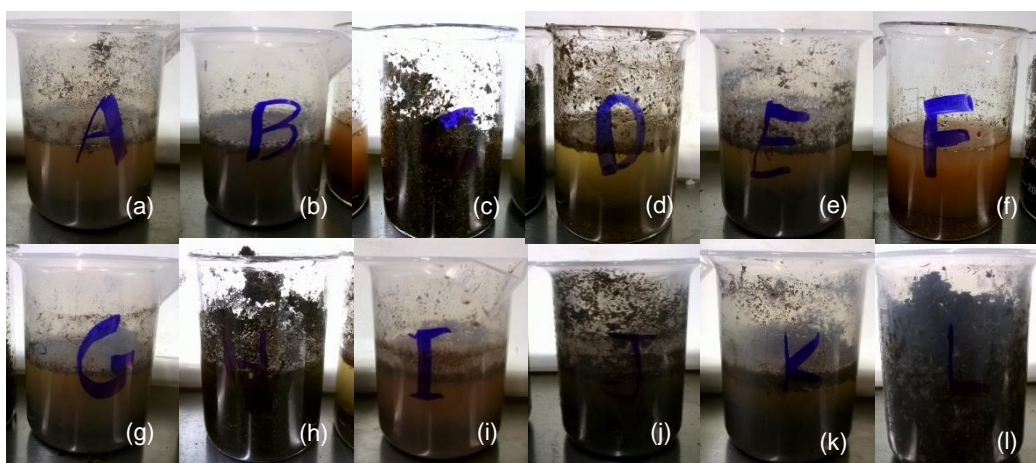


Figura 7.3 amostras de solo misturadas com a quantidade de água necessária para as análises de pH

A observação realizada por Ana Novoa *et al.* (2013) em relação aos valores de pH, em que zonas não afetadas por chorão apresentam um maior valor de pH do que zonas que continham *C. edulis*, é observada também neste estudo. Quando se faz a comparação entre a amostra G e as outras amostras, que dizem respeito às zonas não afetadas pela invasão de *C. edulis* (A, B, C, D, E, F, J, K e L), excetuando as amostras C e J, todas apresentam valores inferiores (Tabela 7-IV). Estes valores inferiores deveriam estar a ser influenciados por outros aspetos que não foram alvos de estudos neste trabalho.

Tabela 7-IV Valor médio de pH e de salinidade (ppm) e os desvios-padrão de cada amostra, A a L. Para as amostras G e I não foi possível determinar o valor de salinidade.

amostra	pH		Salinidade (ppm)	
	média	desvio padrão	Média	desvio padrão
A	6,507	0,104	0,377	0,012
B	6,777	0,080	0,340	0,008
C	5,143	0,098	0,257	0,009
D	6,083	0,184	0,650	0,045
E	7,097	0,029	0,963	0,019
F	6,700	0,141	0,170	0
G	5,963	0,090	Não Calculado	
H	7,260	0,029	0,330	0
I	5,700	0,170	Não Calculado	
J	5,683	0,090	0,683	0,057
K	7,080	0,029	0,343	0,031
L	7,057	0,082	0,12333	0,01247

As amostras que apresentam os valores mais altos de matéria orgânica são as amostras G (86,0%), H (62,3%) e I (81,0%), seguidas das amostras E (41,4%), D (37,1%) e A (29,1%), por ordem decrescente de percentagem (Figura 7.2). Estas 3 amostras últimas são de uma zona sem vegetação onde é possível observar muitas gaivotas-de-patas-amarelas (zona E), a zona (zona D) onde é muito abundante a *Pulicaria microcephala* e a zona A onde é também abundante e foi recolhida *Armeria berlangensis*.

As amostras A, B e C permitem caracterizar as zonas onde ainda ocorre a *Armeria berlangensis*. A amostra A é a que apresenta maior valor de matéria orgânica, 29,1%, em comparação com os valores registados para as amostras B, 14,1%, e C, 13,4%. Este valor poder-se-á dever à elevada concentração populacional de gaivotas-de-patas-amarelas e à sua alimentação, já que nesta zona são avistados vários restos de comida não digerida por esta espécie (observação no local) e também devido ao tipo de vegetação (gramíneas) que aumenta a quantidade de raízes presentes na amostra recolhida e logo a concentração de matéria orgânica (Oades, 1988, Amado, 2007). Das três amostras, a amostra C é a que apresenta um valor de pH inferior e as outras duas amostras, A e B, registaram valores muito

semelhantes de pH (pH  $6,5\pm 0,104$  e pH  $6,8\pm 0,080$  respectivamente). Os valores de salinidade são muito semelhantes,  $0,4\pm 0,012$  ppm,  $0,3\pm 0,008$  ppm e  $0,3\pm 0,009$  ppm para as amostras A, B e C respectivamente. São valores relativamente baixos que conferem às zonas de onde provêm estas amostras a categoria de solos não salinos (Daliakopoulos, *et al.*, 2016).

A amostra D tem uma relevância especial para este estudo já que é a zona onde se encontra a *Pulicaria*, pelo que, em conjunto com as amostras A, B e C, correspondem às zonas onde se encontram as espécies endêmicas da Berlenga. Assim, os valores obtidos para os diversos parâmetros de matéria orgânica, pH e salinidade nesta zona podem ser usados como referência para a micropropagação.

A zona de amostra D apresentou uma grande densidade de vegetação, o que poderá estar na origem do teor de matéria orgânica que aproximadamente 37% (Figura 7.2), que em comparação com as outras amostras é um valor alto. O valor de salinidade ( $0,7\pm 0,045$ ppm) (Tabela 7-IV) é o segundo mais elevado e poderá dever-se ao valor encontrado na zona de recolha E. Esta última apresenta um valor superior de condutividade e é um planalto numa altitude mais elevada do que a zona da amostra D, que é uma zona de declive (Amado, *et al.*, 2007), então devido à textura Franco-Arenosa da zona E permitir o escoamento/lixiviação dos sais pela ação da precipitação e por escorrência dessas águas pluviais ao longo da encosta (zona D), que, por sua vez, é de textura Franca, não permitindo tanto o escoamento das águas, a salinidade da zona da amostra D irá aumentar (Brady and Weil, 2008, Maun, 2009, Gehring, 2017). O valor de pH da amostra D é de  $6,1\pm 0,184$  (Tabela 7-IV). Este dado corroborou a necessidade de se estudar qual o valor de pH que seria ideal para se realizar a micropropagação de *Pulicaria microcephala* porque o valor comumente utilizado em micropropagação é pH 5,7 (Martins, *et al.*, 2011), o qual, quando não é adicionada solução tampão (MES por exemplo), baixa para aproximadamente pH 5 (Woodward, *et al.*, 2006). Com base nestes valores realizou-se o ensaio da influência do pH e/ou da salinidade no crescimento desta espécie endêmica da Berlenga.

A amostra E indica que apesar de um teor relativamente elevado de matéria orgânica a presença de uma população com um elevado número de efetivos de gaivota-de-patas-amarelas, *Larus michahellis* (Naumann, 1840), pode prejudicar o crescimento da flora endógena da ilha. Esta influência negativa poderá ser devida ao comportamento, já observado, da construção de ninhos, por parte destas aves os espécimes de maior porte de *Armeria berlangensis* (ICNF3, 2017; observação na ilha) originando a sua morte. O elevado teor da matéria orgânica e a cor mais esbranquiçada do solo desta região da ilha (observação

no local) poderá ser devido aos dejetos da mesma espécie de aves. O pH desta amostra é de  $7,1 \pm 0,029$  (Tabela 7-IV) o que se pode dever igualmente à presença da população de gaivotas-de-patas-amarelas, já que apesar de os dejetos desta espécie terem uma capacidade nitrificante (Mizota, 2009), nesta zona da ilha são avistados muitos juvenis e vários ninhos o que pode levar também a uma acumulação de penas e penugem, ricas em cálcio e assim pela deterioração das mesmas contribuir para a neutralização dos solos (Fidalgo, 2012). O valor de Salinidade desta zona é de  $1,0 \pm 0,019$  ppm, o valor mais alto regista neste estudo. Esta salinidade poder-se-á dever à exposição à maresia (observação na ilha) e também da atividade piscatória para alimentação por parte das gaivotas-de-patas-amarelas que permanecem neste local (Garcia, *et al.*, 2004, Fidalgo, 2012). Esta acumulação é permitida também pelo tipo de relevo já que, esta amostra foi recolhida num planalto e que apenas devido a precipitação ocorreram escorrências e consequentemente lixiviação, e as amostras foram recolhidas numa altura de fraca pluviosidade.

A amostra J obteve um valor de matéria orgânica inferior ao esperado porque esta é uma zona onde foi possível observar a presença de muitos coelhos, muitas tocas e muitos dejetos (observações no local) pelo que se esperaria uma maior nitrificação, o que não foi observado. Este facto provavelmente dever-se-á à não deterioração desses dejetos e por isso não passariam pelo crivo de 2mm e não estariam na parcela de terra fina, ou a matéria orgânica foi absorvida pela vegetação, mais cerrada nesta zona, sendo formada nomeadamente por fetos (*Asplenium maritimum*) (Amado, *et al.*, 2007).

### 7.3.1 Influência do pH e da Salinidade no crescimento de *Pulicaria microcephala*

Após as análises de solo realizou-se então a cultura *in vitro* de plantas de *Pulicaria microcephala* com meios de cultura aditivados com NaCl em diferentes concentrações e com valores de pH diferentes. Pela análise da Figura 7.4 é possível observar que para os crescimentos a pH 5 as plantas de *Pulicaria* obtiveram tamanhos com diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de valores de condutividade de 2,50ppm, 5,00ppm e 10,00ppm quando comparados com o meio de cultura com valor de condutividade de 0,00ppm.

De facto, denotou-se uma tendência para a redução do tamanho médio do ramo mais alto com o aumento da salinidade/condutividade com diferenças estatisticamente significativas apenas quando comparados os valores de pH 5 e tendo como comparação o valor do tamanho médio do ramo mais alto da situação com 0,00ppm (2,50ppm: ANOVA=0,643; *p-value*=0,014; 5,00ppm: ANOVA=1,114; *p-value*=0,000; 10,00ppm: ANOVA=0,1,076; *p-value*=0,000). O

gênero *Pulicaria* está indicado como halófito ou halófito facultativo, tolerante ao sal (Friedman *et al.*, 1989, Dagar, 2005), o que é corroborado com os resultados obtidos, já que, a *Pulicaria microcephala* se desenvolveu mesmo com uma quantidade elevada de sais, que conferem à terra uma denominação de moderadamente salina (valores de CE compreendidos entre 7,92-15,84ppm / 4–8 dS m<sup>-1</sup>) (Daliakopoulos *et al.*, 2016). Efetivamente, esta espécie aparenta ter o mesmo comportamento de crescimento com valores de condutividade entre os 2,5ppm e os 10ppm. Pode-se então afirmar que esta é uma espécie halófito facultativa, a qual consegue crescer em ambientes/*habitat* com teor salino mais elevado do que esta realmente necessita para se desenvolver e crescer saudável (Friedman *et al.*, 1989, Dagar, 2005, Bose, *et al.*, 2014).

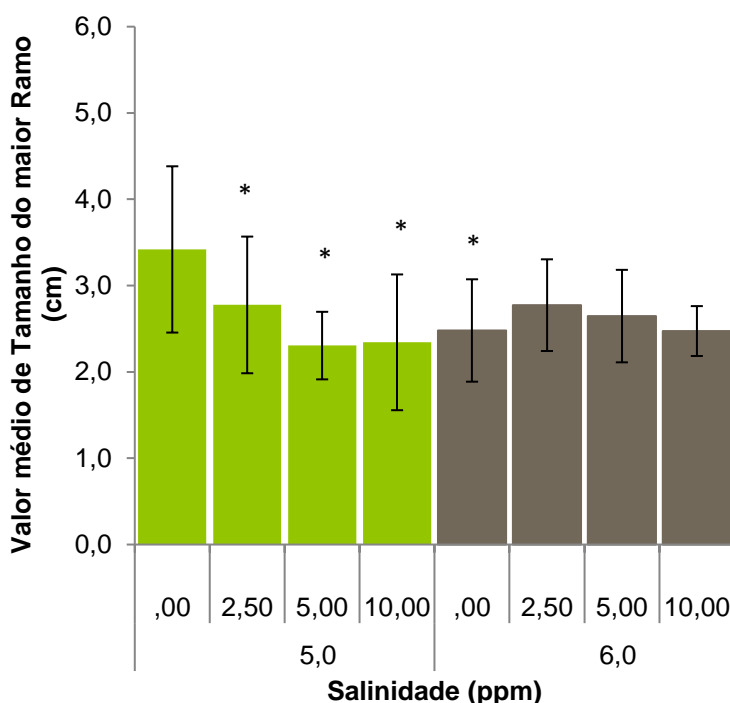


Figura 7.4 Valor médio do tamanho do ramo de maior comprimento de *Pulicaria microcephala* submetida a diferentes combinações de valores de pH 5 (cor verde) e pH6 (cor cinza) com valores de Salinidade de 0,0; 2,5; 5,0 e 10ppm. \*Diferenças estatisticamente significativas com a combinação pH5 e Salinidade 0,00ppm (ANOVA, comparações de *Pairwise*, *p-value* < 0,05; Valores apresentados na forma média ± desvio-padrão.

A análise de variância de dois fatores (ANOVA) demonstrou, ainda, que o pH e a salinidade apresentam interação quando se compara as duas situações com salinidade 0,00ppm. É demonstrado pelo resultado obtido pela interação pH5 e 0,00ppm (ANOVA=0,939, *p-value*=0,000) (comparações por método *Pairwise*) em comparação com a interação pH6 e 0,00ppm, que a primeira situação obteve o melhor resultado de crescimento de *Pulicaria microcephala*. Assim, apesar de as amostras de solos indicarem que estas plantas se

encontram adaptados a um habitat com um valor aproximado de pH  $6,1 \pm 0,184$ , a análise comparativa com os dados do ensaio da Figura 7.4 indica que o valor de pH preferencial para o seu desenvolvimento é o pH de 5. O mesmo foi indicado por Tsuda, *et al.*, (2014) e por outros investigadores por este citado, os quais mencionam que algumas espécies, nomeadamente de mirtilos (*Vaccilum* sp.) preferem valores de pH mais ácidos, inferiores a pH 5,8. No estudo de espécies do género *Plantago* também os valores de pH inferiores ao usualmente estipulado (pH 5,7-5,8) não influenciaram negativamente o crescimento das plantas a estes expostas (Martins, *et al.*, 2011). No entanto é importante ressaltar que o valor de pH pode alterar-se, ao longo do tempo de cultura e este não foi medido no final do presente ensaio para se poder avaliar se se encontraria, ou não, inferior ao valor inicialmente acertado, como ocorreu no trabalho de Martins, *et al.* (2011).

Pode-se concluir com este trabalho que a maior parte do solo da Ilha da Berlenga, segundo as amostras estudadas, é arenoso ou Franco-arenoso e com um teor de matéria orgânica a baixo dos 30%, excetuando as amostras das zonas que foram sujeitas à invasão e remoção de *Carpobrotus edulis*. A hipótese inicial de que os valores de pH fossem mais ácidos nas amostras expostas a esta espécie devido ao seu comportamento alelopático não foi comprovada, uma vez que algumas das outras amostras apresentavam valores de pH inferiores.

Embora a *Pulicaria microcephala* cresça e se desenvolva em todas as conjugações de pH e condutividade estudadas esta espécie apresenta o maior crescimento no meio de cultura com pH 5 e condutividade 0,00ppm. Esta descoberta indica que esta espécie poderá ser halófita facultativa, não existindo carência de suplemento de NaCl, para que se possa realizar a micropropagação da mesma, com vista ao seu repovoamento. Também se chegou à conclusão que não existe necessidade de adicionar tampão (MES) ao meio de cultura, já que esta espécie não necessita de um valor de pH muito específico e constante, o que permite que este procedimento tenha menos custos e que seja realizado de forma mais fácil.

---

## **8 Discussão e Conclusões Gerais**





## 8.1 Discussão e conclusões gerais

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a micropropagação é possivelmente o processo que permitirá repovoar a ilha da Berlenga com indivíduos das três espécies. Este processo é mais facilmente realizado e com um maior sucesso para *Pulicaria microcephala*, depois para *Armeria berlengensis* e é mais difícil para *Herniaria berlengiana*. Apesar de a taxa de sucesso de desinfeção ser maior para *H. berlengiana*, esta não permite uma taxa de multiplicação elevada, já que apresentou um crescimento mais lento e por isso a multiplicação é mais difícil do que para *A. berlengensis*. No entanto é possível afirmar que com exceção da fase 4, da aclimatização a condições *ex vitro* de *Herniaria berlengiana* (ensaio não realizado), se conseguiu com este trabalho estabelecer protocolos de cultura *in vitro* para as três espécies endémicas da ilha das Berlengas e que também existe um protocolo para a germinação de sementes de *Pulicaria microcephala* e de *Armeria berlengensis*.

Foi possível, finalmente, entender um pouco mais sobre estes endemismos e, principalmente no caso de *Armeria berlengensis*, começar a compreender os motivos pelos quais estão em criticamente ameaçadas e as formas como a combater.

Por não se poder trazer para o laboratório muito material vegetal como no caso da *Pulicaria microcephala* (em que um pequeno ramo da planta original é possível dividir em vários explantes), realizaram-se menos tentativas de desinfeção para *A. berlengensis*. Apesar de o processo 6 aplicado a *P. microcephala*, não ter resultado nesta espécie, este corresponde ao processo 3 aplicado aos explantes e folhas de *A. berlengensis*. Por não ser o indicado para uma espécie não significa que não o seja para outras. E por ser um processo mais agressivo, em vez de 10% de hipoclorito de sódio comercial, Domestos, utiliza 20%, foi escolhido para desinfetar *A. berlengensis*. Esta escolha de procedimento baseou-se no facto de as folhas de *A. berlengensis* aparentarem ser mais resistentes do que as folhas de *P. microcephala*. Por isso seria possível pensar que o processo com maior quantidade de hipoclorito de sódio não teria o mesmo impacto negativo, de total inviabilidade de implementação em cultura *in vitro*, sobre a espécie *A. berlengensis* que teve sobre a espécie *P. microcephala*. Normalmente não são testadas combinações de desinfetantes para se entender a sua eficácia separada, o que torna difícil a comparação dos resultados obtidos nestes ensaios com outros trabalhos, apesar da combinação de etanol e hipoclorito de sódio é bastante utilizada, os tempos e as concentrações é que vão sendo alteradas (Cao *et al.*, 2004). Aliado ao facto de os géneros destas espécies de interesse na ilha das Berlengas não serem muito estudados para estes fins, germinação de sementes e micropropagação *in vitro* para obtenção de novas plantas

como objetivo final e o facto de quando o façam, muitas das vezes, não mencionam as taxas de sucesso ou todo o processo utilizado é ainda mais difícil realizar comparações com significado biológico.

O uso de agentes desinfetantes é comumente utilizado nos trabalhos de implementação de culturas vegetais em condições *in vitro*, seja a fonte do material vegetal sementes ou qualquer parte da planta (Zhang *et al.* 2000; Talei *et al.* 2012; Daud *et al.* 2012). Os mais utilizados são o etanol e o hipoclorito de sódio (Barampuram *et al.*, 2014). No entanto sabe-se muitas das vezes estes mesmos agentes podem prejudicar o material vegetal e não permitir o sucesso do processo de desinfeção e implementação em cultura *in vitro* (Barampuram *et al.*, 2014). Esse efeito nocivo poderá dever-se ao tempo de exposição, à concentração, ao tipo de produto ou mesmo a uma combinação de fatores, que devem ser avaliados para cada uma das espécies em particular e para cada tipo de tecido ou porção da planta que se pretende colocar em cultura (Dunfield *et al.*, 2000; Barampuram *et al.*, 2014). Alguns fungicidas danificam o nódulo de desenvolvimento da semente e por isso não permitem a germinação e assim prejudicam a taxa de germinação que se obtém (Rennie *et al.*, 1985; Dunfield *et al.*, 2000), o que poderá ter ocorrido, principalmente no caso de *Armeria berlengensis*. Outros agentes como o hipoclorito de sódio são apontados como em certas concentrações poderem influenciar positivamente a quebra da dormência das sementes e assim beneficiarem até certa medida as taxas de germinação (Hammond, 1959). Barampuram e os seus colaboradores (2014) mencionam que peróxido de hidrogénio é o melhor desinfetante superficial para sementes de algodão e nos resultados deste presente trabalho foi possível ver que, para explantes de *A. berlengensis* este desinfetante ajudou no sucesso do processo mas que ao ser aplicado a *Pulicaria microcephala* o resultado foi o inverso, este não foi o processo que melhor permitiu implementar os explantes em cultura *in vitro*. Este desinfetante é apontado como tendo a capacidade de promover a senescência das plantas, pela sua capacidade oxidativa, podendo ter sido o que ocorreu no caso de *Pulicaria microcephala* (Sairam e Srivastava, 2000; Upadhyaya *et al.*, 2007; Raja *et al.*, 2017). Mesmo que se tivesse aplicado os mesmos processos de desinfeção para cada uma das espécies (*Armeria berlengensis*, *Herniaria berlengiana* e *Pulicaria microcephala*), quer para os explantes quer para as sementes, possivelmente o mesmo processo iria desinfetar de forma diferente determinando diversas taxas de sucesso para todas as situações (Dunfield *et al.*, 2000; Barampuram *et al.*, 2014). O Etanol é descrito como devendo ser o primeiro passo, sendo seguido de outro ou outros agentes, como foi utilizado no presente trabalho em todas as desinfeções. É um forte esterilizante e é fitotóxico e por isso o tempo de exposição deve ser baixo (Sen *et al.*, 2013).

É dito ainda que a sua concentração deve ser entre os 60 e os 90% para que a sua ação bactericida seja mais eficaz (Gross, 1987).

Realizou-se, ainda, o estudo da textura de campo de cada uma das amostras de terra de diferentes zonas da Berlenga (Tabela anexo XI) observando-se que 50% das amostras correspondem a terras Franco-Arenosas (amostras B, E, G, I, J e K), 33% apresentam características de terras Arenosas (amostras A, F, H e L) e 17% das amostras recolhidas são terras Francas (C e D). Estes dados são importantes para que nos estudos futuros se utilize terras com as características mais adequadas à aclimatização de exemplares de *Pulicaria microcephala*, *Armeria berlengensis* e *Herniaria berlengiana*. A terra utilizada na aclimatização foi Siro - Substrato Universal saca de 50L e foi utilizado um fertilizante universal o que torna as condições utilizadas diferentes daquelas a que as espécies estão adaptadas (Capítulo 4, 5 e 7), o que poderá ter influenciado o resultado desses processos, e acima de tudo pode depois comprometer a aclimatização ao *Habitat* natural, ilha da Berlenga.

Em suma, a continuação destes estudos é importante bem como a criação real de clones aclimatizados a condições *ex vitro* para a sua implementação na ilha de forma a cumprir o objetivo de ajudar a combater a extinção destas espécies com o auxílio da micropropagação.

## 8.2 Perspetivas futuras

Como perspetivas futuras são apontadas as análises morfológicas e genéticas das três espécies aqui em estudo, para comparação das espécies dos mesmos géneros, mas que são identificadas e observadas em Peniche, procurando averiguar a existência de eventual hibridação entre as espécies. Desta forma, procurar-se-ia enriquecer o que já se sabe sobre estas espécies e principalmente no caso da *Armeria berlengensis* não se gastar recursos em micropropagar e mesmo germinar indivíduos híbridos, se de facto existirem, que no futuro não irão contribuir para o prevalecer da espécie e se introduzidos na ilha irão competir com as outras plantas pelo mesmo espaço, nutrientes, água e polinizadores.

A aparente tolerância de *P. microcephala*, em relação ao valor de pH no meio de cultura e valores no habitat natural, leva a ponderar se esta poderá vir a desenvolver-se nos locais onde foi removido *Carpobrotus edulis*, após a remoção de folhas secas, uma vez que estes locais vão ter um valor de pH mais elevado. Esta hipótese carece de validação e por isso é proposto realizar-se estudos do cultivo *in vitro* com valores de pH superiores aos estudados e/ou a realização da aclimatização com terra proveniente destes locais, para melhor se entender o comportamento desta espécie em relação ao pH do meio de cultura e do solo, bem como em

relação ao solo. De igual modo estudar a germinação de sementes nessas condições seria importante para se entender se esta será viável ou não.

Apesar de um dos meios de desinfecção utilizados, Domestos (o hipoclorito de sódio), conter uma percentagem de detergente, esta pode não ter sido suficiente para a facilitação da remoção da substância pegajosa que *Armeria berlengensis* possui e por isso como perspectiva futura é apontada a possibilidade de adicionar um passo com um detergente com uma concentração mais forte para ver a possibilidade de esta substância ser removida e as taxas de sucesso de implementação de *A. berlengensis* em cultura *in vitro* seja maior. É sugerido também que, após a fecundação dos ovários se coloquem sacos de organza para que qualquer flor ou semente que se solte, seja recuperada e assim a taxa seja calculada com uma maior confiança. Esta possível queda das sementes das flores vazias prende-se pela falta de ovário e poderá ocorrer naturalmente. Ocasionalmente pela ação do vento, da maturidade da semente, ou mesmo, pela ação da fauna local.

É apontado, como necessário continuar estes estudos, procurando novas combinações de processos de desinfecção para que se tente melhorar a taxa de viabilidade do processo e uma maior quantidade de explantes seja implementada em cultura com sucesso e assim obtendo-se uma maior diversidade genética para iniciar os processos de multiplicação vegetativa. Isto é verdade principalmente no caso de *H. berlengiana*, já que, apesar de se ter conseguido realizar a implementação em cultura *in vitro* e realizar a sua micropropagação, a taxa de sucesso é baixa e ainda falta realizar a aclimatização, já que a obtenção de rebentos micropropagados não foi conseguida em grandes números e o alongamento dos mesmos foi lento, durante o tempo de duração dos trabalhos experimentais.

---

## 9 Bibliografia



- Ahlawat, S., Saxena, P., Ali, A., Khan, S., Abidin, M.Z., (2017). Comparative study of withanolide production and the related transcriptional responses of biosynthetic genes in fungi elicited cell suspension culture of *Withania somnifera* in shake flask and bioreactor. *Plant Physiol. Biochem.* (114) 19–28
- Almada, F., Cruz, M., Gomes, C. T., Gonçalves, D., Rpdrigues, J. P., (1995). Contribuição para a determinação do estatuto taxonómico de *Pulicaria microcephala* Lange (Asteraceae). *Separata do Boletim da Sociedade Broteriana Vol LXVII, 2ª série, Departamento de Bôtanica da Universidade de Coimbra, (6), 43-54*
- Al-Snafi, A.E., (2018). Pharmacological importance of *Haplophyllum* species grown in Iraq- A review. *IOSR Journal Of Pharmacy.* 8(5). 54-62
- Aly, M.A.M., Rathinasabapathi, B., Bhalsod, S., (2002). Somatic embryogenesis in members of the Plumbaginaceae ornamental statice *Limonium* and sea thrift *Armeria maritima*. *Hort. Sci.* 37(7). 1122–1123
- Amado, A., Gafeira, C., Teixeira, A., Preto A., (2007). Plano de ordenamento da Reserva Natural das Berlengas - Relatório para discussão pública, Instituto de Conservação da Natureza, da Biodiversidade. Portugal.
- Amaral- Franco, (1971). *Herniaria berlingiana* (Chaudhri) Nova Fl. Portugal (1) 550
- Amaro, J., (2015). A Paisagem enquanto Objeto Turístico – Caso de estudo da Paisagem Litoral de Peniche integrada no território da Região de Lisboa e Vale do Tejo, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa
- Anderberg, A.A., Eldenäs, P., Bayer, R.J., Englund, M., (2005). Evolutionary relationships in the Asteraceae tribe Inuleae (incl. Plucheae) evidenced by DNA sequences of *ndhF*; with notes on the systematic positions of some aberrant genera. *Organisms Divers. Evol.*, (5) 135-146.
- Baker, K., Richards, A. J., Tremayne, M., (1994). Fitness constraints on flower number, seed number and seed size in the dimorphic species *Primula farinosa* L. and *Armeria maritima* (Miller) Willd. *Neiv Phytot.* (128). 563-570.
- Bakker, J.P., Berendse, F., (1999). Constraints in the restoration of ecological diversity in grassland and heathland. *Trends Ecol. Evol.* (14) 63-68.
- Barampuram, S., Allen, G., & Krasnyanski, S., (2014). Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 118(1). 179–185.
- Barbier, F.F., Dun, E.A., Beveridge, C.A., (2017). Apical Dominance. *Curr Biol.* 27(17). R864-R865
- Baskin, J.M., Baskin, C.C., (2001): *Seeds.* – Acad. Pr., San Diego
- Bayer, (2009). Produtos - Pormasol Ultra D. BAYER CorpScience Protugal em [http://www.bayercropscience.pt/internet/produtos/produto.asp?id\\_produto=66#propriedades](http://www.bayercropscience.pt/internet/produtos/produto.asp?id_produto=66#propriedades) a 22 de Outubro de 2017
- Beltrão, A.E., Beltrão, F.A., Lamoca-Zarate, R., (2008). Cultura in vitro de *Solanumpaludosum*: regeneração. *Revista Caatinga, Mossoró.* 21(4). 79-82
- Berlengas, (2019). Projeto, Natureza, Ameaças, Sensibilização. Em <https://www.berlengas.eu/> a 28 de Setembro de 2019
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., Shabala, S., (2014). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *J Exp Bot.* 65(5).1241–1257
- Bousquet-Mélou, A., Loius, S., Robles, C., Greff, C., Dupouyet, S., Fernandez, C., (2004). Allelopathic potential of *Medicago arborea*, a Mediterranean invasive shrub. *Chemoecology.* (15). 193–198
- Brady, N.C., Weil, R.R., (2008). *The Nature and Properties of Soils.* 14th ed. Pearson Education Inc. Upper Saddle River. New Jersey.
- Brewin, L.E., Mehra, A., Lynch, P.T., Farago, M.E., (2003). Mechanisms of copper tolerance by *Armeria maritima* in Dolfrwynog Bog, North Wales – initial studies. *Env. Geochem. Health.* 25(1). 147–156

- Caldas, F.B. (2011a). *Armeria berlangensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T162004A5527623. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T162004A5527623.en>. em <https://www.iucnredlist.org/species/162004/5527623> a 29 de Setembro de 2019
- Caldas, F.B., (2011b). *Herniaria lusitânica ssp. Berlangiana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T162449A5592185. em <https://www.iucnredlist.org/species/162449/5592185> a 29 de Setembro de 2019.
- Câmara Municipal de Peniche, (2008). Candidatura das Berlengas a Reserva da Biosfera da UNESCO.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S., (2004). Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Letters in Applied Microbiology. (39). 425–430
- Castroviejo, S. Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J., Soriano, C., (1990) (ed.). Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica, Islas Baleares. Vol. II. Platanaceae-Plumbaginaceae (partim.), Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Chaudhri (1968). *Herniaria lusitanica* subsp. *berlangiana*. Meded. Bot. Mus. Herb. Rijks Univ. Utrecht. (285) 343
- Cline, M.G., (1994). The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiologia Plantarum*. 90(1). 230–237
- Conser, C., Connor, E.F., (2008). Assessing the residual effects of *Carpobrotus edulis* invasion, implications for restoration. *Biol. Invasions*. (11). 349-358
- Cooper, M., (2015). Física do Solo - Apostila Cap. 1 - Arquitetura, Propriedades Físicas do Solo Arquivo; Universidade de São Paulo, (1), 1-49.
- Dagar, J.C., (2005). Ecology, management and utilization of halophytes. Bulletin of the National Institute of Ecology. (15). 81–97
- Daliakopoulos, I.N., Tsanis, I.K., Koutroulis, A., Kourgialas, N.N., Varouchakis, A.E., Karatzas, G.P., Ritsema, C.J. (2016). The threat of soil salinity: A European scale review. *Science of The Total Environment* (573). 727–739
- Daud, N.H., Jayaraman, S., Mohamed, R., (2012). An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture. *Asian Pac J Mol Biol Biotechnol*. (20). 55–58
- Daveau, J., (1883). Excursion Botanique aux îles Berlengas et Farilhões. Boletim da Sociedade Broteriana. Coimbra (1), 13-31
- Daveau, J., (1884). *Armeria berlangensis*. Boletim da Sociedade Geographia de Lisboa. 4(9) 426
- Davies, R., Di Sacco, A., Newton, R., (2015). Germination testing: procedures and evaluation - Technical Information Sheet\_13a. Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew
- Deberg, P.C., Maene, L.J., (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort*. 1-3
- Dítě, D., Eliáš, P., Jr., Šuvada, R., Petrášová, A., Piš, V., (2011). The present distribution and state of halophytic communities with *Hordeum geniculatum* in Slovakia. Botanical Garden of P.J. Šafárik University.
- Doods, J.H., Roberts, L.W., (1985). Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, Cambridge 232
- Dunfield, K.E., Siciliano, S.D., Germida, J.J., (2000). The fungicides thiram and captan affect the phenotypic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* strain C1 as determined by FAME and Biolog analyses. *Biol Fert Soil*. (31). 303–309
- Eddo, R., (1993). Sensitivity and involvement of plant growth regulators in differentiation and morphogenesis. *Acta Hort*. (329). 169-176



- El-Tarras, A.E., Attia, A.O., Wad, N.S.A., Dessoky, E.L., Dessoky, S., Mohamed, A.A., (2015). Genetic characterization and in vitro propagation of three medicinal plants collected from high altitude sites. *International Journal of Biosciences*. 6(6). 37-46
- El-Zefzafy, M., Mohamed, W., Boghdady, M., (2015). Effect of pH on growth, protein profiles and anatomy of *Plectranthus amboinicus* explants. *International Journal of Life Science and Pharma Research*. 5(2). 11-21
- Espírito Santo, M.D., Alves, H.N., Caperta, A.D., Moreira, I., (2012). Plantas endêmicas do litoral de Portugal Continental. In: Monteiro, A., Gomes da Silva, F., Jorge, R. *Gestão e conservação da Flora e da Vegetação de Portugal e da África Lusófona*. "In Honorium" do Professor Catedrático Emérito Ilídio Rosário dos Santos Moreira. *IsaPress*. Lisboa. 267-302
- Evans, C.E., Etherington, J.R., (1990) The effect of soil water potential on seed germination of some British plants. *New Phytol.* (115). 539-548
- Farhadi, N., Panahandeh, J., Azar, A.M., Salte, S.A., (2017). Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot (*Allium hirtifolium*). *Sci. Hort.* (218). 80–86
- Fawzy, G.A., Al Ati, H.Y., & El Gamal, A.A., (2013). Chemical composition and biological evaluation of essential oils of *Pulicaria jaubertii*. *Pharmacognosy magazine*. 9(33). 28–32
- Ferreira, M.R., Alves Dos Santos, M.R., Rocha, R., Bragado, A.C., (2013). *Callus* induction from floral explants of Cupuassu. *Universidade Federal Rural do Semi-Árido Mossoró, Brasil, Revista Caatinga*, 26(3). 105-109
- Fidalgo, V., (2012). *Ecologia trófica da Gaivota de patas-amarelas (Larus michahellis) e do Pintainho (Puffinus baroli): uma abordagem isotópica em áreas costeiras e pelágicas*. Departamento de Ciências da Vida. Faculdade de Ciências de Tecnologia. Universidade de Coimbra
- Flora-on, (2019a). *Asterales > Asteraceae > Pulicaria > P. microcephala*. Em <https://flora-on.pt/?q=Pulicaria+microcephala> a 29 de Setembro de 2019
- Flora-on, (2019b). *Caryophyllales > Plumbaginaceae > Armeria > A. berlengensis*. Em <https://flora-on.pt/index.php#/1armeria+berlengensis> a 29 de Setembro de 2019
- Foudah, A.I., Alam, A., Soliman, G.A., Salkini, M.A., Ahmed, E.O. Yusufoglu, H.S., (2016). Pharmacognostical, Antibacterial and Antioxidant Studies of Aerial Parts of *Pulicaria somalensis* (Family: Asteraceae). *Asian Journal of Biological Sciences*, (9). 19-26.
- Francisco-Ortega, J., Park, S.J., Santos-Guerra, A., Benabid, A., Jansen, R. K., (2001). Origin and evolution of the endemic Macaronesian Inuleae (Asteraceae): evidence from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72(1), 77–97.
- Friedman, R.A., Altman, A., Levin, N., (1989). The effect of salt stress on polyamine biosynthesis and content in mung bean plants and in halophytes. *Physiologia Plantarum*. (76). 295–302.
- Gantait, S., Bustam, S., Sinniah, U., (2012). Alginate-encapsulation, short-term storage and plant regeneration from protocorm-like bodies of Aranda Wan Chark Kuan 'Blue' × *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. (Orchidaceae). *Plant Growth Regulation*. 68(2). 302-311
- Gao, Y., Xing, F., Jin, Y., Nie, D., Wang, Y., (2012). Foraging responses of clonal plants to multi-patch environmental heterogeneity: spatial preference and temporal reversibility. *Plant Soil*. (359). 137–147
- García, L.V., Marañón, T., Ojeda, F., Clemente L. Redondo, R., (2002). Seagull influence on soil properties, chenopod shrub distribution, and leaf nutrient status in semi-arid Mediterranean islands. *Oikos*. (98)75–86
- Gehring, C.A., (2017). Chapter 13 - Introduction: Mycorrhizas and Soil Structure, Moisture, and Salinity. *Mycorrhizal Mediation of Soil. Fertility, Structure, and Carbon Storage*. 235-240

- Ghareb, H.E., (2018). In vitro propagation of the rare *Pulicaria incisa* DC. Plant. Journal of Basic and Applied Scientific Research, 8(7). 26-33
- Giménez-Benavides, L., Escudero, A., Pérez-García, F., (2005). Seed germination of high mountain Mediterranean species: altitudinal, interpopulation and interannual variability. Ecol Res. (20). 433–444.
- Godefroid, S., Van de Vyver, A., Vanderborght, T., (2009). Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. Biodiversity and Conservation, 19(5). 1365–1383.
- Godefroid, S., Vyner, A., Vanderborght, T., (2010). Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banques. Biodivers Conserv. (19).1365–1383.
- Gourguillon, L., Rustenholz, C., Lobstein, A., Gondet, L., (2018). Callus induction and establishment of cell suspension cultures of the halophyte *Armeria maritima* (Mill.) Willd. Scientia Horticulturae. (233). 407-411
- Grime, J.P., (2001). Plant strategies, vegetation processes and ecosystem properties. 2nd. ed. Wiley, Chichester, UK
- Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M. & Shaw, S., (1981). A comparative study of germination characteristics in a local flora. J. Ecol. (69). 1017-1059
- Gross, M.A., (1987). Assessment of the Effects of Household Chemicals Upon Individual Septic Tank Performances. Arkansas Water Resources Research Center. University of Arkansas, Fayetteville, AR
- Hammami, A., El Mokni, R., Faidi, K, El Aouni, M.H., Mighri, Z., Joshi, R.K., Volatile Profile of *Herniaria fontanesii* Growing Spontaneously in Tunisia. Journal of Chromatographic Science. 54(3). 291–294
- Hammond, B.L., (1959). Effect of Gibberellin, Sodium Hypochlorite, Light, and Planting Depth on Germination of Guayule Seed. Agronomy Journal. 51(10). 621-623
- Hamzhepour, N., Eghbal, M.K., Bogaert, B., Toomanian, N., Oskoui, R.S., (2013). Spatial prediction of soil salinity using kriging with measurement errors and probabilistic soft data. Arid Land Res. Manag. 27(2). 128–139
- Harmon, J., Daigh, A., (2017). Attempting to predict the plant-mediated trophic effects of soil salinity: A mechanistic approach to supplementing insufficient information. Food Webs. (13). 67-79
- Hartmann, H.E., (2002). Illustrated Handbook of Succulent Plants: Aizoaceae A-E. Springer
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., (1990). Plant propagation: principles and practices. Prentice Hall, New Jersey, 246-247
- Hassler, M., (2019). World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World (version Nov 2018). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist (Roskov, Y., Ower, G., Orrell, T., Nicolson, D., Bailly, N., Kirk, P.M., Bourgoin, T., DeWalt, R.E., Decock, W., Nieukerken, E. van, Zarucchi, J., Penev, L., (eds.). Digital resource at [www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands.
- Hölzel, N., Otte, A., (2004). Ecological significance of seed germination characteristics in flood-meadow species. Flora, (199). 12-24
- Hörandl, E., Stuessy, T.S., (2010). Paraphyletic groups as natural units of biological classification. TAXON 59(6). 1641–1653
- Hroudová, Z., Zákavský, P., (2003). Germination responses of diploid *Butomus umbellatus* to light, temperature and flooding. Flora (198). 37–44
- Hussien, T., El-Toumy, S.A. Hassan, H.M., Hetta, M.H., (2016). Cytotoxic and antioxidant activities of secondary metabolites from *Pulicaria undulata*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 8(9). 150-155
- IAPTC, (1985), Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Irgan Culture Terminology. Nwesletter, (45). 15-22

- ICNF, (2019). Áreas Protegidas/Reservas Naturais/ Reserva Natural das Berlengas. Em <http://www2.icnf.pt/portal/ap/r-nat/rnb> a 25 de Setembro de 2019
- ICNF, (2019a). ÁREAS PROTEGIDAS / Reservas Naturais / Reserva Natural das Berlengas / Classificação | Caracterização; aceso no link: <http://www2.icnf.pt/portal/ap/r-nat/rnb/class-carac> a ultima vez a 20 de Setembro de 2019
- Jacygrad, E., Ilczuk, A., Mikos, M., Jagiello-Kubiec, K., (2012). Effect of medium type and plant growth regulators on the in vitro shoot proliferation of *Cotinus coggygria* Scop. 'ROYAL PURPLE'. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus 11(5). 143-151
- Jensen, K., (2001). Dormancy patterns and seed bank type of 20 temperate fen-grassland species. EcoSys (34). 87-105
- Knödler, C., (2001). On the germination behaviour of widespread *Festuca-Brometea* and *Molinietalia*-species. University Giessen
- Kotorová, I., Lepš, J., (1999). Comparative ecology of seedling recruitment in an oligotrophic wet meadow. J. Veg. Sci. (10). 175–186
- Lack, A.J., Evans D.E., (2001). Instant Notes - Plant Biology, 1ª edition, BIOS, UK, Section F – Growth and development, 67-74.
- Laghmouchi, Y., Belmehdi, O., Bouyahya, A., Senhaji, N., Abrini, J., (2017). Effect of temperature, salt stress and pH on seed germination of medicinal plant *Origanum compactum*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. (10). 156-160
- Lange, J., (1883). Boletim da Sociedade Broteriana. (1). 42-50
- Lecoq, M., (2010). Censo da População Reprodutora da Cagarra na Ilha da Berlenga em 2010. Relatório da Acção A – Actividade 2. Projecto FAME. Sociedade Portuguesa para o Estudo das Aves, Lisboa
- Lowe, F., (1833). *Armeria maderensis*; Transactions of the Cambridge Philosophical Society; (6) 12
- Lowry, D.B., (2012). Ecotypes and the controversy over stages in the formation of new species. Biological Journal of the Linnean Society. (106). 241–257
- Lucas, M.A.K., Fagundes, J.D., Pereira, D.D., Sarmiento, M.B., (2007). Micropropagação de violeta-africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.): efeito da Benzilaminopurina na multiplicação. Ciência E Agrotecnologia, 31(5), 1380–1385.
- Mani, A., Mahalingam, G., (2017). Effect of anti-biofilm potential of different medicinal plants: review. Asian J Pharm Clin Res.10(2). 24-32
- Martins, L., Pereira, A., França, S., Bertoni, B., (2011). Micropropagação e conservação de *Macrosiphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma in vitro. Ciência Rural, Santa Maria. 41(3). 454-458
- Maun, M.A., (2009). The Biology of Costal Sand Dunes. Oxford University Press
- Milberg, P., (1994). Annual dark dormancy cycles in buried seeds of *Lychnis flos-cuculi*. Ann. Bot. Fenn. (31). 163–167
- Miyazawa, M., Pavan, M.A., Oliveira, E.L., Ionashiro, M., Silva, A.K., (2000). Gravimetric determination of soil organic matter. Brazilian Archives of Biology and Technology. 43(5). 475-478.
- Mizota, C., (2009). Temporal variations in the concentration and isotopic signature of ammonium- and nitrate–nitrogen in soils under a breeding colony of Black-tailed Gulls (*Larus crassirostris*) on Kabushima Island, northeastern Japan. Applied Geochemistry. 24(2). 328–332
- Morais, L., Santos, C., Vicente, L., (1998). Pupulation increase of Yellow-legged Gulls *Larus cachinnans* Breeding on Berlenga Island (Portugal), 1974-1994. SULA 12(1). 27-37
- Murashige, T., Skoog, F.A., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. (15). 473-497~
- Nascimento, T., (2016). Caracterização de uma população insular de roedores invasores. O caso do rato preto (*Rattus rattus*) na ilha da Berlenga.; Universidade de Aveiro
- Nascimento, T., (2018). O papel da pesca comercial na conservação da população de galheta *Phalacrocorax aristotelis* do arquipélago das Berlengas. RIA Universidade de Aveiro

- Neves, C.P., (2000). Estudo de Marcadores Bioquímicos e Celulares da Rozogénese Adventícia em Sobreiro e Videira Micropropagados. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa
- Nieto, G., (2014). Patterns and processes in plant phylogeography in the Mediterranean Basin. A review. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. (16). 265-278
- Nieto, G., Fuertes, J., Rosselió, J., (2002). Reticulation or divergence: the origin of a rare serpentine endemic assessed with chloroplast, nuclear and RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution*. (231). 19-38.
- Nikpay, A., Soltani, M., (2018). In vitro anti-parasitic activities of *Pulicaria dysenterica* and *Lycopus europaeus* methanolic extracts against *Trichomonas gallinae*. *Journal of Herbmed Pharmacology*. 7(2). 112-118
- Nouri, H., Chavoshi Borujeni, S., Nirola, R., Hassanli, A., Beecham, S., Alaghmand, S., Mulcahy, D., (2017). Application of green remediation on soil salinity treatment: A review on halophytoremediation. *Process Safety and Environmental Protection*. (107). 94–107
- Novoa, A., González, L., Moravcová, L., Pyšek, P., (2012). Effects of soil characteristics, allelopathy and frugivory on establishment of the invasive plant *Carpobrotus edulis* and a co-occurring native, *Malcolmia littorea*. *PLoS ONE*. (7). 1-11
- Novoa, A., González, L., Moravcová, L., Pyšek, P., (2013). Constraints to native plant species establishment in coastal dune communities invaded by *Carpobrotus edulis*: Implications for restoration. *Biological Conservation*. (164). 1-9
- Oades, J.M., (1988). The retention of organic matter in soils. *Biogeochemistry*. (5) 35-70
- Pacheco, G., Garcia, R., Lugato, D., Vianna, M., Mansur, E., (2012). Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. *Sci. Hort.* (144). 42–47
- Parton, W.J., Schimel, D.S., Cole, C.V., & Ojima, D.S., (1987). Analysis of factors controlling soil organic matter levels in great plain grasslands. *Soil Science Society of America Journal*. (51). 1173–1179
- Patzelt, A., Wild, U., Pfenhauer, J., (2001). Restoration of wet fen meadows by topsoil removal: vegetation development and germination biology of fen species. *Restor. Ecol.* (9). 127–136
- Pereira Coutinho, A., Dinis, A. M., (2009). Palynology of the genus *Pulicaria* Gaertn., (Asteraceae, Inuleae, Inulinae) in the Iberian Peninsula. *Microscopy and Microanalysis*, 15(S3), 33–34.
- Phillips, L.D.J., (1975). Apical dominance. - *Annu. Rev. Plant Physiol* (26) 342-367
- Piñeiro, R., Fuertes, J., Sequeira, M., Nieto, G., (2009). Low genetic diversity in the rare madeiran endemic *Armeria maderensis* (Plumbaginaceae). *Folia Geobot.* (44). 65-81
- Piñeiro, R., Widmer, A., Aguillar, J., Feliner, G., (2011). Introgression in peripheral populations and colonization shape the genetic structure of the coastal shrub *Armeria pungens*. *Heredity*. (106). 228-240
- Quelhas dos Santos, J. (1991). Fertilização: Fundamentos da utilização de adubos e corretivos. Publicações Europa-América, Mem-Martins, Portugal.
- Quinn, J.A., (1978). Plant ecotypes: ecological or evolutionary units?. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. (105) 58–64
- Raja, S., Ramesh, V., Thivaharan, V., (2017). Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Calliandra haematocephala* leaf extract, their antibacterial activity and hydrogen peroxide sensing capability. *Arabian Journal of Chemistry*.(10). 253–261.
- Ramos Lopes, M.H. Carvalho, L.S., (1990). Lista de Espécies Botânicas a Proteger em Portugal Continental. Relatório interno, Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza. Lisboa
- Rennie, R.J., Howard, R.J., Swanson, T.A., Flores, G.H.A., (1985). The effect of seed-applied pesticides on growth and N<sub>2</sub> fixation in pea, lentil and fababean. *Can J Plant Sci*. (65). 23–28

- Richards A. J. (1986). Plant breeding systems. London & New York: Allen & Unwin.
- Rusch, G., Fernandez-Palacios, J.M., (1995). The influence of spatial heterogeneity on regeneration by seed in a limestone grassland. *J. Veg. Sci.* (6). 417–426
- Sairam, R., Srivastava, G., (2000). Induction of Oxidative Stress and Antioxidant Activity by Hydrogen Peroxide Treatment in Tolerant and Susceptible Wheat Genotypes. *Biologia Platarum.* 43(3). 381-386
- Sakhanokho, H.F., Zipf, A., Rajasekaran, K., Saha, S., Sharma, G.C., (2001). Induction of highly embryogenic calluses and plant regeneration in Upland and Pima cottons. *Crop Sci.* (41). 1235-1240.
- Salisbury, E. J., (1967). The Reproductive Biology of *Pulicaria vulgaris* Gaertn. and its Diminishing Frequency. *Annals of Botany*, 31(4), 699–712.
- Santos, B. R. Paiva, R., Martinotto, C., Cravo, N., Paiva, P., (2005). Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). *Ciência Rural*, Santa Maria, 35(3), 510-514
- Santos, N., (2015). Tourism environmental attitudes in Berlengas Biosphere Reserve, Portugal. Instituto Politécnico de Leiria – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche.
- Schütz, W., (1997). Primary dormancy and annual dormancy cycles in seeds of six temperate wetland sedges. *Aquat. Bot.* (59). 75–85
- Schütz, W., (2000). Ecology of seed dormancy and germination in sedges (*Carex*). *Perspec. Plant Ecol. Evol. System.* (3). 67–89
- Sen, M.K., Jamal, A.H., Nasrin, S., (2013). Sterilization factors affect seed germination and proliferation of *Achyranthes aspera* cultured *in vitro*. *Environmental and Experimental Biology.* (11) 119–123
- Shahat, A.A., Mahmoud, E.A., Al-Mishari, A.A., Alsaid, M.S., (2017). Antimicrobial activities of some saudi arabian herbal plants. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines.* 14(2). 161–165
- Silva, A., Torrado, P., Abreu, J., métodos de quantificação da matéria orgânica do solo. *R. Un. Alfenas, Alfenas.* (5). 21-26
- Stampfli, A., Zeiter, M., (1999). Plant species decline due to abandonment of meadows cannot be easily reversed by mowing. A case study from the Southern Alps. *J. Veg. Sci.* (10). 151–164
- Stanienė, G., Stanytė, R., (2007). Adaptation of American cranberry to substrate pH *in vitro* and *ex vitro*. *Zemes Ukie Mokslai.* 14(2). 40-44
- Sutherland, S., Delph, L.F., (1984). On the importance of male fitness in plants: patterns of fruit-set. *Ecology.* (65). 1093–1104.
- Syngenta, (2017). Produtos – Rodomil Gold MZ Pepite. Syngenta Portugal em <https://www.syngenta.pt/product/crop-protection/fungicida/ridomil-gold-mz-pepite> a 22 de Outubro de 2017
- Talei, D., Valdiani, A., Abdullah, M.P., Hassan, S.A., (2012). A rapid and effective method for dormancy breakage and germination of King of Bitters (*Andrographis paniculata* Nees.) seeds. *Maydica.* 57(2). 98–105
- Tauleigne-Gomes, C., Draper, D., Marques, I. Rosselló-graell, A. (2004). Flora e Vegetação do Arquipélago das Berlengas. Componente Vegetal do Plano de Ordenamento da Reserva Natural das Berlengas. ICN - Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.
- Tauleigne-Gomes, C., Lefèbvre, C., (2005). Natural Hybridisation between two costal endemic species of *Armeria* (Plumbaginaceae) from Portugal. 1. Population *in situ* investigations. *Plant Syst Evol.* (273). 225-236
- Tauleigne-Gomes, C., Lefèbvre, C., (2008). Natural Hybridisation between two costal endemic species of *Armeria* (Plumbaginaceae) from Portugal. 2. Ecological investigations on a hybrid zone. *Plant Syst Evol.* (250). 215-230

- Tavares, A.C., Salgueiro, L., Canhoto, J., Paiva, J., (2010). Iberian endemic Apiaceae: a reassessment for conservation purposes in Portugal - Apiaceae endémicas ibéricas: una reevaluación de las propuestas de conservación en Portugal. *Stud. Bot.* (29). 13-37
- Terry, J., Sutcliffe, A., (2014). Cleaning seed collections for long-term conservation - Technical Information Sheet\_14. Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew
- Thompson, K., Grime J.P., Mason, G., (1977). Seed germination in response to fluctuating temperatures. *Nature*. (67). 147–149
- Touzard, B., Amiaud, B., Langlois, E., Lemauviel, S. Clément, B., (2002). The relationships between soil seed bank, aboveground vegetation and disturbances in an eutrophic alluvial wetland of Western France. *Flora* (197). 175–185
- Tsuda, H., Kunitake, H., Aoki, Y., Oyama, A., Tetsumura, T., Komatsu, H., Yoshioka, K., (2014). Efficient In Vitro Screening for Higher Soil pH Adaptability of Intersectional Hybrids in Blueberry. *American Society for Horticultural Science*. 49(2). 141-144
- Turland, N.J., Wiersema, J.H., Barrie, F.R., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Kusber, W.-H., Li, D.-Z., Marhold, K., May, T.W., McNeill, J., Monro, A.M., Prado, J., Price, M.J. & Smith, G.F., (2018). International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China. (Eds.). *Regnum Vegetabile* 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books
- Upadhyaya, H., Khan, M.H., Panda, S.K., (2007). Hydrogen Peroxide induces oxidative stress in detached leaves of *Oryza sativa* L. *Gen. Appl. Plant Physiology*. 33(1-2). 83-95
- Vilà, M., Tessier, M., Suehs, C., Brundu, G., Carta, L., Galanidis, A., Lambdon, P., Manca, M., Médail, F., Moragues, E., Traveset, A., Troumbis, A., Hulme, P., (2006). Local and regional assessments of the impacts of plant invaders on vegetation structure and soil properties of Mediterranean islands. *Journal of Biogeography*. (33). 853-861
- Vilà, M., Tessier, M., Suehs, C.M., Brundu, G., Carta, L., Galanidis, A., Lambdon, P., Manca, M., Médail, F., Moragues, E., Traveset, A., Troumbis, A.Y., Hulme, P.E., (2006) Local and regional assessments of the impacts of plant invaders on vegetation structure and soil properties of Mediterranean islands. *Journal of Biogeography* (33). 853–861
- Walter, K.S., Gillet, H.J., (1997). Red List of Threatened Plants. Eds. IUCN
- Went, F.W., Thimann, K.V., (1937). *Phytohormones*. The Macmillan Company, New York.
- Woodward, A.J., Bennett, I.J., Pusswonge, S., (2006). The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on in vitro shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*. *Scientia Horticulturae*. 110(2). 208–213
- Yan, M.-M., Xu, C., Kim, C.-H., Um, Y.-C., Bah, A.A., Guo, D.-P., (2009). Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). *Sci. Hort.* (123) 124–128
- Yang, Q., Carrillo, J., Jin, H., Shang, L., Hovick, M., Nijjer, S., Gabler, C.A., Li, B., Sieman, E., (2013). Plant-soil biota interactions of an invasive species in its native and introduced ranges: Implications for invasion success. *Soil Biology and Biochemistry*. (65). 78-85
- Zar, J., (2009). *Biostatistical analysis*. vol.5th Edition. NJ:Pearson PrenticeHall, Upper Saddle River
- Zhang, B.-H., Liu, F., Yao, C.-B., (2000). Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* (60). 89–94
- Zheng, G., Jiao, C., Zhou, S., Shang, G., (2016). Analysis of soil chronosequence studies using reflectance spectroscopy. *International Journal of Remote Sensing*. 37(8). 1881-1901

---

## **10 Anexos**





Anexo I Formulação do Meio Murashige & Skoog suplementado com Vitaminas Gamborg B5 utilizado para a realização dos meios MS.1 e MS.2 e MS.3

Micro Elementos	mg/l	µM
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0.025	0.11
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0.025	0.10
<b>FeNaEDTA</b>	36.70	100.00
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6.20	100.27
<b>KI</b>	0.83	5.00
<b>MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	16.90	100.00
<b>Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0.25	1.03
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	8.60	29.91
Macro Elementos	mg/l	mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	332.02	2.99
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170.00	1.25
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900.00	18.79
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	180.54	1.50
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1650.00	20.61
Vitaminas	mg/l	µM
<b>myo-Inositol</b>	100.00	554.94
<b>Ácido Nicotínico</b>	1.00	8.12
<b>Piridoxina HCl</b>	1.00	4.86
<b>Tiamina HCl</b>	10.00	29.65

Total concentração de micro e macronutrientes, incluindo vitaminas: 4414.09 mg/l

Murashige T. and Skoog F., *Physiol. Plant*, 15, 473 (1962). In <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0231/name/murashige-skoog-medium-including-b5-vitamins> 3/7/2017

Anexo II Formulação do Meio Murashige & Skoog suplementado com Vitaminas Gamborg B5 e tampão MES utilizado para a realização do meio MS.4.

Micro Elementos	mg/l	µM
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.11
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	100.27
KI	0.83	5.00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.90	100.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	1.03
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60	29.91
Macro Elementos	mg/l	mM
CaCl <sub>2</sub>	332.02	2.99
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	1.25
KNO <sub>3</sub>	1900.00	18.79
MgSO <sub>4</sub>	180.54	1.50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00	20.61
Buffer	mg/l	mM
MES	500.00	2.35
Vitaminas	mg/l	µM
Glicina	2.00	26.64
myo-Inositol	100.00	554.94
Ácido Nicotínico	0.50	4.06
Piridoxina HCl	0.50	2.43
Tiamina HCl	0.10	0.30

Concentração total de micro e macro elementos incluindo o tampão MES: 4802.09 mg/l

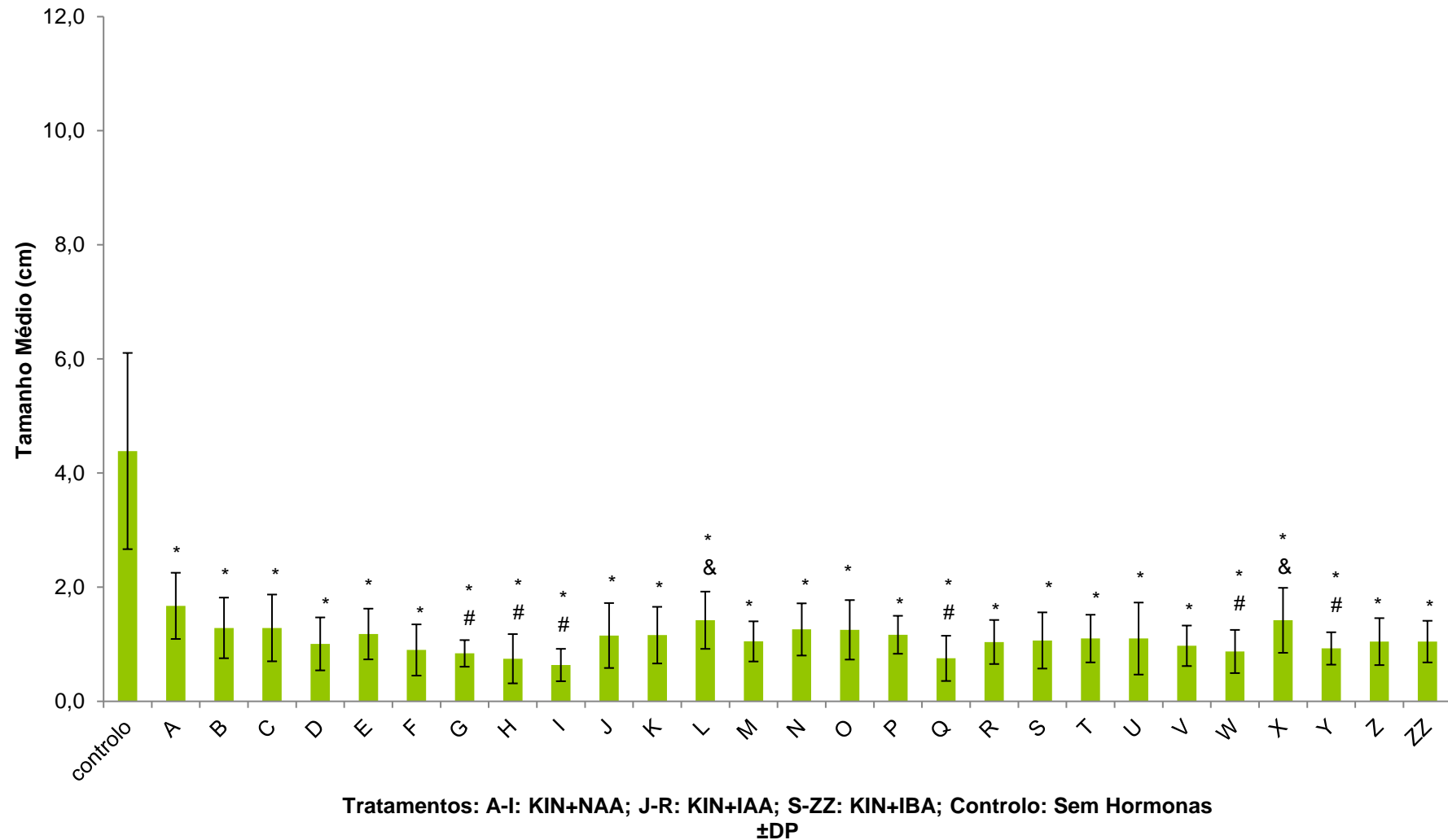
Concentração total de micro e macro elementos, incluindo vitaminas e tampão MES: 4905.19 mg/l

Murashige T. and Skoog F., *Physiol. Plant*, 15, 473 (1962). In <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0255/name/murashige-skoog-medium-incl-vitamins-mes> 3/7/2017

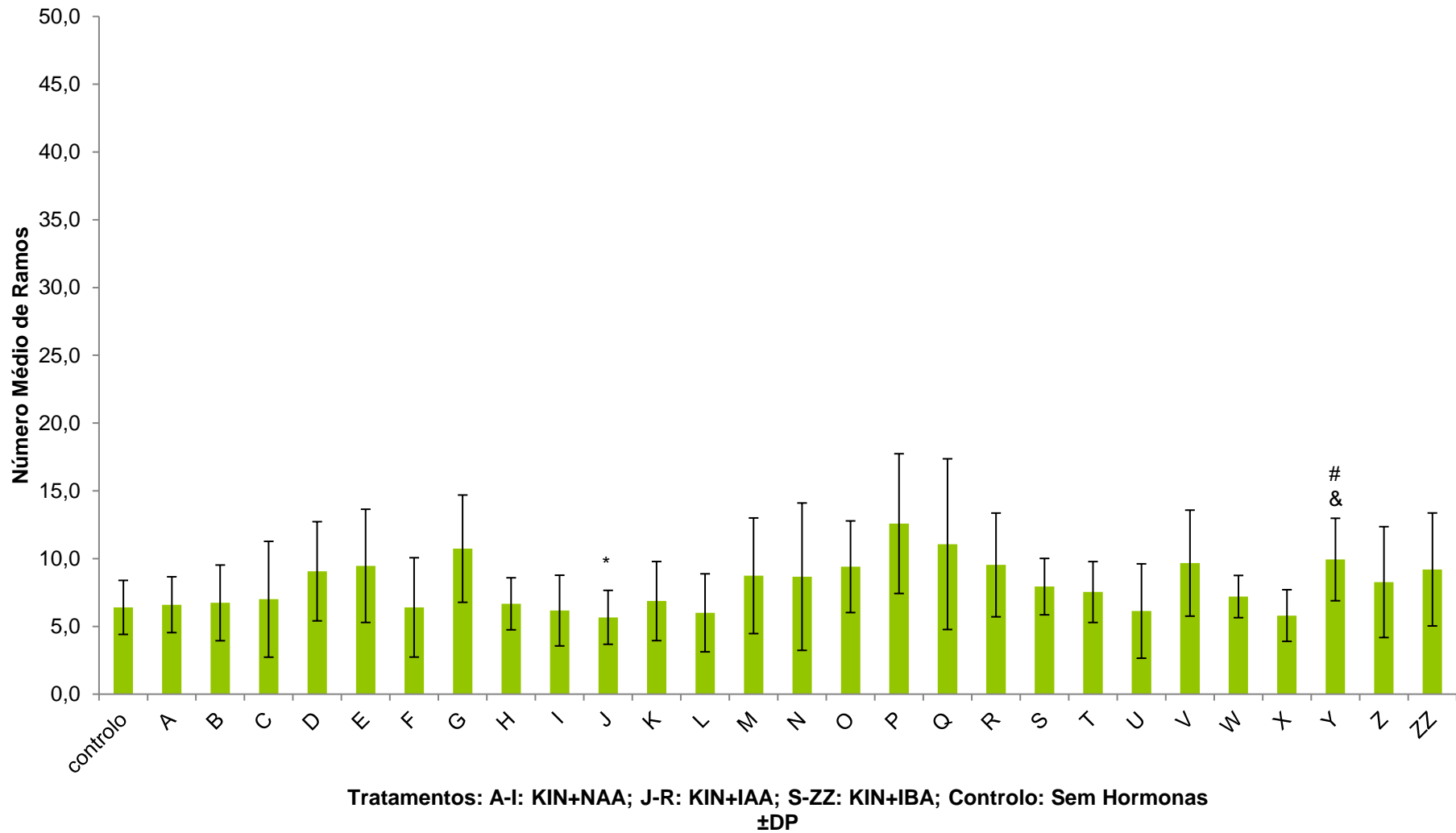
Anexo III Identificação do equipamento ou reagente utilizado e a sua informação útil, nomeadamente e quando aplicável a marca, modelo, país de fabrico e precisão.

<b>Equipamento/Reagente</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>	<b>País</b>	<b>Precisão</b>
Autoclave	Ajc	88L	Portugal	±3°C
Balança	Sartorius	TE1245	Alemanha	±0,1mg
Câmara de cultivo	Aralab	CP500	Portugal	-
Câmara de Fluxo	Telstar	Bio II advance	Japão	-
Craveira	Indefinido	-	-	±0,05cm
Lâminas de bisturi	Duchefa Biochemie	S3201 (nº11)	Holanda	-
Lupa Binocular	Carl Zeiss	Stemi 2000-C	Inglaterra	-
Mufla	Nabertherm	Controller B170	Alemanha	-
Medidor de pH	WTW – inoLAB	pH 7110	Alemanha	±0,01pH
Sala de temperatura controlada	Friga-Bohn	-	Reino Unido	-
Selador de Mangas	JP Selecta S.A.	S-400	Espanha	-
Sonda de pH e Condutividade	Hanna	HI98130	Itália	Temperatura ±0.5°C EC/TDS ±2% f.s. pH ±0.01
Fitoagar	Duchefa Biochemie	-	Holanda	-
Fungicida Rodomil Gold MZ pepite	Syngenta	-	Suíça	-
Fungicida Pomarsol ultra D	Bayer	-	Portugal	-
Peróxido de hidrogénio 10 Volumes	Continente	-	Portugal	-
Hormona 2,4-D	Sigma – Aldrich	-	Alemanha	-

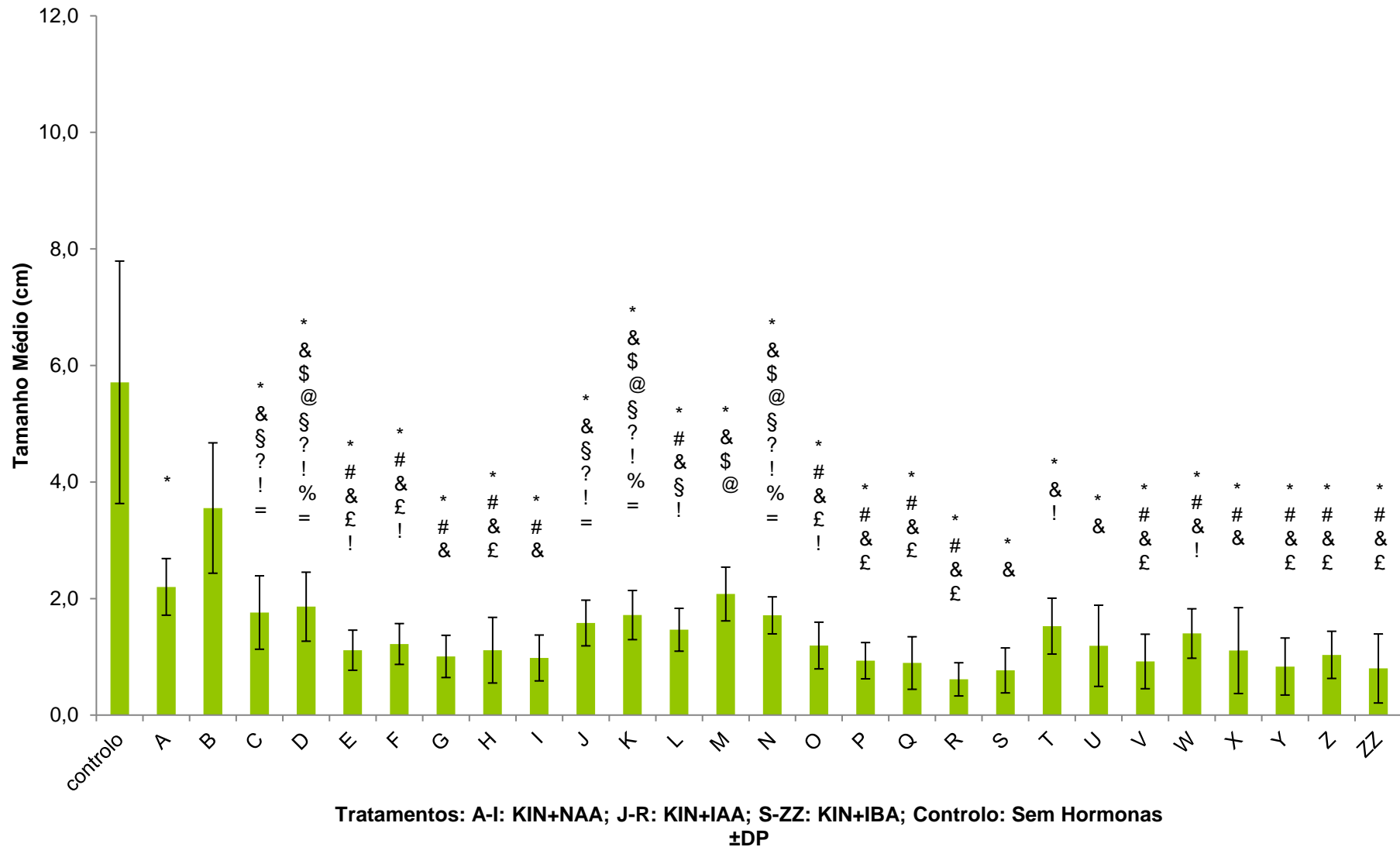
Hormona IAA	Duchefa Biochemie	-	Holanda	-
Hormona IBA	Duchefa Biochemie	-	Holanda	-
Hormona KIN	Duchefa Biochemie	-	Holanda	-
Hormona NAA	Duchefa Biochemie	-	Holanda	-
MS suplementado com Vitaminas Gamborg B5	Duchefa Biochemie	-	Holanda	-
MS suplementado com Vitaminas Gamborg B5 e MES	Duchefa Biochemie	-	Holanda	-
Sacarose	Duchefa Biochemie	-	Holanda	-
Fertilizante Universal, 1L	COMPO Iberia S.L		Barcelona – Espanha, fabricado na UE	
Vasos	ArteVasi	Floreira Veneza	Portugal	
Siro - Substrato Universal saca de 50L	Leal & Soares, S. A.		Mira – Portugal	
Siro – Perlite 6L	Leal & Soares, S. A.		Mira – Portugal	



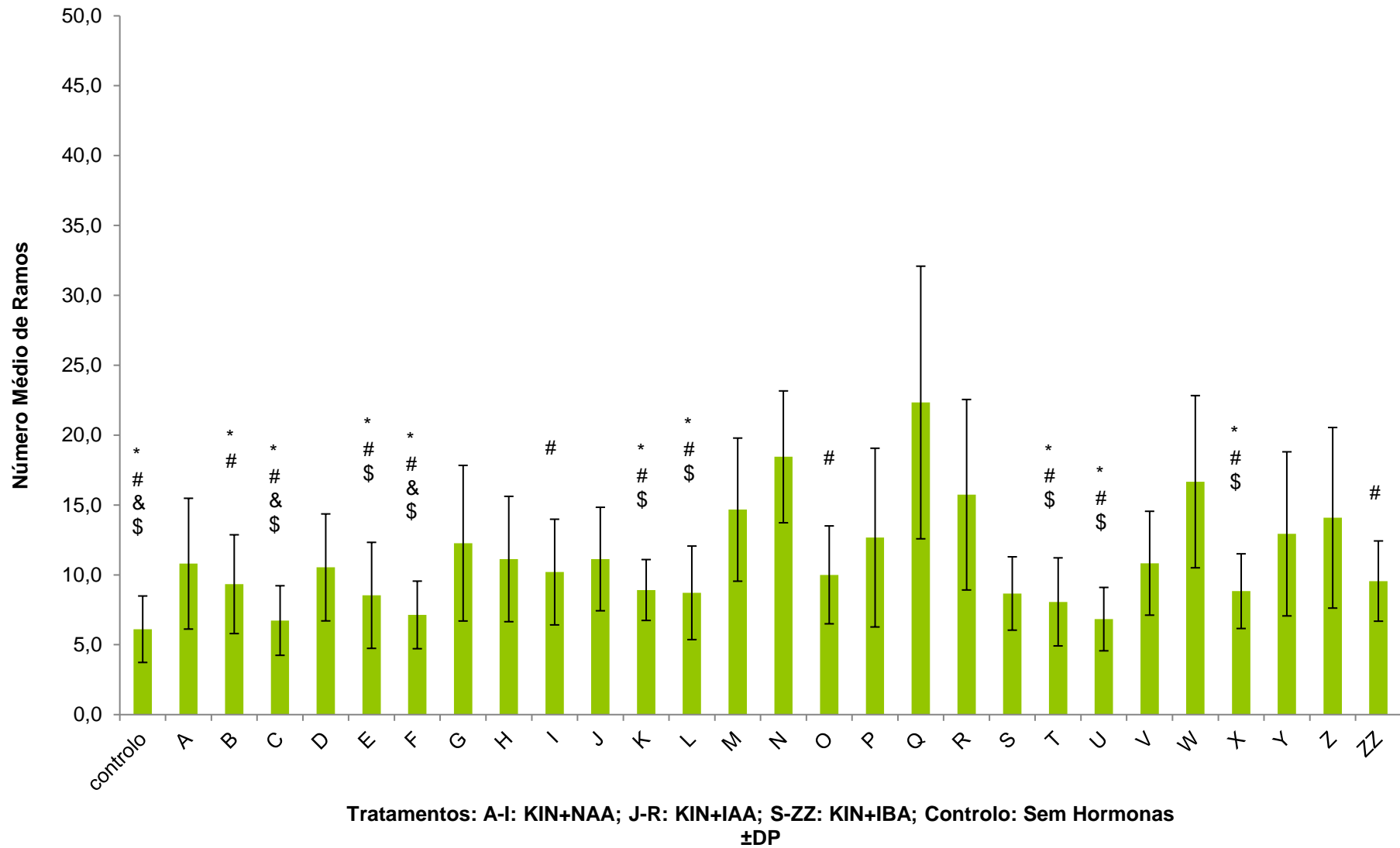
Anexo IV Tamanho médio (cm) do ramo mais alto de *P. microcephala* em resposta a vários meios de cultura, durante o ensaio A. Todos os meios contêm Kin em associação com NAA (A-I), IAA (J-R) ou IBA (S-ZZ). Controle é um meio de cultura sem hormonas. Variação nas concentrações de cada uma das hormonas presente nos Materiais e Metodologia do capítulo 4. Valores apresentados pela média ±desvio padrão.



Anexo V Número médio de ramos de *P. microcephala* em resposta a vários meios de cultura, durante o ensaio A. Todos os meios contêm Kin em associação com NAA (A-I), IAA (J-R) ou IBA (S-ZZ). Controle é um meio de cultura sem hormonas. Variação nas concentrações de cada uma das hormonas presente nos Materiais e Metodologia do capítulo 4. Valores apresentados pela média  $\pm$ desvio padrão.

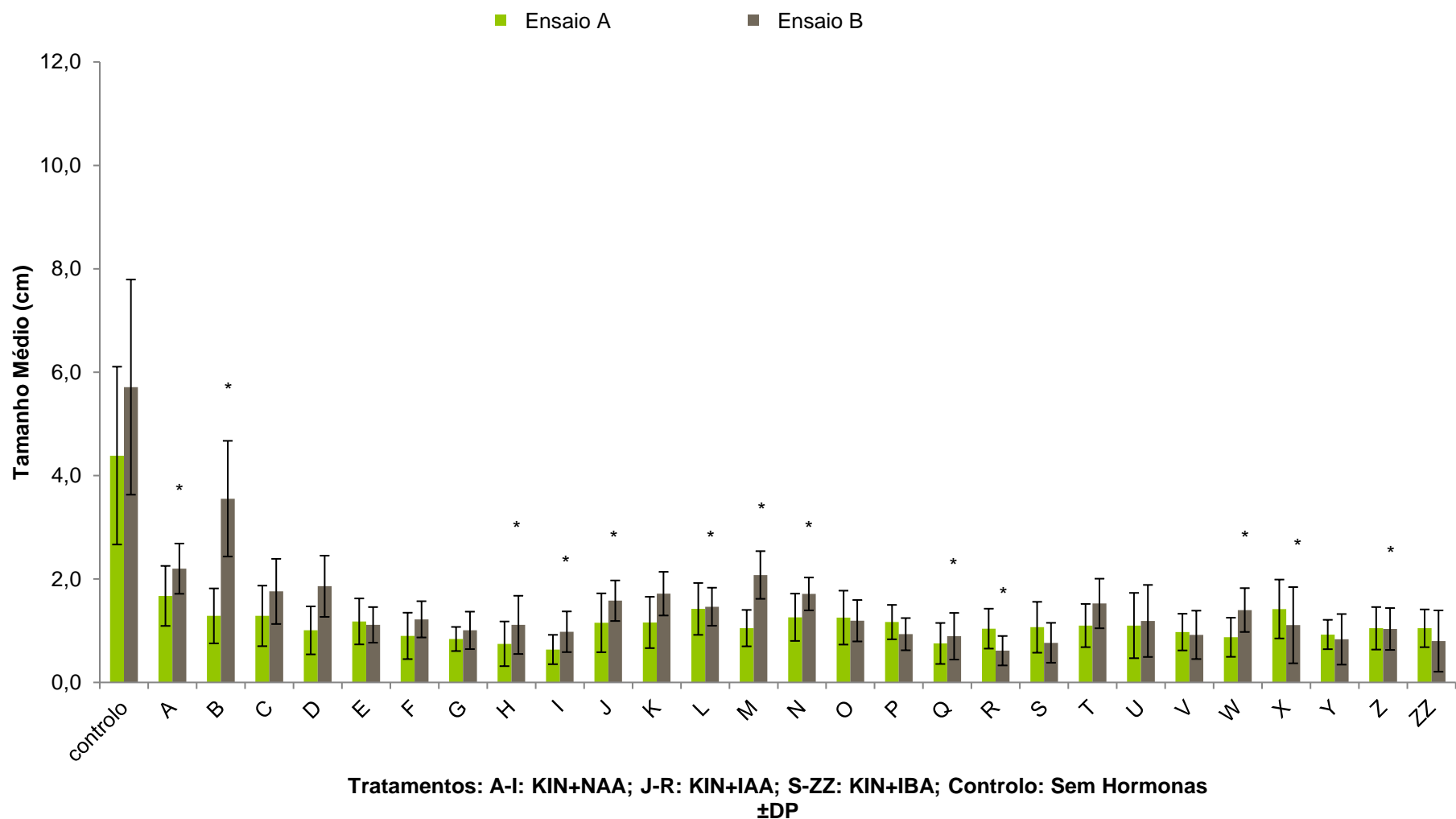


Anexo VII Tamanho médio (cm) do ramo mais alto de *P. microcephala* em resposta a vários meios de cultura, durante o ensaio B. Todos os meios contêm Kin em associação com NAA (A-I), IAA (J-R) ou IBA (S-ZZ). Controle é um meio de cultura sem hormonas. Variação nas concentrações de cada uma das hormonas presente nos Materiais e Metodologia do capítulo 4. Valores apresentados pela média  $\pm$  desvio padrão.

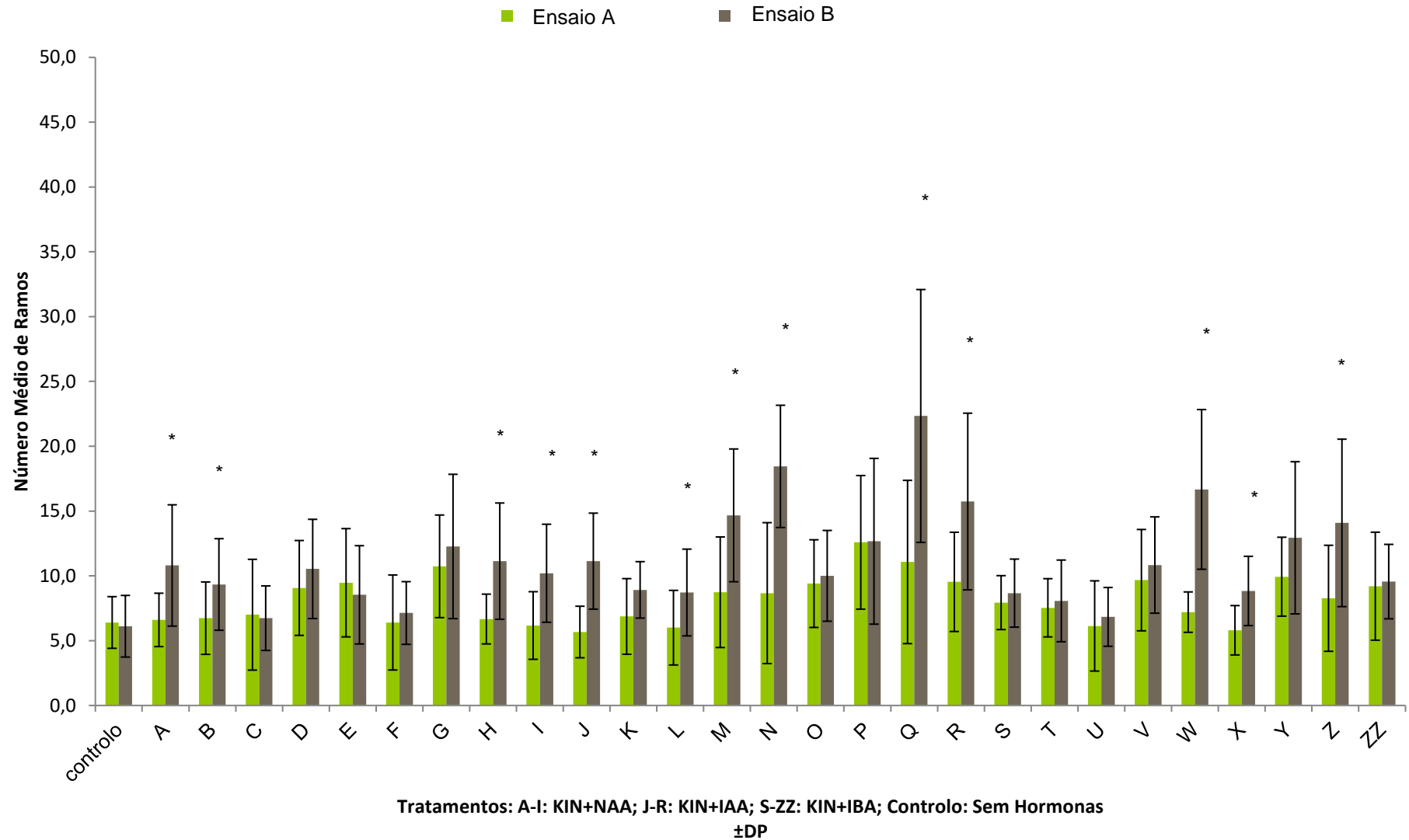


Anexo VIII Número médio de ramos de *P. microcephala* em resposta a vários meios de cultura, durante o ensaio B. Todos os meios contêm Kin em associação com NAA (A-I), IAA (J-R) ou IBA (S-ZZ). Controle é um meio de cultura sem hormonas. Variação nas concentrações de cada uma das hormonas presente nos Materiais e Metodologia do capítulo 4. Valores apresentados pela média  $\pm$ desvio padrão.





Anexo IX Tamanho médio (cm) do ramo mais alto de *P. microcephala* em resposta a vários meios de cultura, a verde está o ensaio A e a cinza o ensaio B. Todos os meios contêm Kin em associação com NAA (A-I), IAA (J-R) ou IBA (S-ZZ). Controle é um meio de cultura sem hormonas. Variação nas concentrações de cada uma das hormonas presente no Material e Metodologia do capítulo **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** Valores apresentados pela média  $\pm$ desvio padrão. \*diferenças estatisticamente significativas entre o ensaio B e o A quando comparados os resultados para a mesma situação.



Anexo X Número médio de ramos de *P. microcephala* em resposta a vários meios de cultura, a verde está o ensaio A e a cinza o ensaio B. Todos os meios contêm Kin em associação com NAA (A-I), IAA (J-R) ou IBA (S-ZZ). Controle é um meio de cultura sem hormonas. Variação nas concentrações de cada uma das hormonas presente no Material e Metodologia do capítulo **Erro! A origem da referência não foi encontrada**. Valores apresentados pela média  $\pm$ desvio padrão. \*diferenças estatisticamente significativas entre o ensaio B e o A quando comparados os resultados para a mesma situação.

Anexo XI Resultados encontrados para no estudo da textura de campo, quando se realizou o procedimento de avaliação pelo tato, como indicado no material e metodologia do capítulo 7(Ribeiro et al., 2013 e Cooper, 2015)

Código	Textura				
	Macia / Áspera	Filamentosa / Não Filamentosa	Argola / Não Argola	Pegajosa / Não Pegajosa	Textura de Campo
<b>A</b>	Intermédia	Não Filamentosa	Não Argola	Não Pegajosa	Arenosa
<b>B</b>	Áspera	Com Dificuldade	Não Argola	Não Pegajosa	Franco-Arenosa
<b>C</b>	Intermédia	Com Dificuldade	Argola Fendida	Não Pegajosa	Franca
<b>D</b>	Macia	Com Dificuldade	Argola Fendida	Não Pegajosa	Franca
<b>E</b>	Intermédia	Com Dificuldade	Não Argola	Não Pegajosa	Franco-Arenosa
<b>F</b>	Áspera	Não Filamentosa	Não Argola	Não Pegajosa	Arenosa
<b>G</b>	Áspera	Com Dificuldade	Não Argola	Não Pegajosa	Franco-Arenosa
<b>H</b>	Áspera	Não Filamentosa	Não Argola	Não Pegajosa	Arenosa
<b>I</b>	Áspera	Com Dificuldade	Não Argola	Não Pegajosa	Franco-Arenosa
<b>J</b>	Macia	Com Dificuldade	Não Argola	Não Pegajosa	Franco-Arenosa
<b>K</b>	Macia	Com Dificuldade	Não Argola	Não Pegajosa	Franco-Arenosa
<b>L</b>	Áspera	Não Filamentosa	Não Argola	Não Pegajosa	Arenosa