

**Contributo para o estabelecimento de reserva *ex situ* de
medronheiro (*Arbutus unedo* L.)
Condições de germinação, instalação e crescimento em viveiro
de plantas de diferentes proveniências.**

José Maria Jorge Vilhena

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadores: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota
Doutora Filomena Figueiredo Nazaré Gomes

Júri:

Presidente: Doutor Joaquim Miguel Rangel da Cunha Costa, Professor auxiliar do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora auxiliar com agregação do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Técnica superior do Instituto Superior de
Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

À professora Mariana Mota, pela excelente orientação, pelas correções, ensinamentos e ajuda, e, acima de tudo, pela paciência e disponibilidade total ao longo deste trabalho.

À minha família, por tudo.

Ao Fábio Castro e Joana Pereira, pela ajuda na extração das sementes, desinfecção da câmara frigorífica e preparação dos garrafões para estratificação, e pela disponibilidade e hospitalidade na Escola Superior Agrária de Coimbra.

À Patrícia Figueiredo, Joel Bazílio, Tatiana Souza e Luís Pessoa pela disponibilidade e hospitalidade e na empresa GreenClon, em Cantanhede.

À professora Filomena, pela orientação e correções.

À Mafalda Coutinho, pelo apoio, ajuda, companhia e correções ao longo de todo o trabalho.

Ao Miguel Pereira, Pedro Aparício, Pedro Rodrigues, Filipe Taipa, Paulo Oliveira, Francisco Piçarra e Nuno Amaro, pelo apoio, ajuda e companhia nas fases divertidas da parte prática (contagem de sementes, na sua colocação em caixas de Petri e viagens a Cantanhede).

À professora Cristina Oliveira, pelos conselhos e correções ao plano desta dissertação.

À engenheira Luísa Valério e D.^a Nídia Santos, pela prestabilidade e disponibilidade.

Ao Matheus Souza, Carmo Alvim, Francisco Mendonça e Roman Barchuk, pelos contributos anímicos.

Ao engenheiro José Diogo Albuquerque pela possibilidade de trabalhar em regime de tempo parcial no Agroportal e pela compreensão da redução de disponibilidade ao longo do mês de setembro e outubro.

Aos restantes familiares, amigos e colegas, pelos bons momentos que partilhámos.

Este trabalho teve apoio financeiro, logístico e institucional do LEAF (Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem), suportado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (UID/AGR/04129/2013).

Este trabalho teve o apoio do Programa de Desenvolvimento Rural 2014 – 2020 – PDR2020, operação 7.8.4. - Recursos Genéticos - Conservação e Melhoramento de Recursos Genéticos Vegetais, nº PDR2020-784-042742 com o título “Conservação e Melhoramento Genético Vegetal para o medronheiro (*Arbutus unedo* L.)”.

Resumo

A variabilidade genética do medronheiro existente em Portugal levou à necessidade da criação de uma reserva de germoplasma, para utilizar em futuros projetos de melhoramento partindo de plantas silvestres.

Este trabalho visa contribuir para a constituição dessa reserva pela identificação de locais de colheita de sementes que confirmem elevadas taxas de germinação e origem plantas com maior potencial de crescimento. Para tal, colheram-se frutos de, aproximadamente, 25 plantas de cinco zonas de Portugal: serra de São Mamede, serra de Monchique, serra do Caldeirão, Barrocal e Penamacor. Extraíram-se, caracterizaram-se as sementes e selecionaram-se três lotes de semente de cada zona para realizar de ensaios de viabilidade (TTC) e germinação, segundo diferentes tratamentos: sem estratificação, 15, 29, 46, 60, 75 e 90 dias de estratificação a frio (4 °C). Em viveiro monitorizou-se quinzenalmente o crescimento de aproximadamente cinco plântulas de cada lote de sementes, durante três meses e a taxa de mortalidade das plântulas.

As sementes colhidas em São Mamede não se encontravam viáveis, talvez pelo elevado tempo de amolecimento da polpa do fruto em água (54 dias). 12% das sementes de Monchique, Caldeirão e Barrocal, que estiveram 39 dias em água, encontravam-se viáveis, em média, e as sementes de Penamacor, que estiveram 20 dias em água, encontravam-se totalmente viáveis. Penamacor e Caldeirão apresentaram taxas de germinação de 64,4% e 23,8%, respetivamente, mesmo sem qualquer estratificação. Para Penamacor apenas tratamentos superiores a 46 dias de estratificação mostraram germinações significativamente superiores ao grupo controlo (aproximadamente mais 50%). As plântulas de Monchique apresentaram a menor taxa de mortalidade em viveiro. As sementes de Penamacor, Monchique e Caldeirão apresentam crescimentos significativamente superiores ao Barrocal (mais 15 - 25%), enfatizando estes três locais de proveniência como os mais promissores, dos locais estudados, para viveiristas que utilizem a propagação seminal como método de obtenção de novas plantas.

Palavras-chave: medronho, dormência das sementes, estratificação, viabilidade, propagação .

Abstract

The existing genetic variability in Portugal has led to the need to set up a germplasm bank, which will be used in future breeding projects from wild plants.

This work aims to contribute to the construction of this bank by identifying seed harvesting sites that confer high germination rates and originate plants with higher growth potential. Approximately 25 plants were harvested from five areas of Portugal: Serra de São Mamede, Serra de Monchique, Serra do Caldeirão, Barrocal and Penamacor. The seeds were extracted, characterized and three seed lots were selected from each area of provenance to perform seed viability tests and germination tests according to different treatments: without stratification, 15, 29, 46, 60, 75 and 90 days of cold stratification (4 °C). In nursery, the growth of approximately five seedlings from each seed lot was monitored fortnightly over three months and the seedling mortality rate were monitored as well.

The seeds harvested in the São Mamede mountain range were not viable, due to high softening times of the fruit pulp in water (54 days). 12% of the seeds of Monchique, Caldeirão and Barrocal, which were 39 days in water, were viable, on average and the Penamacor's seeds, which were 20 days in water, were fully viable. Penamacor and Caldeirão presented germination rates of 64.4% and 23.8%, respectively, even without any stratification. For Penamacor only treatments longer than 46 days of stratification showed significantly higher germination than the control group (approximately 50% more). Monchique seedlings had the lowest nursery mortality rate. Regarding the growth potential, seeds from Penamacor, Monchique and Caldeirão show significantly higher growth than Barrocal (15 – 25% higher), showing these three seed provenance sites as the most promising of the studied sites for nursery farmers using seminal propagation as a method of obtaining new plants.

Keywords: strawberry tree, seed dormancy, stratification, viability, propagation.

Índice

Índice figuras	III
Índice quadros	V
Lista de abreviaturas.....	VI
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Caracterização da espécie	3
2.1.1. Taxonomia.....	3
2.1.2. Características botânicas.....	3
2.1.3. Ecofisiologia	5
2.1.4. Interesse económico e ecológico da espécie.....	9
2.2. Variabilidade genética	10
2.3. Propagação seminal do medronheiro	12
2.3.1. Colheita dos frutos.....	12
2.3.2. Extração das sementes e conservação das sementes	12
2.3.3. Quebra da dormência e germinação das sementes.....	14
2.3.4. Substrato	17
2.3.5. Aclimatização	17
3. Material e métodos.....	19
3.1. Colheita do material.....	19
3.1.1. Locais de colheita.....	20
3.2. Preparação da polpa para extração das sementes	25
3.3. Extração das sementes	26
3.3.1. Seleção do crivo	26
3.3.2. Extração das sementes	27
3.4. Secagem das sementes	27
3.5. Caracterização dos lotes de semente	28
3.5.1. Massa de dez sementes, pureza, massa do lote, estimativa do número de sementes por lote.....	28

3.5.2.	Ensaio de estratificação.....	29
3.5.3.	Teste de viabilidade (TTC).....	32
3.6.	Reserva <i>ex situ</i> em frio – banco de sementes	34
3.7.	Reserva <i>ex situ</i> no campo – banco de germoplasma.....	34
3.7.1.	Número de sementes	34
3.7.2.	Estratificação.....	35
3.7.3.	Obtenção de plântulas.....	36
3.7.4.	Transplantação.....	37
3.7.5.	Adubações e aplicação de produtos fitofarmacêuticos	38
3.7.6.	Monitorização dos crescimentos e da taxa de mortalidade	40
3.8.	Análise estatística dos resultados.....	40
4.	Resultados e discussão	41
4.1.	Caracterização dos lotes de semente.....	41
4.1.1.	Número de sementes por quilograma.....	41
4.1.2.	Grau de Pureza	42
4.1.3.	Testes de viabilidade	43
4.1.4.	Ensaio de estratificação.....	44
4.2.	Reserva <i>ex situ</i> no campo – banco de germoplasma.....	49
4.2.1.	Taxa de mortalidade	50
4.2.2.	Crescimento das plântulas.....	51
4.3.	Análise aos objetivos do projeto	53
5.	Conclusão e perspetivas	54
6.	Referências bibliográficas	56
	Anexo 1 – exemplo de ficha de colheita de espécies silvestres	63

Índice figuras

Figura 1. Mapa de distribuição do medronheiro (Caudullo <i>et al.</i> , 2017).....	5
Figura 2. Mapa de distribuição da espécie <i>Arbutus unedo</i> em Portugal continental (adaptado de Araújo <i>et al.</i> (2019))......	6
Figura 3. Mapa da área potencial de distribuição geográfica da espécie <i>Arbutus unedo</i> em Portugal continental (adaptado de Bingre <i>et al.</i> (2007))......	6
Figura 4. Ocupação com Medronheiro com base nos dados campo do IFN 2005 por concelho (Carvalho, 2008).	7
Figura 5. Ação de prospeção e colheita de frutos, no dia 13 de novembro de 2018, na serra de São Mamede.	20
Figura 6. Ação de prospeção e colheita de frutos, no dia 28 de novembro de 2018, na serra de Monchique.....	21
Figura 7. Ação de prospeção e colheita de frutos, no dia 29 de novembro de 2018, na serra do Caldeirão.....	22
Figura 8. Ação de prospeção e colheita de frutos, no dia 29 de novembro de 2018, no Barrocal.....	23
Figura 9. Ação de prospeção e colheita de frutos, no dia 19 de dezembro de 2018, em Penamacor.....	24
Figura 10. Estado dos frutos para extração de semente ao 54. ^o dia de amolecimento dos frutos.	25
Figura 11. Crivo de malha menor.	26
Figura 12. Crivo de malha maior.	26
Figura 13. Tabuleiro com as sementes extraídas.....	27
Figura 14. Aspeto das sementes após a secagem.....	27
Figura 15. Detalhe do processo de contagem de sementes. As sementes são mais escuras que o esclerênquima, que se apresenta mais rosado.....	29
Figura 16. Exemplo de uma caixa de Petri com 10 sementes colocadas em linha.....	30
Figura 17. Aspeto de uma caixa de Petri com e sem tratamento de ácido.	31
Figura 18. Banco de sementes de medronheiro, na ESAC, onde se encontram conservados todos os lotes de semente a temperaturas constantes de 4 °C.	34
Figura 19. Sementes por cima do substrato.....	36
Figura 20. Sementes a estratificar na câmara frigorífica.....	36
Figura 21. Mistura de água e argila para condensação da raiz.	37
Figura 22. 6 sementes de medronheiro do lote Pen. 5 cortadas ao meio e com coloração vermelha.	43
Figura 23. Detalhe da germinação das sementes em caixas de Petri.	46

Figura 24. Detalhe de sementes que germinaram no frigorífico e que apodreceram.	48
Figura 25. Pen. 20 e Pen. 21 no dia 12 de abril de 2019.....	49
Figura 26. Pen. 1 e Pen. 2 no dia 13 de maio de 2019.....	50
Figura 27. Taxa de mortalidade por local e por data.	50
Figura 28. Monitorização dos crescimentos das plântulas.	52
Figura 29. Detalhe da altura de diferentes plântulas em dias diferentes.....	53
Figura 30. Proporção do número de plantas necessárias para o projeto em curso no dia 03 de setembro de 2019.	53

Índice quadros

Quadro I. Dados característicos de lotes de semente de <i>Arbutus unedo</i>	4
Quadro II. Taxa de germinação (%), segundo vários autores e diferentes tratamentos...16	
Quadro III. Locais de prospeção e colheita de material vegetal no âmbito do projeto em que esta dissertação está inserida.	19
Quadro IV. Tempo de amolecimento da polpa dos frutos por local de colheita.	25
Quadro V. Número de sementes usadas para cada tratamento e para cada lote.....	33
Quadro VI. Calendário das ações de caracterização dos lotes de semente.	33
Quadro VII. Calendário das aplicações de adubos e produtos fitofarmacêuticos realizados.	39
Quadro VIII. Número de sementes por quilograma em função do local de proveniência.41	
Quadro IX. Número de sementes por quilograma em função da exposição.	41
Quadro X. Valores médios dos ensaios de viabilidade por tempo de amolecimento.	43
Quadro XI. Valores médios dos ensaios de viabilidade por local.....	44
Quadro XII. Valores médios das percentagens de germinação consoante tempos de estratificação e tratamentos diferentes, por local. Legenda dos tratamentos: C – controlo, germinação das sementes sem qualquer tratamento; 1 – 15 dias de estratificação; 2 – 29 dias de estratificação; 3 – 46 dias de estratificação; 4 – 60 dias de estratificação; 5 – 75 dias de estratificação; 6 – 90 dias de estratificação; 7 – 31 dias de estratificação e 2000 mg L ⁻¹ de GA ₃ durante 24h; 8 - 31 dias de estratificação, 2000 mg L ⁻¹ de GA ₃ durante 24h e 30 minutos de H ₂ SO ₄	45
Quadro XIII. Evolução do crescimento das plântulas, em cm, ao longo do tempo.....	51
Quadro XIV. Precipitação por local em estudo (IPMA, 2015).	52

Lista de abreviaturas

ADN - ácido desoxirribonucleico.

A. unedo – *Arbutus unedo* Linnæus.

ANOVA – ANalysis Of Variance.

Arbutus unedo – *Arbutus unedo* Linnæus.

Arbutus unedo L. – *Arbutus unedo* Linnæus.

DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária.

GA₃ - Ácido giberélico.

ha – hectare / hectares.

ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas.

IFN – Inventário Florestal Nacional.

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P.

IPC-ESAC – Instituto Politécnico de Coimbra - Escola Superior Agrária de Coimbra.

ISSR – Inter Simple Sequence Repeats.

kg – quilograma.

L – litros.

m – metros.

mg – miligramas.

mm – milímetros.

N.^o - número.

PDR2020 - Programa de Desenvolvimento Rural 2014-2020.

PRODER – Programa de Desenvolvimento Rural 2007-2013.

RAPD – Random Amplification of Polymorphic DNA.

REN – Redes Energéticas Nacionais, SGPS, S.A.

s – segundos.

T_{max} – temperatura máxima.

T_{min} – temperatura mínima.

TSS – teor de sólidos solúveis.

v – volume.

1. Introdução

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.) é uma pequena árvore ou um arbusto autóctone que cresce espontaneamente em diversas zonas de Portugal e desempenha um papel importante, designadamente na compartimentação da paisagem, na proteção contra fatores abióticos e bióticos e na instalação de corredores ecológicos. Tradicionalmente, em algumas zonas do país, o medronho é utilizado para o fabrico de aguardente. Ultimamente tem despertado bastante interesse, devido à potencialidade económica do fruto, quer para transformação, quer para o seu consumo em fresco. A instalação em pomares conduziu à necessidade de melhoramento da espécie (Franco, 2014; Gomes *et al.*, 2017).

Trabalhos científicos nacionais têm conduzido a resultados importantes relativos à seleção da espécie. Estes resultados têm sido objeto de várias publicações, em particular sobre os benefícios do consumo do medronheiro (Oliveira, 2011), a técnica da micropropagação (Gomes e Canhoto, 2009; Gomes *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2013), sobre a sua diversidade genética (Lopes *et al.*, 2012; Vasques *et al.* 2013; Ribeiro *et al.*, 2017), sobre o consumo do fruto em fresco e as condições de pós-colheita (Guerreiro *et al.*, 2013a; Guerreiro *et al.*, 2013b; Guerreiro *et al.*, 2015; Guerreiro e Antunes, 2018). Realizaram-se, ainda, dissertações de mestrado (Gomes, 2006; Martins, 2012; Anastácio, 2014; Dias, 2014; Dinis, 2015; Figueiredo, 2017), doutoramento (Gomes, 2011) e relatório de estágio profissionalizante (Santos *et al.*, 2013).

Para além dos trabalhos referidos, o medronheiro tem sido objeto de vários projetos, com objetivos de propagação, conservação e caracterização molecular de árvores selecionadas da espécie medronheiro e da conversão da planta silvestre numa espécie fruteira rentável.

Apesar do trabalho de investigação que tem sido feito, análises da variabilidade genética da espécie a nível nacional e conservação desta variabilidade para futuro melhoramento de clones têm sido pouco realizadas. Ribeiro *et al.* (2017) recomendam a construção de um programa de conservação para a espécie e Lopes *et al.* (2012) efetuaram a primeira tentativa de estudar a diversidade genética do *A. unedo* em Portugal, no interior norte e centro, recomendando a instalação de uma coleção *ex situ*.

Pipinis *et al.* (2017) obtiveram diferenças significativas de taxas de germinação de diferentes proveniências, surgindo, assim, o interesse de comparar as taxas de germinação de vários locais e perceber quais os locais com melhores resultados. Este aspeto poderá ser importante para os viveiristas, principalmente os de plantas ornamentais, de modo a escolherem proveniências que permitam a germinação das sementes com o mínimo de gasto energético.

Vasques *et al.* (2013) analisaram o efeito da proveniência das sementes no crescimento de jovens plantas e observaram que a adaptação aos regimes da água parece estar

relacionada com o clima de proveniência das sementes. Comparando o crescimento das jovens plântulas coloca-se, como hipótese, poder-se começar a equacionar qual ou quais as zonas de prospeção que evidenciam maior potencial de crescimento e se, para os locais estudados, existem diferenças significativas entre os crescimentos das plântulas e alguma relação com o regime pluviométrico. Este aspeto poderá ser importante para ações de restauro ecológico ou arborizações, em que utilizem a espécie medronheiro, visto que, segundo Navarro-Cerrillo *et al.* (2013), plantas com menos de 15 cm de altura devem ser rejeitadas para a florestação, sendo assim vantajoso para os produtores de plantas a utilização de sementes provenientes de locais dos quais as plântulas alcançarão os tais 15 cm o mais cedo possível e com a menor quantidade de insumos.

O presente trabalho tem o apoio da operação 7.8.4. do PDR2020, nº PDR2020-784-042742 com o título “Conservação e Melhoramento Genético Vegetal para o medronheiro (*Arbutus unedo* L.)”, que tem como objetivos gerais contribuir para a obtenção de uma maior diversidade de genótipos a utilizar num futuro programa de melhoramento e para a construção de uma reserva *ex situ*, através da prospeção e recolha de frutos e folhas de plantas silvestres, em zonas definidas do Litoral e Interior de Portugal continental.

Esta dissertação apresenta como objetivos específicos:

1. extração e caracterização das sementes de medronheiro por planta e por região, incluindo um ensaio de germinação com diferentes pré-tratamentos das sementes para identificação de locais de proveniência com elevadas taxas de germinação;
2. monitorização e avaliação dos crescimentos das plântulas que serão instaladas na reserva *ex situ* no campo para identificação de locais de proveniência conducentes a elevados crescimentos de plântulas.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Caracterização da espécie

2.1.1. Taxonomia

O medronheiro ou ervedeiro, *Arbutus unedo* L., pertence à classe *Magnoliopsida*, ordem *Ericales*, família *Ericaceae*, subfamília *Arbutoideae*. Em Portugal, estão incluídas na família *Ericaceae* oito géneros autóctones de Portugal, sendo os mirtilos, *Vaccinium* spp., as urzes, *Erica* spp., a torga, *Calluna vulgaris*, e a camarinha, *Corema album*, os mais conhecidas, para além do medronheiro (Flora de Portugal Interactiva [Flora-on], 2014).

Segundo Hileman *et al.* (2001), a subfamília *Arbutoideae* inclui plantas esclerófilas, adaptadas à seca, sendo que a maior diversidade dentro do grupo ocorre nas regiões de clima mediterrânico do Oeste norte-americano.

Segundo Torres *et al.* (2002), dependendo do autor, ao género *Arbutus* pertencem entre 12 e 20 espécies, no continente americano. Três espécies do género *Arbutus* ocorrem na região mediterrânica, desde o Norte de Africa ao Médio Oriente, *A. unedo*, *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* (Hileman *et al.*, 2001). *A. x andrachnoides* é um híbrido entre *A. unedo* e *A. andrachne* que se encontra no leste da região mediterrânica (Torres *et al.*, 2002).

2.1.2. Características botânicas

Elwes e Henry (1906) caracterizaram o medronheiro da seguinte forma: “um arbusto ou pequena árvore que atinge cerca de 12 metros de altura na Irlanda e mais que 3 metros de diâmetro”. Coutinho (1939) descreve-o como: “Arbusto ou pequena árvore (até 6 a 8 metros)”. Brotero (1804) afirma que o medronheiro, quando velho, excede, no Gerês, a altura de 9 metros. É uma espécie incluída no grupo Fanerófito (Franco, 1984; Flora-on, 2014).

As folhas são persistentes e renovam-se maioritariamente durante a primavera. A floração e a frutificação ocorrem em simultâneo na época do final do outono, início do inverno (Passarinho *et al.*, 2017).

A. unedo é uma espécie diploide ($2n = 26$), reproduz-se sexualmente por via seminal, ou vegetativamente através de rebentos de raiz (Franco, 1984; Sulusoglu *et al.*, 2011).

De acordo com Gomes (2011), o tronco apresenta uma casca com fissuras que se vão destacando do tronco.

As folhas são oblongas-lanceoladas, geralmente de comprimento duas a três vezes a largura, glabras, com exceção na base, com um pecíolo de 10 milímetros ou menos (Gomes, 2011).

As flores brancas ou rosadas, urceoladas e hermafroditas, são produzidas em panículas terminais pendentes (Franco, 1943; Passarinho *et al.*, 2017). O fruto é uma baga, globular, vermelho-alaranjado quando maduro, de 7 até 20 mm de diâmetro (Oliveira *et al.*, 2011).

Os frutos são superiores ao cálice, com cinco glóbulos e muitas sementes, desenvolvem-se em ramos do ano anterior, pela transformação dum gomo foliar terminal em floral (Tapum, 1980). Segundo Anastácio (2014), o medronho não é um fruto climatérico "típico", está mais próximo de um comportamento climatérico do que não-climatérico.

Existe uma grande variação no número de sementes por fruto, encontrando-se entre cinco e sessenta sementes (Sealy e Webb, 1950; Piotto e Di Noi, 2001; Chiarucci *et al.*, 1993). Chiarucci *et al.* (1993) provaram a existência de uma influência negativa da duração da intensidade da seca estival na quantidade e qualidade das sementes. As sementes apresentam um comportamento ortodoxo, são tolerantes à secagem e devem ser guardadas secas a 4-5 °C (Navarro-Cerrillo *et al.*, 2013). As sementes toleram temperaturas até 90 °C, durante 10 minutos, sem perder o seu poder germinativo (Mesléard e Lepar, 1991), mas a 100 °C já o perdem (Narbona, 2003). Esta resistência permite que as sementes sobrevivam no solo depois de um incêndio (Mesléard e Lepar, 1991).

Quadro I. Dados característicos de lotes de semente de *Arbutus unedo*.

Pureza (%)	N.º de sementes kg ⁻¹	Referência
-	333 333 - 500 000	Sealy e Webb (1950)
35 - 45	374 000 - 570 000	Catalán (1991)
-	415 282 - 509 165 - 582 411	García-Fayos <i>et al.</i> (2001)
30 - 48	158 400 - 368 640	Navarro-Cerrillo e Gálvez (2001)
-	330 000 - 700 000	Piotto e Di Noi (2001)
35 - 45	330 000 - 570 000	García del Barrio <i>et al.</i> (2001), cit. por Alía <i>et al.</i> (2005)
-	365 408 - 444 676 - 717 073	Louro e Pinto (2011), cit. por Navarro-Cerrillo <i>et al.</i> (2013)
55 - 97	297 200 - 565 700	Banc de Llavors Forestals, cit. por Navarro-Cerrillo <i>et al.</i> (2013)
35 - 75	350 000 - 650 000	CNRGF El Serranillo, cit. por Navarro-Cerrillo <i>et al.</i> (2013)
38 - 79	310 000 - 610 000	Vivero Central JCyL, cit. por Navarro-Cerrillo <i>et al.</i> (2013)

Esta espécie é de crescimento lento e pode viver até aos duzentos anos, apresentando uma grande capacidade de regeneração vegetativa (Passarinho *et al.*, 2017).

2.1.3. Ecofisiologia

2.1.3.1. Distribuição da espécie e área da cultura em Portugal

O género *Arbutus* está distribuído pela costa oeste da América do Norte: México e América Central; e pela Europa ocidental: bacia Mediterrânica, norte de África e partes do Médio Oriente (Hileman *et al.*, 2001).

O medronheiro distribui-se pela bacia do Mediterrâneo (Figura 1), Península Ibérica e parte sudoeste e noroeste da Irlanda (Passarinho *et al.*, 2017).

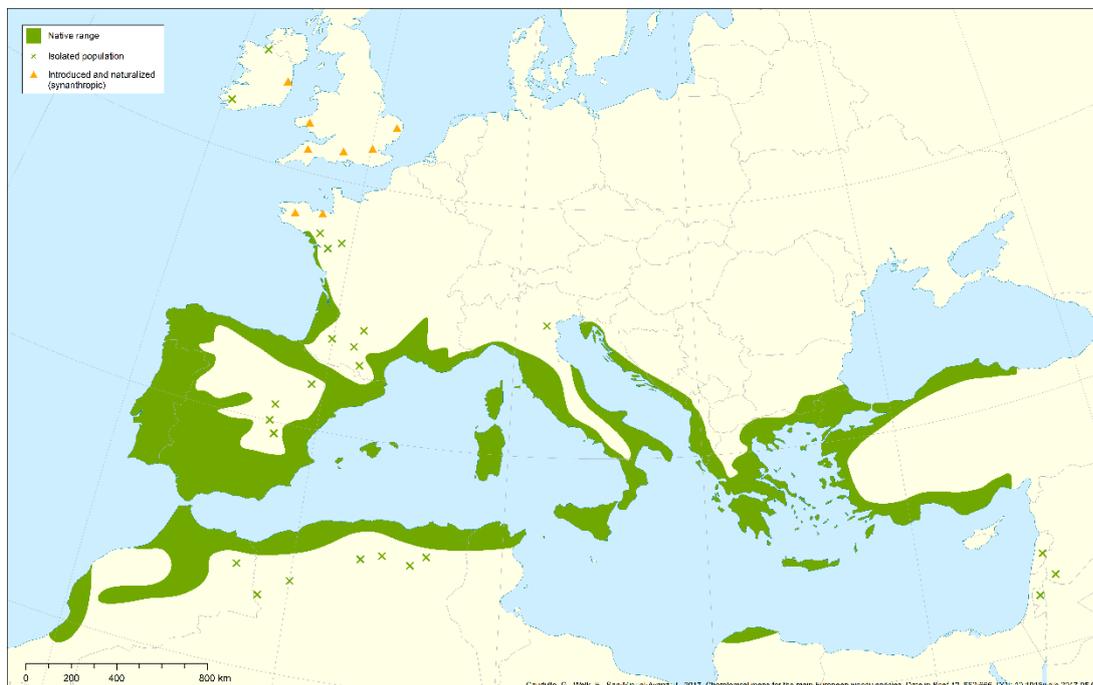


Figura 1. Mapa de distribuição do medronheiro (Caudullo *et al.*, 2017).

Em Portugal (Figuras 2 e 3), a espécie encontra-se maioritariamente a sul do rio Tejo, na região das serras do Caldeirão e Monchique (Algarve), podendo, contudo, encontrar-se difundido por todo o país (Tapum, 1980; Correia, 1998; Oliveira *et al.*, 2011). Vegeta bem em encostas e vales, sombrios e soalheiros (Passarinho *et al.*, 2017), fazendo parte de matos xerofíticos, margens de matas, pinhais, encostas rochosas (Franco, 1943; Franco, 1984) e bosques perenifólios, acompanhando azinheiras e sobreiros (Passarinho *et al.*, 2017). Segundo Pedro (1994), o medronheiro raramente constitui povoamentos dominantes, sendo mais comum em povoamentos dominados ou esparsos, integrados em comunidades naturais ou seminaturais (chaparraís, matas).

Segundo Pedro (1994), a razão da dominância do medronheiro nas situações de exposição aos quadrantes de norte, ou de elevada humidade atmosférica, é ser uma espécie condensadora de nevoeiros e neblinas frequentes.

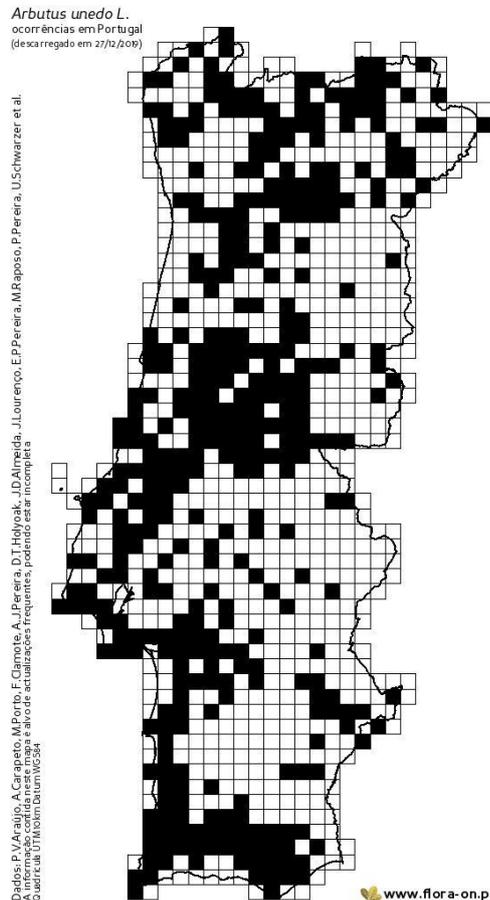


Figura 2. Mapa de distribuição da espécie *Arbutus unedo* em Portugal continental (adaptado de Araújo *et al.* (2019)).

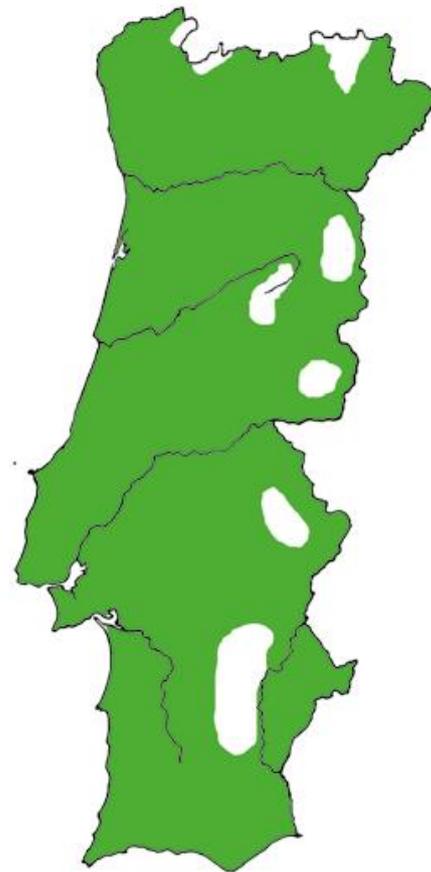


Figura 3. Mapa da área potencial de distribuição geográfica da espécie *Arbutus unedo* em Portugal continental (adaptado de Bingre *et al.* (2007)).

Desconhece-se qual a área ocupada por esta cultura. Segundo a Carta da Tipologia Florestal de Portugal (Figura 4), as formações de medronhal ocupavam uma área de 15 636 ha (Godinho-Ferreira *et al.*, 2005). De acordo com Goes (1991), a área de medronheiro em 1988 era de 15 000 ha. Segundo o inventário florestal baseado na fotografia aérea de 1972, existiam cerca de 13 000 hectares de povoamentos puros e dominantes com predominância para os concelhos de Monchique, com 59% da área, Silves, com 25%, e Loulé, com 9,6% (Correia e Varela, 1996). Segundo Carlos Fonseca, da Cooperativa Portuguesa do Medronho (CPM), as novas áreas, instaladas em pomares, rondam cerca de 500 ha (Gomes *et al.*, 2017). De acordo com Gabriela Freitas, gestora do PDR2020, foram apoiadas 179 ha, até outubro de 2018 (Freitas, 2018). Até ao final de 2018 a REN tinha realizado cerca de 350 ha de

2.1.3.2. Condições edáficas

O medronheiro prefere solos siliciosos e descarbonatados e consegue crescer em solos alcalinos e solos relativamente ácidos, mas cresce bem num largo espectro de solos, com exceção de solos que encharcam (Sealy, 1949). Segundo Correia e Varela (1996), o medronheiro prefere solos arenosos e frescos. O pH varia entre 4 e 8 (Sealy, 1949; Anonymous, 2004b, cit. por Celikel, 2008; Celikel, 2008). Navarro-Cerrillo *et al.* (2013) reforçam a preferência desta espécie por solos ácidos.

Em Portugal, cerca de 90% dos medronhais estão instalados em solos mediterrâneos, vermelhos ou amarelos de xistos (Vx) com ou sem afloramentos rochosos, perto de 5% desenvolvem-se em solos litólicos húmicos de sienitos com afloramentos rochosos (Tapum, 1980). Vegeta tanto em matos sobre solo calcário (barrocal algarvio), como em xistos da área da serra do Caldeirão (Malato-Beliz, 1986, cit. por Pedro, 1994). Os solos argilosos devem ter boa textura e estrutura e apresentar boa drenagem (Passarinho *et al.*, 2017). Segundo o mesmo autor (2017), é uma espécie que consegue vegetar mesmo em zonas rochosas, desde que existam fendas onde possa fixar as raízes.

Celikel (2008) registou teores de matéria orgânica entre os 0,63% e os 14,24%, na região norte da Turquia.

O medronheiro tolera solos contaminados com arsénio, chumbo, cobre, tungsténio e zinco sem os bioacumular (Godinho, 2009).

Encontra-se, por norma, entre os 0 e os 800 metros de altitude, mas há registo de ocorrência aos 1200 m (Ruiz de la Torre, 2006). Em Portugal, segundo a Flora-on (2014), a altitude média situa-se entre os 0 e os 447 m sendo que há registo a 1041 m.

2.1.3.3. Condições climáticas

As características climáticas exercem maior influência na distribuição do medronheiro do que o solo (Passarinho *et al.*, 2017).

O medronheiro prefere climas temperados, com Invernos de temperaturas suaves, com poucos dias de baixas temperaturas (Tapum, 1980). A temperatura média diária deverá ser maior que 12,5 °C (Sales, 1992, cit. por Correia e Varela, 1996). A espécie suporta temperaturas mínimas de -12 °C e máximas de 35 a 40 °C, as temperaturas ótimas estão compreendidas entre os 15 e os 20 °C (Rau, 2008). Segundo Navarro-Cerrillo *et al.* (2013), os intervalos ótimos para a espécie são de: temperatura média anual entre 12,9 e 17,3 °C; temperatura média das mínimas do mês mais frio entre 0,2 e 5,5 °C; temperatura média das máximas do mês mais quente entre 30 e 36,9 °C. Segundo Tapum (1980), em Monchique, onde o autor afirma que se encontram os fatores ideais para o medronheiro, a temperatura

média anual é de 17,2 °C; temperatura média do mês mais frio de 11,2 °C; temperatura média do mês mais quente de 24,4 °C.

A precipitação anual deverá estar compreendida entre 500 e 1400 mm por ano (Sales, 1992, cit. por Correia e Varela, 1996), com uma precipitação estival média entre 15 e 90 mm. Segundo Navarro-Cerrillo *et al.* (2013), o mínimo para a espécie são 600 mm de precipitação. Abaixo dos 500 mm de pluviosidade não se verifica a ocorrência natural de medronheiros (Passarinho *et al.*, 2017). Chuvas intensas na época de floração são extremamente perigosas, pois provocam a destruição das flores. As chuvas tardias, em junho, julho e agosto, podem fazer cair os frutos (Tapum, 1980).

De acordo com Tapum (1980), o medronheiro é muito sensível às geadas, que queimam as folhas e os gomos novos e destroem as flores. As plantas jovens são bastante mais sensíveis que as adultas, porque, nas mais velhas, a maior parte dos ramos novos estão protegidos pelas folhas e ramos velhos. Os medronheiros expostos a sul são menos atingidos pela geada do que aqueles com exposição a norte, caracterizadas por maior período de ocorrência de geadas (Tapum, 1980). A geada deverá ser inferior a 40 dias por ano (Correia e Varela, 1996). A produção de medronho está bastante dependente das geadas, em virtude de a floração se observar de outubro a dezembro, e por este facto a frutificação é bastante irregular (Goes, 1991).

O vento forte prejudica a floração, influencia o vingamento, e a frutificação, principalmente se os frutos já se encontrarem no final da maturação (Tapum, 1980; Correia, 1998).

O granizo, durante o Verão e Outono pode provocar a queda de frutos e ferir as plantas e os frutos, aumentando a suscetibilidade a ataques de agentes patogénicos (Tapum, 1980; Correia, 1998).

O nevoeiro na época da floração e fecundação pode provocar o apodrecimento das flores, promovendo a sua queda (Tapum, 1980; Correia, 1998).

2.1.4. Interesse económico e ecológico da espécie

Segundo Correia e Varela (1996), a etimologia da palavra “*Arbutus*” parece derivar do substantivo “arbustos” tendo sido esta designação já utilizada por autores romanos. No entanto, outros apontam a origem celta da denominação, uma vez que “arbois” designa fruto granuloso (Scortichini, 1986, cit. por Correia e Varela, 1996). A palavra “*unedo*” significa “come um” (Polunin e Huxley, 1967), sendo isto uma alusão às alegadas propriedades psicotrópicas do fruto, o qual não se deverá comer mais que um (Correia e Varela, 1996).

De acordo com Polunin e Huxle (1967), os frutos são utilizados para produzir destilação alcoólica, caracterizando-os como comestíveis, mas não muito saborosos. Em Portugal a destilação dá origem à famosa aguardente de medronho (Gomes, 1943). A produção de

aguardente a partir dos frutos fermentados foi, durante muito tempo, a principal razão de interesse no medronheiro (Pedro, 1994; Correia, 1998).

Segundo Pedro (1994), os frutos mais saborosos são os que já passaram a maturação fisiológica e contêm álcool (até 0,5%). No entanto, hoje já existem empresas como a Lenda da Beira que vende o fruto para consumo como fruto fresco. Devido ao seu valor em compostos antioxidantes e vitaminas apresenta um potencial interessante para a sua exploração como fruto fresco. Mas, neste caso haverá que selecionar e multiplicar as plantas com maior potencial de acordo com as características do fruto.

O medronheiro tem grande potencial como planta ornamental em virtude do porte ereto, da copa arredondada, da forma e cor das folhas e da floração e frutificação vistosas, numa época do ano em que há poucas espécies floridas (Passarinho *et al.*, 2017).

Para além dos frutos, aproveita-se ainda a lenha e o carvão de medronheiro, que, segundo Correia (1998), são de boa qualidade, mesmo melhor que o carvão de azinheira.

Na Grécia fazem flautas da madeira de medronheiro (Polunin e Huxley, 1967).

Font Quer (1996) descreve a casca do medronheiro como contendo abundantes matérias tânicas (até 36%), e por essa razão se utilizar como curtume.

Os ramos novos são ainda usados para ornamentar arranjos de flores (Tapum, 1980).

As folhas e a casca são usadas medicinalmente (Polunin e Huxley, 1967).

Após um incêndio, ou corte, tem a capacidade de regenerar de toiça (Divisão Municipal de Ambiente e Conservação da Natureza: Município de Oliveira de Azeméis [CMOA], 2012).

De acordo com a CMOA (2012), sob o ponto de vista ecológico, trata-se de uma espécie importante na sobrevivência de inúmeros seres vivos, quer pela promoção de abrigo, quer pelo fornecimento de alimento, promovendo assim a biodiversidade dos ecossistemas em que está inserido. O medronheiro é uma espécie importante para a produção de mel (Lagarto, 2013). As abelhas podem sobreviver na época desfavorável graças à floração do medronheiro (Passarinho *et al.*, 2017).

De acordo com Passarinho *et al.* (2017), é uma espécie muito rústica. Devido à riqueza em açúcares, que o medronho tem, constitui um refúgio alimentar para a fauna selvagem, fixando no território sobretudo espécies de aves. No que respeita à conservação do solo, têm uma ação importante, pois a folhada que se acumula sob a sua copa protege o solo da erosão.

2.2. Variabilidade genética

Tapum (1980) levantou a possibilidade de existirem variedades de medronheiro diferentes, tendo em consideração a morfologia das folhas e frutos, recomendando um estudo da variabilidade da espécie. Esse estudo, segundo Tapum (1980), seria a base de um futuro melhoramento da espécie a cultivar, realçando a importância da seleção de frutos que

originasse aguardente com baixo teor de metanol. Inquéritos efetuados em toda a serra de Monchique mostram que há zonas, onde o medronho tem características bem diferenciadas, que poderão eventualmente corresponder a variedades distintas.

De acordo com Correia e Varela (1996), o medronheiro é uma espécie que apresenta bastante variabilidade fenotípica, podendo ser encontrada uma grande diversidade morfológica num mesmo local.

O medronheiro desenvolve um tubérculo lenhoso entre o caule e raiz, xilopódio, tem a função de órgão de reserva, sendo uma característica genética de algumas plantas que vivem em regiões com um período prolongado de seca ou fogos naturais (Passarinho *et al.*, 2017). Segundo o mesmo autor (2017), o rejuvenescimento do medronheiro a partir de gomos do caule ou de gomos do xilopódio permite que a espécie permaneça num local durante um longo período, mesmo que as condições ambientais se alterem moderadamente, desta forma, pequenas populações isoladas conseguem manter a sua diversidade genética.

O estudo da diferenciação genética do medronheiro é relevante para perceber o efeito do contraste entre populações atlânticas e mediterrâneas. A análise da diversidade genética do medronheiro fornece informação que deve ser benéfica para programas de conservação e seleção de genótipos. O conhecimento da diversidade genética é crucial para prever a evolução da espécie. Este conhecimento é especialmente relevante para variedades que respondem de forma diferente a variações de luz, temperatura ou pluviosidade, que se preveem variar como resultado das alterações climáticas. (IPCC, 2013; Takrouni *et al.*, 2012).

Lopes *et al.* (2012) realizaram a primeira tentativa de estudar a diversidade genética do *A. unedo* em Portugal, especificamente no interior norte e centro. A avaliação foi baseada em traços morfológicos e marcadores moleculares, especialmente RAPD e ISSR. Os resultados indicam que os genótipos de *A. unedo* mostram diferenças ao nível da morfologia da folha, especialmente no peso seco da folha, comprimento, largura e altura e comprimento do pedúnculo. Estas características foram responsáveis por 52.6% da variabilidade total. Apesar de a atividade humana ter resultado numa redução em área e aumentado o isolamento das populações de *A. unedo*, esta espécie mantém uma relativamente alta diversidade genética (Lopes *et al.*, 2012).

Santiso *et al.* (2015) analisaram 19 locais dentro da região mediterrânica, incluindo dois em Portugal, e demonstraram que houve uniformidade genética entre populações e alta capacidade de evoluir dentro das populações para vários traços fisiológicos importantes. Observou-se, ainda, várias características relacionadas com a resposta às condições ambientais.

Ações de conservação são recomendadas em vários locais de existência da espécie: Portugal (Lopes *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2017), Tunísia (Takrouni *et al.*, 2012).

2.3. Propagação seminal do medronheiro

A propagação por semente tem sido a forma tradicional de obter plantas de medronheiro (Passarinho *et al.*, 2017).

Uma semente apresenta dormência quando, sendo viável, não germina em condições favoráveis (Baskin e Baskin, 1989). As sementes do medronheiro não germinam facilmente na natureza (Passarinho *et al.*, 2017). Vários autores reportam que as sementes de medronheiro apresentam dormência e que a estratificação a frio é usada para ultrapassá-la (Karam e Al-Salem 2001; Tilki, 2004; Smiris *et al.*, 2006; Demirsoy *et al.*, 2010; Ertekin e Kirdar, 2010). A dormência fisiológica é a dormência primária presente neste género (Tilki, 2004).

2.3.1. Colheita dos frutos

Os frutos colhem-se quando se encontram maduros, normalmente a partir de novembro, e são colocados a amolecer em água durante umas horas antes de se extraírem as sementes (García-Fayos *et al.*, 2001). Quer Demirsoy *et al.* (2010) assim como Martins (2012) colocaram os frutos durante 24 horas em água para amolecer os tecidos. No caso dos frutos carnudos, como o medronheiro, há necessidade de proceder à sua maceração para extração das sementes (Alves, 1988).

2.3.2. Extração das sementes e conservação das sementes

Tapum (1980) descreveu o procedimento para a extração das sementes que, resumidamente, consiste na maceração dos frutos e passagem por um crivo com ajuda da pressão de um jato de água. Em relação à secagem, o mesmo autor (1980), indica a secagem ao sol, durante 8 a 10 dias, como método a utilizar.

Segundo García-Fayos *et al.* (2001), as sementes secam-se ao ar e no escuro até alcançarem a humidade de 6 a 8% e armazenam-se num saco hermético a 4-5 °C. Simis *et al.* (2006) armazenaram as sementes entre 2 e 4 °C. Demirsoy *et al.* (2010) secaram as sementes durante dois dias ao ar. Pipins *et al.* (2017) secaram as sementes ao ar durante uma semana, dentro do laboratório.

Tapum (1980) afirma que as sementes conservam a sua capacidade germinativa depois de secas durante 6 meses, enquanto que segundo García-Fayos *et al.* (2001), nas condições referidas acima, as sementes conservam-se durante pelo menos 3 anos.

Segundo Narbona *et al.* (2003), as sementes que flutuam não têm embrião e por isso não são viáveis. Pipins *et al.* (2017) removeram as sementes que flutuaram, aquando da extração.

Narbona *et al.* (2003) estudaram se a polpa do medronho contém substâncias inibidoras de germinação. Para isso colocaram a germinar sementes de medronho que regaram com uma solução de água e polpa de medronho triturada em partes iguais. As sementes deste tratamento não germinaram, sugerindo que a polpa do medronho contém inibidores de germinação. Segundo Smiris *et al.* (2006) e Navarro-Cerrillo *et al.* (2013), há que extrair a semente dos frutos o mais rapidamente possível para evitar que a polpa fermente, o que pode condicionar a viabilidade da semente. Hammami *et al.* (2005) reportaram que o fruto contém substâncias inibidoras da germinação que induzem dormência secundária.

2.3.2.1. Caracterização do lote de sementes com base em Alves (1988)

O grau ou coeficiente de pureza (G.P.) dum lote de sementes define-se como a relação percentual, em massa, entre as quantidades de semente pura e de semente misturada com todo o tipo de elementos estranhos, de acordo com a seguinte equação:

$$G.P. = \frac{\text{Massa semente "pura"}}{\text{Massa total da amostra}} \times 100$$

2.3.2.2. Testes de viabilidade com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

Uma semente está viável se tem capacidade de germinar e produzir uma plântula normal em condições favoráveis de crescimento (Borza *et al.*, 2007).

O teste do tetrazólio é um método estabelecido de avaliação da viabilidade de sementes que é amplamente utilizado para aplicações oficiais e não oficiais (International Seed Testing Association [ISTA], 1985). O teste proporciona uma forma rápida de avaliação da viabilidade das sementes e é considerado o método mais fiável (Sawma e Mohler, 2002).

O TTC é usado para distinguir tecidos metabolicamente ativos de tecidos inativos (Beyhan e Serdar, 2008). A atividade de enzimas do grupo das desidrogenases é um indicador do grau de respiração dos tecidos do embrião e por conseguinte da sua viabilidade. Esta atividade mede-se pela extensão, distribuição e intensidade de coloração vermelha que adquirem os tecidos embebidos na solução incolor de cloreto de 2,3,5 - trifeniltetrazólio. A redução do cloreto de 2,3,5 - trifeniltetrazólio pelas desidrogenases origina o trifenilformazano que tem a coloração vermelho, sendo estável e não se difunde (Raven *et al.*, 2014).

Neste teste, uma solução diluída de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio é aplicada às sementes e, após a sua penetração nas células vivas, o sal é reduzido a um composto avermelhado e insolúvel em água (ISTA, 1985). Após esta reação enzimática, uma semente é descrita como viável ou não viável a partir dos tecidos corados de vermelho dentro da semente (Borza *et al.*, 2007). É um método trabalhoso e é especialmente difícil de usar em

sementes pequenas, onde a identificação de alguns componentes do embrião requer alguma ampliação (Sawma e Mohler, 2002; Borza *et al.*, 2007).

Demirsoy *et al.* (2010) realizaram este teste em sementes de medronheiro, colocando as sementes 24 horas imersas em água, posteriormente retiram-lhes o tegumento da semente e mergulharam-nas numa solução de 1% de cloreto 2,3,5-trifenil-tetrazólio durante 24 horas numa incubadora a 24 °C. Neste estudo sementes de todos os genótipos exibiram 100% de viabilidade. Todavia, Narbona *et al.* (2003) registaram uma viabilidade média de 76,66% com o teste do tetrazólio, variando entre 40 e 97%.

2.3.3. Quebra da dormência e germinação das sementes

O estudo da dormência e germinação de sementes de medronheiro apresenta um grande interesse prático e comercial, uma vez que se apresenta como uma técnica de propagação simples (Smiris *et al.*, 2006).

Tratamentos com ácido giberélico (GA₃) são eficazes para quebrar a dormência e aumentar a taxa de germinação (Karam e Al-Salem, 2001; Tilki, 2004; Demirsoy *et al.*, 2010). Por outro lado, Ricardo e Veloso (1987), Mesléard e Lepart (1991) e Bertsoyklis e Papafotiu (2013) afirmam que sementes não estratificadas germinam a uma taxa superior quando colocadas a temperaturas alternadas de 15 e 20 °C ou a temperatura constante de 15 °C ou menos. Sementes não tratadas apresentam uma fraca germinação a 20/25 °C (Pipinis *et al.*, 2017).

A germinação de sementes é influenciada fortemente pela temperatura e a temperatura ótima de germinação é 20 °C (Hammami *et al.*, 2005). Exposição prolongada das sementes a temperaturas de 25 ou 30 °C não permitiram a germinação (Smiris *et al.*, 2006).

A proveniência das sementes apresenta uma influência significativa na taxa de germinação e tem um papel significativo nos estágios iniciais do medronheiro sobre diferentes regimes de rega (Demirsoy *et al.*, 2010; Vasques *et al.*, 2013; Pipinis *et al.*, 2017). Vasques *et al.* (2013) demonstraram que as plantas do local de proveniência com maior precipitação apresentam um maior potencial de crescimento, em condições de conforto hídrico e uma maior sensibilidade à seca que plântulas provenientes de sementes de locais mais secos. As sementes provenientes do local caracterizado por um verão mais seco deram origem a plântulas com maior peso seco de raízes e menor área foliar, de salientar que estes resultados apenas comparam três locais de proveniência, com regimes hidrológicos a variar entre os 1449 e os 509 mm.

Narbona *et al.* (2003) realizaram um tratamento com ácido sulfúrico durante 5 minutos para simular a passagem da semente pelo trato digestivo dos animais e concluiu que este tratamento não afetou significativamente a germinação, concluindo assim que as sementes de medronho podem ser digeridas por animais, mantendo a sua capacidade germinativa. No

seu trabalho obteve uma germinação de 40,5% para o grupo controlo, variando entre 28 e 64%.

Ricardo e Veloso (1987) concluíram que sementes não estratificadas de medronheiro da zona de Monchique germinam a uma taxa de 40%, quando colocadas a uma temperatura constante de 20 °C.

No Quadro II são apresentadas as taxas de germinação obtidas por vários autores, utilizando pré-tratamentos, durações de estratificação a frio e concentrações diferentes de GA₃. Letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes.

Quadro II. Taxa de germinação (%), segundo vários autores e diferentes tratamentos.

Tempo de estratificação a frio (dias)	Concentração de GA ₃ (mg L ⁻¹)	Germinação (%)					
		* ¹ 24 e 48 horas embebidas em GA ₃ , * ² diferentes proveniências dos lotes de semente					
		Autor					
		Tilki <i>et al.</i> (2004)	Simiris <i>et al.</i> (2006)* ¹	Demirsoy <i>et al.</i> (2010)* ²	Ertekin e Kirdar (2010)	Martins (2012)	Pipinis <i>et al.</i> (2017)* ²
0	0	6a		0	5f	5l	1-8
3	0					46m	
7	0					60m	
14	0					89n	
15	0				30g		
21	0	36b				97n	
28	0					95n	
30	0		0		53h		82-91
30	100		0-2				
30	500		6-30				82-94
30	1000		14-63				83-96
30	2000		34-61				86-98
30	3000		46-58				
35	0			4-24			
42	0	50c					
60	0		26		72i		
60	100		42-48				
60	500		30-40				
60	1000		44-68				
60	2000		29-50				
60	3000		44-46				
69	0	86d					
84	0	84d					
90	0		48		85j		
90	100		52-58				
90	500		82-86				
90	1000		66-67				
90	2000		77-78				
90	3000		63-68				
105	0			17-42			
0	300	84e		2-11			
0	500						40-79
0	600	89e		4-16			
0	900	82e					
0	1000						68-81
0	1200			6-35			
0	2000						80-90

Letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes.

2.3.4. Substrato

Segundo Navarro-Cerrillo *et al.* (2013), o medronheiro não é uma planta exigente em substrato, cultivando-se em formulações convencionais a partir de componentes orgânicos, como turfa ou de preferência fibra de coco (mais de 75% em volume), e algum componente inorgânico, como perlite, vermiculite ou areia de rio (menos de 25% do volume).

As plantas são altamente sensíveis à salinidade, e necessitam da presença de alguma argila (Varela, 1998, cit. por Correia, 1998). São, ainda, muito sensíveis à seca (García-Fayos *et al.*, 2001).

Gomes *et al.* (2009) num estudo de micropropagação de plantas de medronheiro utilizaram perlite (100%) como substrato para o processo de aclimatização de explantes. Gomes e Canhoto (2009) colocaram as plântulas, enraizadas de micropropagação, em fase de aclimatização em estufa, num recipiente com uma mistura de areia e *Siro 30* (1:1; v/v), *Siro 30* é um substrato comercial de casca de pinheiro compostada e turfa (70:30%; v/v). Navarro-García *et al.* (2011) utilizaram argila, vermiculite e turfa preta (5:3:2, v/v/v).

Para a produção de plantas florestais de origem seminal em contentor são utilizadas diversas misturas de compostos, como por exemplo turfa e perlite (75:25%; v/v). Com esta mistura pretende-se garantir a capacidade de retenção de água e de nutrientes, assegurada pela presença de turfa, bem como, o arejamento necessário ao desenvolvimento das raízes e à drenagem do excesso de água. Em geral é adicionado um adubo composto de libertação controlada, de forma a assegurar o fornecimento de nutrientes à planta e a reduzir o risco de lixiviação dos mesmos (Ribeiro *et al.*, 2001).

2.3.5. Aclimatização

De acordo com Navarro-Cerrillo *et al.* (2013), os alvéolos devem ser mantidos em temperaturas suaves, em plena luz e evitando temperaturas altas ou luz solar direta.

Observam-se, recorrentemente, manchas foliares em plantas de viveiros e em plantas no campo (Navarro-Cerrillo *et al.*, 2013). Foi identificado o agente causal destas manchas, trata-se de um fungo da espécie *Septoria unedonis* (Pennisi e Agosteo, 1995; Muñoz, 1999; Romero e Trapero, 2003).

Navarro-García *et al.* (2011) conduziram a sua experiência com medronheiro numa estufa de plástico equipada com sistema de arrefecimento, as plântulas foram regadas três a cinco vezes por semana usando o método gota a gota. A temperatura máxima/mínima média atingida dentro da estufa foi 33/18 °C, a humidade relativa variou entre 55 e 80% e a radiação média máxima foi de 960 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Papafotiou *et al.* (2013) realizaram a sua experiência sobre a germinação de medronheiro numa estufa de vidro aquecida ($T_{\min} = 14 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\max} = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$), equipada com rede de sombra a 40% nas primeiras duas semanas de aclimatização com um fotoperíodo de 16 horas. As plântulas foram regadas duas vezes por semana.

3. Material e métodos

3.1. Colheita do material

O material recolhido foi o fruto da espécie *Arbutus unedo* L., vulgo medronho. Durante as missões de colheita, limitou-se a colheita de sementes a um máximo de 20% do número total de frutos maduros disponíveis, de modo a minimizar o impacto na futura sobrevivência das populações.

Os frutos, depois de identificados, foram colocados em arcas de frio, para transporte, no período mais curto de tempo, com o objetivo da extração da semente.

A recolha foi realizada em plantas selecionadas aleatoriamente: 26 plantas em São Mamede, 25 em Monchique, 25 na serra do Caldeirão, 20 no Barrocal e 24 em Penamacor. A prospeção e colheita foram realizadas em zonas abrangidas pela Rede Nacional de Áreas Protegidas e Sítios Diretiva Habitats, de acordo com a integração da área de distribuição da espécie com as Áreas Classificadas, partindo do princípio que nessas áreas terá existido menor ocupação com outras espécies, como o eucalipto ou mesmo áreas contínuas de pinheiro, promovendo assim, uma maior conservação da biodiversidade associada à espécie e à sua inserção nos diferentes ecossistemas naturais.

No âmbito do projeto foram selecionados locais para prospeção e colheita de material vegetal em quatro tipos de regiões, como mostra o Quadro III.

Quadro III. Locais de prospeção e colheita de material vegetal no âmbito do projeto em que esta dissertação está inserida.

Região	Local/Identificação*
Interior com maior potencial para produção de medronho	Serra do Caldeirão; 57 PTCON0057 Serra da Gardunha; 28 PTCON0028
Litoral com maior potencial para produção de medronho	Serra de Monchique; 37 PTCON0037 Serra da Lousã; 60 PTCON0060
Interior com menor potencial para produção de medronho	São Mamede; 7 PTCON0007 Malcata; 4 PTCON0004
Litoral com menor potencial para produção de medronho	Monfurado e Cabrela; 31 e 33 PTCON0031 PTCON0033 Sicó/Alvaiázere; 45 PTCON0045

*Identificação das áreas selecionadas de acordo com os Sítios de Importância Comunitária - Rede Natura 2000

3.1.1. Locais de colheita

Os dados da precipitação foram disponibilizados pelo portal do clima do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I. P. [IPMA] a partir do histórico simulado – 1971-2000, modelo Ensemble.

3.1.1.1. Serra de São Mamede

A ação de prospeção à serra de São Mamede realizou-se no dia 13 de novembro de 2018.

A maior parte da superfície do Parque Natural da serra de São Mamede é composta por xistos (ICNF, sd).

Neste local foram recolhidos frutos de 26 plantas sendo que 24 se encontravam num solo de textura francoarenosa e 2 argiloarenosa. O pH variou entre 4 e 5,5 para 22 locais de colheita e foi menor que 4 para 4 locais. Em relação à exposição das plantas 16 apresentavam exposição a sudoeste, 6 a noroeste, 3 a sul e 1 sem exposição preferencial (ESAC, 2019).

Todas as plantas de onde se recolheram frutos encontram-se no distrito e concelho de Portalegre, sendo a sua distribuição por freguesia a seguinte: 16 na União das Freguesias da Sé e São Lourenço, 8 na União das freguesias de Ribeira de Nisa e Carreiras e 2 na freguesia de Alegrete. A altitude variou entre os 564 e os 665 metros.

A precipitação no local é estimada em 1153.8 mm (IPMA, 2015).

Na Figura 5 é apresentado um conjunto de fotografias que ilustram a ação à serra de São Mamede.



Figura 5. Ação de prospeção e colheita de frutos, no dia 13 de novembro de 2018, na serra de São Mamede.

3.1.1.2. Serra de Monchique

A colheita de frutos decorreu no dia 28 de novembro de 2018.

Geologicamente a serra é formada por rochas eruptivas (sienitos), envolvidas por rochas de natureza xistosa (Res. C. Min. n.º 115-A/2008).

Das 25 plantas de onde se recolheram frutos, 9 estavam localizadas em solos de textura francoarenoso e 16 argiloarenoso, todas em solos com pH entre 4 e 4,5. Destaque-se que esta zona foi a única a apresentar reação ao HCl. Relativamente à exposição, 5 apresentavam exposição a norte, 2 a noroeste, 5 a sudoeste, 5 a oeste, 1 a sul, 1 a este e 3 sem exposição preferencial (ESAC, 2019).

Todos os locais de colheita localizam-se no distrito de Faro, concelho de Monchique, freguesia de Marmelete. A altitude compreendeu-se entre os 216 e os 521 metros.

A precipitação estimada para o local é de 944.4 mm (IPMA, 2015).

A planta número 25 da prospeção a Monchique não é uma planta silvestre, mas caracterizada pelo produtor como excelente produtora de fruto para destilar.

Na Figura 6 é apresentado um conjunto de fotografias que ilustram a ação à serra de Monchique.



Figura 6. Ação de prospeção e colheita de frutos, no dia 28 de novembro de 2018, na serra de Monchique.

3.1.1.3. Serra do Caldeirão

A ação à serra do Caldeirão realizou-se no dia 29 de novembro de 2018.

É composto fundamentalmente por solos de xistos, esqueléticos e pobres (Res. C. Min. n.º 115-A/2008).

Foram colhidos frutos de 25 plantas na serra do Caldeirão, todas localizadas em solos de textura argiloarenosa e com pH 5,5 a 7,5. A exposição foi diversificada: 7 a nordeste, 6 a norte, 4 a noroeste, 3 a oeste, 2 a sudeste, 2 a sul e 1 a este (ESAC, 2019).

A colheita de frutos realizou-se em plantas localizadas no distrito de Faro. 11 das plantas no concelho e freguesia de São Brás de Alportel e 14 no concelho de Loulé, freguesia de União de Freguesias de Querença, Tôr e Benafim. A altitude variou entre 244 e 361 m.

A estimativa de precipitação para o local foi de 758.5 mm (IPMA, 2015).

Na Figura 7 é apresentado um conjunto de fotografias que ilustram a ação à serra do Caldeirão.



Figura 7. Ação de prospeção e colheita de frutos, no dia 29 de novembro de 2018, na serra do Caldeirão.

3.1.1.4. Barrocal

A ação de prospeção à sub-região natural do Algarve, Barrocal, realizou-se no dia 29 de novembro de 2018.

Verifica-se o domínio claro dos solos calcários vermelhos dos climas de regime xérico (Vc) e dos solos calcários pardos dos climas de regime xérico (Pc), que são solos pouco evoluídos, formados a partir de rochas calcárias, com horizonte B câmbico de cor parda forte a vermelha, alcalino (pH 7,4 - 8,5), correspondendo aos cambissolos crómicos calcários da legenda da FAO (Gomes e Ferreira, 2005).

Foram colhidos frutos de 20 plantas, todas de solos com textura francoargilosa e pH 7,5 a 9. Em relação à exposição, 7 plantas apresentavam exposição a norte, 4 a sul, 3 sem exposição preferencial, 2 a este, 1 a sudeste, 1 a nordeste, 1 a noroeste e 1 a sudoeste (ESAC, 2019).

Todas as plantas localizam-se no distrito de Faro, concelho de Loulé, freguesia de São Clemente. A altitude deste local de colheita situou-se entre os 270 e os 341 m.

A precipitação estimada foi de 705.3 mm (IPMA, 2015).

Na Figura 8 é apresentado um conjunto de fotografias que ilustram a ação ao Barrocal.



Figura 8. Ação de prospeção e colheita de frutos, no dia 29 de novembro de 2018, no Barrocal.

3.1.1.5. Penamacor

A ação de prospeção realizou-se a 19 de dezembro de 2018.

O conselho de Penamacor caracteriza-se pelos solos graníticos e secos a sul (CMP, sd).

Foram selecionadas 25 plantas, sendo que 1 não apresentava frutos, estando todas inseridas em solos de textura francoarenosa e pH entre 4 e 5,5. A exposição mais marcada foi norte com 13 plantas, seguido de nordeste com 8, oeste com 2, este com 1 e 1 planta sem exposição preferencial (ESAC, 2019).

Todas as plantas localizam-se no distrito de Castelo Branco, concelho de Penamacor, freguesia de Salvador. A altitude variou entre 449 e 718 m.

A precipitação estimada foi de 989.5 mm (IPMA, 2015).

Na Figura 9 é apresentado um conjunto de fotografias que ilustram a ação a Penamacor.



Figura 9. Ação de prospeção e colheita de frutos, no dia 19 de dezembro de 2018, em Penamacor.

3.2. Preparação da polpa para extração das sementes

Após a colheita dos frutos e chegada à Escola Agrária de Coimbra os frutos foram colocados em garrafas de água de 1,5 litros cortadas com 0,5 litros de água e com adição de açúcar para acelerar o processo de fermentação do fruto. Este processo teve o objetivo de amolecer a polpa dos frutos para facilitar a extração das sementes. No Quadro IV apresenta-se o tempo de amolecimento da polpa dos frutos por local de colheita e na Figura 10 o aspeto dos frutos para extração de semente ao fim de 54 dias de amolecimento.

Quadro IV. Tempo de amolecimento da polpa dos frutos por local de colheita.

Local	Tempo de amolecimento (dias)
Serra de São Mamede	54
Serra de Monchique	39
Serra do Caldeirão	39
Barrocal	39
Penamacor	20



Figura 10. Estado dos frutos para extração de semente ao 54.º dia de amolecimento dos frutos.

3.3. Extração das sementes

A extração das sementes realizou-se do dia 7 até ao dia 9 de janeiro de 2019.

3.3.1. Seleção do crivo

O crivo tem obrigatoriamente de ter uma malha menor que as sementes mais pequenas e deve ser de malha maior que a maioria do esclerênquima.

Com um tabuleiro por baixo para se visualizar se está a ocorrer perda de semente, testaram-se vários crivos, concluindo-se que o crivo de malha 1,71 mm seria o mais indicado para o efeito pretendido.

Na Figura 11 pode-se observar que o crivo utilizado, de malha mais apertada que o crivo utilizado na Figura 12, é incapaz de separar as sementes do esclerênquima do fruto. Na Figura 12 pode-se, ainda, verificar que a maior parte do esclerênquima se encontra no tabuleiro, ou seja, passou pelo crivo, e o crivo na imagem, de malha 1,71 mm, conservou as sementes.



Figura 11. Crivo de malha menor.



Figura 12. Crivo de malha maior.

3.3.2. Extração das sementes

Com o crivo selecionado, a água a correr e um tabuleiro por baixo (como segurança) despejou-se a garrafa de água com os frutos fermentados para dentro do crivo. Pressionou-se a mão sobre a mistura até a água, que saía pela saída do crivo, fosse translúcida, ou seja, sem polpa. O processo levou cerca de 5 minutos por garrafa.

Quando a maior parte do esclerênquima passou pelo crivo fechou-se a água e despejou-se a mistura de sementes e algum esclerênquima para o recipiente (Figura 13).



Figura 13. Tabuleiro com as sementes extraídas.

Com uma colher retirou-se o resto de sementes que ficou agarrado ao crivo e colocou-se no recipiente. No final de cada extração de sementes passou-se o crivo e a colher por água, de modo a remover qualquer semente que tenha ficado presa no crivo.

3.4. Secagem das sementes

Colocaram-se as sementes numa estufa com circulação de ar forçada a temperatura variável entre os 25 °C e os 30 °C durante 5 dias.

Na Figura 14 é apresentado o aspeto das sementes após a secagem.



Figura 14. Aspeto das sementes após a secagem.

3.5. Caracterização dos lotes de semente

3.5.1. Massa de dez sementes, pureza, massa do lote, estimativa do número de sementes por lote

Os 120 lotes de semente foram caracterizados pelos seguintes parâmetros:

- Massa de dez sementes – avaliou-se a massa de dez sementes de cada lote com uma balança digital (Figura 15) com a precisão de 0,0001 g (Figura 16). Através dessa medição calculou-se o número de sementes por 1 quilograma;
- Grau de pureza (G.P.) – avaliou-se a massa de uma amostra de cada lote (+/- 350 gramas), posteriormente retirou-se da amostra apenas as sementes, e avaliou-se a massa das sementes que estavam presentes da amostra. Por fim calculou-se o G.P.;
- Massa do lote – avaliou-se a massa individualmente de cada lote;
- Estimativa do número de sementes por lote – através da % de sementes da amostra e da massa do lote procedeu-se ao cálculo da estimativa do número de sementes do lote.

Dos 120 lotes existentes foram selecionados 3 lotes de cada origem diferente com os seguintes números de acesso, tendo em consideração a estimativa do número de sementes por lote, escolhendo os lotes que apresentavam maior número de sementes, de modo a não comprometer os objetivos do projeto:

- Serra de São Mamede: S.M. 13, S.M. 24 e S.M. 26;
- Serra de Monchique: Mon. 09, Mon. 19 e Mon. 24;
- Serra do Caldeirão: Cald. 03, Cald. 22 e Cald. 23;
- Barrocal: Bar. 07, Bar. 18 e Bar. 19;
- Penamacor: Pen. 04, Pen. 05 e Pen. 15.

Posteriormente à seleção dos lotes, foram levados os respetivos lotes de semente para realização de ensaios de estratificação e de viabilidade no Instituto Superior de Agronomia.

3.5.2. Ensaio de estratificação

3.5.2.1. Modalidades de tratamentos

Realizaram-se 8 tipos diferentes de pré-tratamentos aos lotes de semente selecionados anteriormente:

- C: Controlo, germinação das sementes sem qualquer pré-tratamento;
- 1: 15 dias sobre um suporte físico saturado em água a 4 °C e selado com *parafilm*;
- 2: 29 dias sobre um suporte físico saturado em água a 4 °C e selado com *parafilm*;
- 3: 46 dias sobre um suporte físico saturado em água a 4 °C e selado com *parafilm*;
- 4: 60 dias sobre um suporte físico saturado em água a 4 °C e selado com *parafilm*;
- 5: 75 dias sobre um suporte físico saturado em água a 4 °C e selado com *parafilm*;
- 6: 90 dias sobre um suporte físico saturado em água a 4 °C e selado com *parafilm*;
- 7: 31 dias sobre um suporte físico saturado em água a 4 °C e selado com *parafilm* + 2000 mg L⁻¹ de GA₃ durante 24 horas;
- 8: 31 dias sobre um suporte físico saturado em água a 4 °C e selado com *parafilm* + 2000 mg L⁻¹ de GA₃ durante 24 horas + 30 minutos de H₂SO₄ (95-97%).

3.5.2.2. Procedimento das sementes estratificadas sem GA₃

Contaram-se 30 sementes por tratamento e por lote sempre que o número de sementes o permitiu (Figura 17).



Figura 15. Detalhe do processo de contagem de sementes. As sementes são mais escuras que o esclerênquima, que se apresenta mais rosado.

Colocaram-se as sementes em água destilada e esterilizada durante 24 horas e a temperatura ambiente. Para a estratificação e posterior germinação utilizaram-se caixas de Petri com perlite esterilizada e uma folha de papel de filtro por cima da perlite.

Aplicou-se fungicida próprio para sementes constituído por uma mistura da substância ativa carbendazime (150g/l) e da substância ativa tirame (300g/l).

Posteriormente realizaram-se quatro lavagens com água destilada e esterilizada e colocaram-se as sementes em gobelés desinfetados com álcool etílico a 70% de modo a retirar as sementes que flutuam. Estas foram colocadas de parte e estratificadas durante 90 dias, de modo a verificar se as sementes de medronheiro que flutuam não germinam.

Retirou-se a água dos gobelés e colocaram-se as sementes nas caixas de Petri, 5 linhas de 10 sementes por caixa (Figura 18).

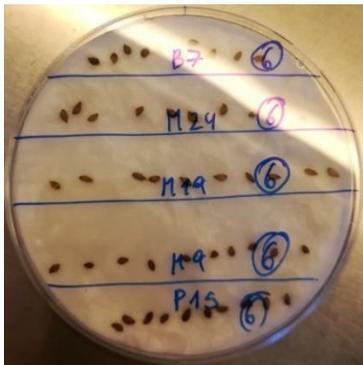


Figura 16. Exemplo de uma caixa de Petri com 10 sementes colocadas em linha.

Todos os trabalhos decorreram numa câmara de fluxo laminar.

As caixas que continham sementes para estratificação foram colocadas num frigorífico a 4 °C. As caixas de controlo foram colocadas a germinar numa sala escura entre os 20 °C e os 22 °C.

Completados os tempos de estratificação, as caixas de Petri foram sendo colocadas na mesma sala onde se colocaram as caixas com o controlo e contabilizou-se o número de sementes germinadas ao longo de 3 meses, duas vezes por semana.

Sempre que necessário foi reposta a água nas caixas de Petri, numa câmara de fluxo laminar. Realizou-se uma aplicação de uma mistura de duas substâncias ativas com propriedades fungicidas (carbendazime (15g/l) e tirame (30g/l)) quando se verificou proliferação de fungos em alguma caixa de Petri.

3.5.2.3. Procedimento das sementes estratificadas com GA₃

Contaram-se 30 sementes por tratamento e por lote, sempre que o número de sementes assim o permitiu e colocaram-se num recipiente de fazer chá.

Colocaram-se as sementes num gobelé durante 1 minuto numa solução de álcool etílico a 70%, posteriormente lavou-se com água destilada e esterilizada durante 1 minuto. De seguida colocaram-se as sementes numa solução de lixívia a 20%, novamente durante 1 minuto, seguindo-se 3 lavagens com água destilada, sendo a última durante 1 minuto (Figura 19).

Depois de desinfetadas as sementes, selecionaram-se 30 sementes de cada lote para o tratamento que incluí escarificação com ácido sulfúrico (95-97%) durante 30 minutos, na câmara de fluxo laminar. Colocaram-se os gobelés pequenos, onde se encontravam as sementes separadas por lotes, num tabuleiro cheio de gelo, de modo a que, quando se colocasse o ácido, este não aquecesse demasiado (Figura 20). Depois de tudo preparado, colocou-se o ácido sulfúrico (95-97%) e cronometraram-se os 30 minutos, ao fim dos quais se retirou o ácido.

Ao conjunto de lotes dos dois tratamentos (GA₃ e GA₃ + H₂SO₄) foi adicionado GA₃ de modo a que as sementes ficassem cobertas dentro dos gobelés. Os gobelés foram colocadas num agitador e ao fim de 24 horas retirou-se o GA₃ e colocaram-se as 30 sementes de cada lote e de cada tratamento em metade de uma caixa de Petri e na outra metade as 30 sementes do mesmo lote, mas com o tratamento diferente (Figura 21). Para a estratificação e posterior germinação utilizou-se caixas de Petri com perlite esterilizada e uma folha de papel de filtro por cima da perlite.



Figura 17. Aspeto de uma caixa de Petri com e sem tratamento de ácido.

Colocaram-se as caixas de Petri num frigorífico a 4 °C durante 31 dias e posteriormente colocaram-se na sala onde se colocaram as caixas dos tratamentos anteriores e observou-se o número de sementes germinadas durante 3 meses.

Sempre que necessário foi reposta a água nas caixas de Petri. Realizou-se uma aplicação de uma mistura de duas substâncias ativas com propriedades fungicidas (Derosal – 60% (p/p) carbendazime (15g/l) e Urame 80 – 80% (p/p) tirame (30g/l)) quando se verificou proliferação de fungos em alguma caixa de Petri.

3.5.3. Teste de viabilidade (TTC)

Os testes de viabilidade realizaram-se com uma substância chamada cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1%. Sempre que possível utilizaram-se 30 sementes de cada lote para a realização deste teste.

Depois de se contar o número de sementes, abriu-se ao meio cada semente de modo a que o embrião e o material envolvente à semente ficassem visíveis. Adicionou-se a solução de TTC e colocaram-se as sementes numa câmara escura de um dia para o outro, sensivelmente 20 horas.

Com auxílio de uma lupa observou-se e documentou-se quais as sementes que apresentaram coloração vermelha.

No Quadro V é apresentado a contagem do número de sementes usadas para cada tratamento e para cada lote de semente. No quadro VI é apresentado as datas de ocorrência da caracterização dos lotes de semente.

Quadro V. Número de sementes usadas para cada tratamento e para cada lote.

		Tratamento									TTC
		C	1	2	3	4	5	6	7	8	
Lote	S.M. 13	24	26	24	26	26	26	25	25	25	12
	S.M. 24	1	11	11	11	10	10	10	6	7	6
	S.M. 26	28	28	28	28	28	28	28	25	29	11
	Mon. 9	30	30	30	29	30	29	30	30	31	30
	Mon. 19	30	30	30	30	30	31	30	30	30	30
	Mon. 24	23	25	25	25	25	25	28	0	0	0
	Cald. 3	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	Cald. 22	30	30	30	30	30	30	30	20	19	11
	Cald. 23	29	30	30	30	30	31	30	31	28	26
	Bar. 7	25	29	27	29	29	28	26	29	29	36
	Bar. 18	30	30	30	30	30	30	30	35	28	30
	Bar. 19	29	30	30	30	30	30	30	30	28	31
	Pen. 4	22	23	23	24	29	23	23	30	28	29
	Pen. 5	30	30	30	31	24	30	30	17	17	6
Pen. 15	30	29	30	30	30	30	30	12	10	6	

Legenda dos tratamentos: C – controlo, germinação das sementes sem qualquer tratamento; 1 – 15 dias de estratificação; 2 – 29 dias de estratificação; 3 – 46 dias de estratificação; 4 – 60 dias de estratificação; 5 – 75 dias de estratificação; 6 – 90 dias de estratificação; 7 – 31 dias de estratificação e 2000 mg L⁻¹ de GA₃ durante 24h; 8 - 31 dias de estratificação, 2000 mg L⁻¹ de GA₃ durante 24h e 30 minutos de H₂SO₄.

Quadro VI. Calendário das ações de caracterização dos lotes de semente.

Parâmetro avaliado / Ação	Data
Massa de dez sementes, pureza, massa do lote, estimativa do número de sementes por lote	16/01/2019 – 20/01/2019
Preparação dos ensaios de germinação sem GA ₃ e sem H ₂ SO ₄	21/01/2019 – 25/01/2019
Preparação dos ensaios de germinação com GA ₃ e H ₂ SO ₄	20/05/2019 – 24/05/2019
Teste de viabilidade	22/05/2019 – 23/05/2019

o número de sementes pretendido. Sempre que a massa calculada foi superior à metade da massa do lote completo retirou-se apenas metade da massa do lote, de modo a não comprometer o banco de sementes.

3.7.2. Estratificação

3.7.2.1. Lavagem da câmara frigorífica e desinfecção das sementes

Como tratamento pré-germinativo para estimular a germinação das sementes foi realizada uma estratificação a frio (4 °C). Para a estratificação da semente e considerando o número total de acessos (120) a manipular individualmente foi utilizada uma câmara frigorífica onde foram instaladas prateleiras para colocação dos diferentes acessos durante o período de estratificação (60 dias). De forma a garantir a desinfecção do equipamento, procedeu-se à lavagem da câmara frigorífica e do restante equipamento com lixívia diluída a 10% para evitar a contaminação por fungos.

A desinfecção das sementes realizou-se de forma igual ao procedimento anterior, descrito no ponto 1.5.2.3.

3.7.2.2. Preparação do substrato e colocação das sementes

Em garrafões de 5 litros de água abriram-se buracos num dos lados para permitir o escoamento de água em excesso, de forma a evitar danos sobre o desenvolvimento radicular das plantas. De seguida abriu-se a caixa ao meio de modo a permitir uma abertura e fecho rápido e eficaz (Figura 23). No lado contrário ao lado onde se efetuaram os furos colocaram-se um papel com a identificação do lote, sendo que cada garrafão levou 2 lotes de semente a estratificar.

O substrato utilizado foi uma mistura de perlite (75%) e de vermiculite (25%) humedecida com água destilada. Este substrato permitiu preencher as condições necessárias para o tratamento pré-germinativo e promover a posteriormente a germinação das sementes em estufa, sendo neste último objetivo relevante, além do arejamento, a capacidade de retenção de água, daí a utilização da vermiculite. Para as duas condições foi utilizado material mineral, inorgânico, com o objetivo de garantir as melhores condições de sanidade para as sementes e posteriormente para as plântulas em fase de germinação até à transplantação para contentor definitivo. Colocou-se uma quantidade do substrato aproximada a 2 cm de altura, de modo a permitir o desenvolvimento radicular da futura plântula. Posteriormente adicionaram-se as sementes por cima do substrato (Figura 24).

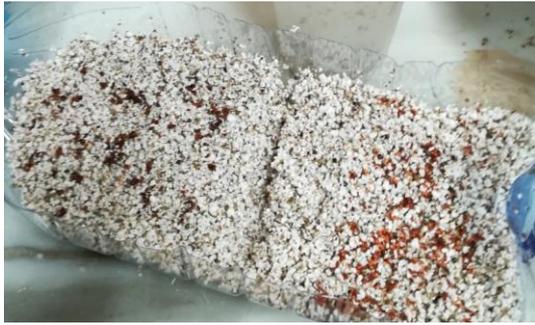


Figura 19. Sementes por cima do substrato.

Por fim cobriu-se a camada de sementes com uma camada fina de perlite, de forma a evitar processos contínuos de humidificação e secagem da semente. Após o processo de cobertura da semente, borrifou-se o interior do garrafão com água destilada e isolou-se com película aderente, de forma a evitar perda de humidade.

Colocaram-se na câmara frigorífica a temperatura constante de 4 °C, um total de 60 contentores, correspondentes à semente, dos 120 acessos, previamente processada (Figura 25).



Figura 20. Sementes a estratificar na câmara frigorífica.

Este processo foi realizado dia 28 e 29 de janeiro de 2019.

3.7.3. Obtenção de plântulas

No dia 29 de março de 2019, contabilizando 60 dias de estratificação a 4°C, retiraram-se os contentores com as sementes do frio e foram transportados para a empresa *GreenClon*, entidade parceira do projeto responsável pela produção das plantas, em Cantanhede, onde permaneceram a germinar e desenvolver, dentro dos garrafões, até dia 13 de maio de 2019.

As condições de germinação foram numa estufa aberta de dois lados de plástico branco.

3.7.4. Transplantação

No dia 13 de maio de 2019 foi realizada a transplantação da totalidade das plântulas germinadas para contentores de 60 alvéolos florestais com 220 cm³ cada um, com o substrato SIRO Germe Biológico, produzido pela empresa Leal & Soares (Mira, Portugal), pH de 5.5 a 6.5, mais de 90% de matéria orgânica e a seguinte constituição de nutrientes, N: 100-250 mg/l, P₂O₅: 100-250 mg/l e K₂O: 200-400 mg/l.

O processo iniciou-se com a retirada da plântula do garrafão com auxílio de uma pinça, de seguida passou-se a raiz da plântula por uma mistura de água com argila, de modo a condensar a raiz no caso de existir raízes adventícias (Figura 26). Por último realizou-se um buraco no substrato que se encontrava dentro do alvéolo para permitir a colocação da parte radicular da plântula no local correto e calcou-se o substrato, junto da jovem plântula, para aumentar a aderência e estimular o desenvolvimento da raiz. Concluindo-se, assim, o transplante dos garrafões para os alvéolos.



Figura 21. Mistura de água e argila para condensação da raiz.

Nesse dia, 13 de maio, avaliou-se o número de plântulas de cada lote.

3.7.5. Adubações e aplicação de produtos fitofarmacêuticos

Todas as aplicações foram realizadas de acordo com as práticas da empresa.

Nas adubações foi utilizado um adubo composto (13:40:13 + micro) com uma maior concentração de fósforo para estimular o desenvolvimento radicular, essencial para o desenvolvimento de um torrão coeso de substrato e raízes, favorável à posterior transplantação da planta para o campo. Além deste adubo foi utilizado um bioestimulante, com azoto, potássio e aminoácidos livres.

Como tratamentos fitossanitários foram utilizados fungicidas sistémicos e de superfície que atuam como preventivo e curativo de podridões, que se desenvolvem facilmente em viveiros, em particular em estufa, em ambiente quente e húmido.

No Quadro VII é apresentado o calendário das aplicações de adubos e produtos fitofarmacêuticos realizados desde a transplantação até ao final de agosto de 2018, com base nos cadernos de campo da empresa.

Quadro VII. Calendário das aplicações de adubos e produtos fitofarmacêuticos realizados.

Nome comercial	Constituição %	Data da aplicação	Dose	Objetivo
YaraTera Kristalon (13-40-13)	N: 13, P₂O₅: 40, K₂O: 13, Fe: 0.07, Mn: 0.04, Zn: 0.025, B: 0.025, Cu: 0.01, Mo: 0.004	20/05	1.5 g/m ²	Desenvolvimento radicular
Syngenta SWITCH	ciprodinil: 37.5, fludioxonil: 25	23/05	0.0916(6) g/m ²	Prevenção podridão cinzenta
Timac AGRO ECOVIOR AA (3-0-7)	N: 3, K₂O: 7, Aminoácidos livres: 17	30/05	0.25 ml/m ²	Desenvolvimento foliar
YaraTera Kristalon (13-40-13)	N: 13, P₂O₅: 40, K₂O: 13, Fe: 0.07, Mn: 0.04, Zn: 0.025, B: 0.025, Cu: 0.01, Mo: 0.004	13/06	1.5 g/m ²	Desenvolvimento radicular
Aliette Flash	fosetil-Al: 74	20/06	0.2083(3) g/m ²	Podridão do colo e raízes
Promi-fertil (12-40-12)	N: 12, P₂O₅: 40, K₂O: 12, MgO: 1.5,	04/07	0.16(6) g/m ²	Desenvolvimento radicular e foliar
YaraTera Kristalon (13-40-13)	N: 13, P₂O₅: 40, K₂O: 13, Fe: 0.07, Mn: 0.04, Zn: 0.025, B: 0.025, Cu: 0.01, Mo: 0.004	11/07	1 g/m ²	Desenvolvimento radicular
Syngenta SWITCH	ciprodinil: 37.5, fludioxonil: 25	25/07	0.0916(6) g/m ²	Prevenção podridão cinzenta
Timac AGRO ECOVIOR AA (3-0-7)	N: 3, K₂O: 7, Aminoácidos livres: 17	08/08	0.25 ml/m ²	Desenvolvimento foliar
YaraTera Kristalon (13-40-13)	N: 13, P₂O₅: 40, K₂O: 13, Fe: 0.07, Mn: 0.04, Zn: 0.025, B: 0.025, Cu: 0.01, Mo: 0.004	22/08	1 g/m ²	Desenvolvimento radicular

3.7.6. Monitorização dos crescimentos e da taxa de mortalidade

A monitorização dos crescimentos das plântulas realizou-se, de duas em duas semanas, medindo a altura da plântula desde o substrato até à ponta da folha mais alta, iniciando-se no dia 28 de maio de 2019 e terminando no dia 2 de setembro de 2019.

A contagem do número de plântulas sobreviventes realizou-se de duas em duas semanas até dia 11 de junho de 2019 e de quatro em quatro semanas até dia 2 de setembro de 2019. A partir do número de plântulas que sobreviveram calculou-se a taxa de mortalidade.

3.8. Análise estatística dos resultados

No programa R (The R Foundation for Statistical Computing, 2019) calcularam-se as médias e analisaram-se as variâncias (ANOVA), sempre que os pressupostos desse teste foram cumpridos. Para os dados sobre a estratificação a ANOVA foi feita a dois fatores. Para os resultados em que as médias tiveram diferenças significativas na análise de variância realizou-se o teste de Tukey para comparação múltipla das médias, com $\alpha = 0,05$.

Quando os pressupostos da ANOVA não foram cumpridos, realizou-se um teste de Kruskal-Wallis, com o mesmo nível de significância, que analisa as medianas e difere as classes de acordo com o seu ranking.

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização dos lotes de semente

4.1.1. Número de sementes por quilograma

Nos quadros VIII e IX apresentam-se os valores médios da estimativa do número de sementes por quilograma por local de proveniência e por exposição.

Quadro VIII. Número de sementes por quilograma em função do local de proveniência.

Local	Mínimo - Média - Máximo do n.º de sementes kg⁻¹
São Mamede (S.M.)	389 105 - 715 897 a - 1 250 000
Monchique (Mon.)	29325 - 411 863 c - 574 713
Caldeirão (Cald.)	347 00 - 475 148 b - 781 250
Barrocal (Bar.)	338 983 - 457 652 b - 636 943
Penamacor (Pen.)	330 033 - 502 729 bc - 1 190 476
Média	517 607

Letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes segundo teste não paramétrico de comparação de Kruskal-Wallis para $\alpha = 0.05$.

Quadro IX. Número de sementes por quilograma em função da exposição.

Exposição	Média do n.º de sementes kg⁻¹
N	477 948 bc
NE	510 472 abc
E	455 579 bc
SE	432 458 c
S	473 806 abc
SO	620 541 a
O	432 254 bc
NO	627 561 ab
Sem exposição preferencial	499 858 abc

Letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes segundo teste não paramétrico de comparação de Kruskal-Wallis para $\alpha = 0.05$.

O número médio de sementes por quilograma dos 119 indivíduos analisados foi de 517 607 sementes por quilograma, o valor máximo foi de 1 250 000, muito acima das 717 073 sementes por kg descritas por Louro e Pinto (2011), cit. por Navarro-Cerrillo *et al.* (2013), o valor mínimo foi de 293 255, dentro do intervalo descrito por Navarro-Cerrillo e Gálvez (2001).

A média situou-se ligeiramente acima da média apontada por García-Fayos *et al.* (2001) e Louro e Pinto (2011), cit. por Navarro-Cerrillo *et al.* (2013).

O local de proveniência afetou significativamente o número de sementes por quilograma. São Mamede apresenta o maior número de sementes por quilograma e Monchique o menor número de sementes por quilograma. A variabilidade genética dos diferentes locais e o potencial para produção de medronho (Quadro III) podem explicar as variações da massa de cada semente de medronheiro de local para local. As condições edafoclimáticas que levam a que um local seja mais apto para a produção de medronho têm que ver com os tipos de solo, quantidade e distribuição da precipitação ao longo do ano, humidade do ar, temperatura, entre outros aspetos, que leva a que certos indivíduos, num local, tenham uma maior acumulação de hidratos de carbono aumentando assim o tamanho da semente e por consequência a massa de cada semente. Ao analisar o Quadro III verifica-se que o local definido como tendo maior potencial para produção de medronho, Monchique, foi o que apresentou menor número de semente por quilograma. Por outro lado os locais com menor potencial para produção de medronho, São Mamede, Penamacor (Malcata) e Caldeirão, são os que apresentam maior número de semente por quilograma. São Mamede apresenta uma grande diferença em relação aos outros quatro locais e pode estar relacionado com a viabilidade das sementes desta proveniência.

A exposição também afetou significativamente o número de sementes por quilograma, exposições a sudeste, norte, este e oeste diminuem o número de sementes e exposições a sudoeste aumentam o número de sementes por quilograma. Para estes resultados não foi encontrada uma explicação adequada.

4.1.2. Grau de Pureza

O grau de pureza médio situou-se nos 52,2 e variou entre 93,1 e 7,1. O valor médio situa-se dentro dos intervalos apontados na bibliografia (Quadro I). O grau de pureza, no caso do medronheiro, é extremamente dependente dos seguintes pontos: tamanho do esclerênquima, caso este seja de um tamanho próximo da semente, a sua separação é bastante difícil por meio de crivagem; capacidade do operador em comprimir a massa contra o crivo, quanto mais força aplicada mais fácil se torna a separação da polpa do fruto da semente; tempo da crivagem, quanto mais tempo, menor a quantidade de material que não é semente.

Neste trabalho a crivagem foi realizada por três operadores diferentes com crivos de tamanho aproximado, sendo de esperar que certos indivíduos tenham graus de pureza mais baixos que outros.

4.1.3. Testes de viabilidade

Na Figura 27 é apresentado um exemplo, neste caso do indivíduo Pen. 5, em que é possível identificar claramente a coloração vermelha no interior da semente, demonstrando a redução do cloreto de 2,3,5 - trifeniltetrazólio pelas desidrogenases originando, assim, o trifenilformazano que tem a coloração vermelha.

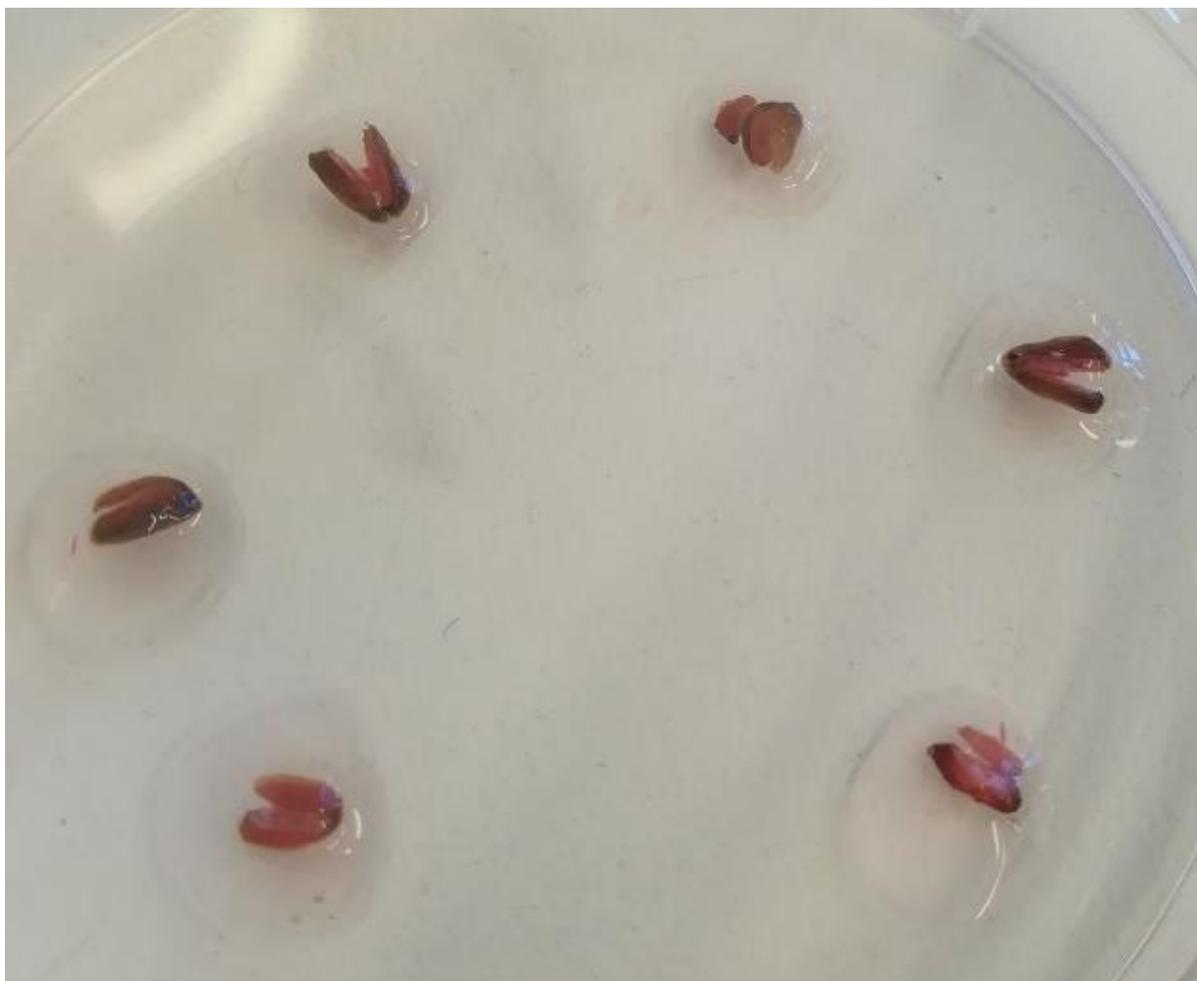


Figura 22. 6 sementes de medronheiro do lote Pen. 5 cortadas ao meio e com coloração vermelha.

Nos Quadros X e XI apresentam-se os valores médios dos ensaios de viabilidade por tempo de amolecimento da polpa e por local.

Quadro X. Valores médios dos ensaios de viabilidade por tempo de amolecimento.

Tempo de amolecimento da polpa (dias)	Viabilidade (%)
54	0 a
39	12 b
20	100 c

Letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes segundo teste não paramétrico de comparação de Kruskal-Wallis para $\alpha = 0.05$.

Quadro XI. Valores médios dos ensaios de viabilidade por local.

Local	Viabilidade (%)
S.M.	0 c
Mon.	7 bc
Cald.	24 b
Bar.	4 bc
Pen.	100 a

Letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes segundo teste não paramétrico de comparação de Kruskal-Wallis para $\alpha = 0.05$.

Como se pode verificar no Quadro X o tempo de amolecimento da polpa dos frutos afeta significativamente a viabilidade da semente. Na bibliografia referente ao medronheiro, é aconselhada a retirada das sementes do fruto o mais depressa possível, depois da colheita, devido a substâncias inibidoras existentes na polpa (Narbona *et al.*, 2003). O tempo de amolecimento seguido por García-Fayos *et al.* (2001), Demirsoy *et al.* (2010) e Martins (2012) foi igual ou inferior a 24 horas. Por opções tomadas, no âmbito do projeto, os frutos foram deixados em água desde o momento da colheita até à minha entrada no projeto, dia 7 de janeiro de 2019.

Com esta opção tomada conseguiu-se aferir que, pelo menos para sementes provenientes de Penamacor, as sementes de medronheiro podem ficar até 20 dias dentro de água, em contacto com a polpa e em condições de fermentação sem afetar a sua viabilidade. Isto representa um grande aumento no tempo de amolecimento da polpa do fruto em relação à bibliografia consultada. Concluiu-se, ainda, que 39 dias de amolecimento da polpa afetam significativamente a viabilidade das sementes, reduzindo para uma média de 12%, para as amostras consideradas. Os três locais sujeitos a 39 dias de amolecimento apresentaram diferenças não significativas nas médias da viabilidade. 54 dias de amolecimento da polpa não permitem a manutenção da viabilidade das sementes de medronheiro.

A ocorrência de fermentação, que ocorre em condições de anaerobiose, não permitiu que os tecidos vivos da semente realizem as trocas gasosas necessárias à manutenção da sua viabilidade e as substâncias inibidoras da germinação descritas, por Narbona *et al.* (2003) e Hammami *et al.* (2005), são, provavelmente, as causas da perda de viabilidade das sementes.

4.1.4. Ensaio de estratificação

No Quadro XII apresentam-se os valores médios das percentagens de germinação após a estratificação, por local e por tratamento.

Quadro XII. Valores médios das percentagens de germinação consoante tempos de estratificação e tratamentos diferentes, por local. Legenda dos tratamentos: C – controlo, germinação das sementes sem qualquer tratamento; 1 – 15 dias de estratificação; 2 – 29 dias de estratificação; 3 – 46 dias de estratificação; 4 – 60 dias de estratificação; 5 – 75 dias de estratificação; 6 – 90 dias de estratificação; 7 – 31 dias de estratificação e 2000 mg L⁻¹ de GA₃ durante 24h; 8 - 31 dias de estratificação, 2000 mg L⁻¹ de GA₃ durante 24h e 30 minutos de H₂SO₄.

Local	Tratamento	Valor médio (%)
S.M.	C	0 d
S.M.	1	0 d
S.M.	2	0 d
S.M.	3	0 d
S.M.	4	0 d
S.M.	5	0 d
S.M.	6	0 d
S.M.	7	0 d
S.M.	8	0 d
Mon.	C	1,1 d
Mon.	1	0 d
Mon.	2	0 d
Mon.	3	0 d
Mon.	4	1,1 d
Mon.	5	0 d
Mon.	6	1,1 d
Mon.	7	5,0 cd
Mon.	8	0 d
Cald.	C	23,8 cd
Cald.	1	24,4 cd
Cald.	2	18,9 cd
Cald.	3	14,4 cd
Cald.	4	21,1 cd
Cald.	5	19,4 cd
Cald.	6	24,4 cd
Cald.	7	4,3 d
Cald.	8	0 d
Bar.	C	2,3 d
Bar.	1	5,6 d
Bar.	2	4,4 d
Bar.	3	5,6 d
Bar.	4	4,4 d
Bar.	5	4,4 d
Bar.	6	6,7 d
Bar.	7	1,1 d
Bar.	8	0 d
Pen.	C	64,4 b
Pen.	1	82,3 ab
Pen.	2	91,1 ab
Pen.	3	91,1 a
Pen.	4	93,2 a
Pen.	5	90,7 ab
Pen.	6	96,7 a
Pen.	7	56,0 bc
Pen.	8	0 d

Letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes segundo teste de comparação múltipla de Tukey a dois fatores para $\alpha = 0,05$.

Os ensaios de estratificação desenvolvidos demonstraram que a proveniência das sementes tem influência significativa na taxa de germinação das sementes, de acordo com a bibliografia (Demirsoy *et al.*, 2010; Pipinis *et al.*, 2017). Estes resultados foram obtidos antes da realização dos ensaios de viabilidade. A razão pela qual não se iniciou o estudo das sementes pelos testes de viabilidade para cada indivíduo prendeu-se com a necessidade de utilização do menor número de sementes possível, de modo a não comprometer o projeto em que este trabalho se encontra inserido. Após a obtenção destes resultados tornou-se imperativo a realização de mais testes com o objetivo de averiguar se certos locais não respondiam a qualquer tipo de estratificação e se o problema se prenderia com a viabilidade das sementes, com a não quebra da dormência ou com a falta de escarificação, daí a realização de ensaios de viabilidade com o TTC e tanto com GA₃ como com GA₃ + ácido.

Destaque para a Figura 28 que demonstra a ocorrência de germinação das sementes em caixas de Petri.

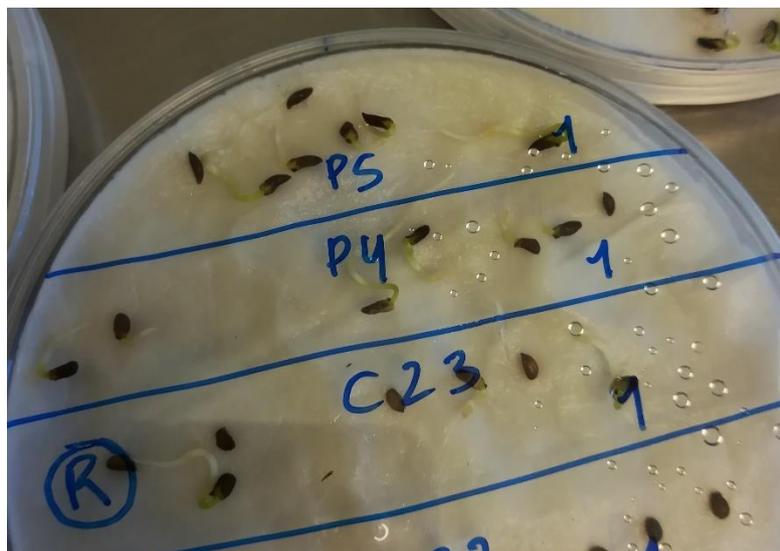


Figura 23. Detalhe da germinação das sementes em caixas de Petri.

Atendendo à proveniência Pen. é importante ressaltar que o valor de germinação para o controlo é mais alto que os resultados da maioria dos autores (Quadro II), entre 0 e 8% de germinação (Tilki *et al.*, 2004; Simiris *et al.*, 2006; Demirsoy *et al.*, 2010; Ertekin e Kirdar, 2010; Martins, 2012; Pipinis *et al.*, 2017). Os únicos autores que apresentaram valores próximos dos observados neste estudo foram Ricardo e Veloso (1987) e Narbona *et al.* (2003) com 40 e 40,5% de percentagem de germinação sem estratificação, respetivamente.

Estes resultados obtidos levantaram a hipótese da justificação para esse acontecimento se prender com a data de colheita dos frutos dos autores acima citados. Tilki *et al.* (2004), Demirsoy *et al.* (2010) e Ertekin e Kirdar (2010) realizaram a colheita dos frutos durante o

outono, em novembro, mas, por outro lado, Martins (2012) realizou a colheita dos frutos em janeiro e os seus resultados para o controlo situam-se nos 5%, na mesma ordem de grandezas que os autores acima citados. Fica, assim, a hipótese da data de colheita influenciar a percentagem de germinação de sementes não estratificadas, invalidada.

Posteriormente hipotetizou-se para os resultados de Martins (2012) se o local de colheita (Chaves) apresentava menos frio que Penamacor e por essa hipótese as sementes de Penamacor encontrarem-se pré-estratificadas. A hipótese foi invalidada ao verificar, no portal do clima (IPMA, 2015), que Chaves apresenta 40 dias anuais com temperaturas inferiores a 7 °C em comparação com Penamacor que apenas apresenta 28 dias.

Caldeirão também apresentou uma grande taxa de germinação sem estratificação, apesar de não ser significativo, mas se tivermos em consideração que a viabilidade dessa proveniência se fixou em média nos 24% e que o controlo germinou a uma taxa de 23,8% fica evidenciado que, neste local, as sementes viáveis germinam sem qualquer estratificação.

Por fim, analisaram-se os locais de proveniência de sementes dos dois autores que registaram taxas de germinação próximas das observadas neste trabalho (Ricardo e Veloso, 1987; Narbona *et al.*, 2003). O primeiro estudo foi conduzido com sementes provenientes da zona de Monchique e o segundo da zona da Serra Grazelema, situada entre Málaga e Cádiz, Espanha. Levantou-se a possibilidade da zona centro e sul de Portugal, juntamente com o sul de Espanha apresentarem uma menor necessidade de estratificação, podendo esta adaptação vir das condições, na época da queda dos frutos para o sul de Portugal e Espanha, não apresentarem períodos de frio, gelo ou neve significativos que provoquem a morte de um grande número de plântulas. Desta forma, sementes que germinem nestas localizações poderiam iniciar o seu desenvolvimento a partir do inverno, com especial incidência para a parte radicular, constituindo assim uma vantagem competitiva contra plantas que apenas germinem na primavera, e que, por esta razão, tenham menos tempo para se desenvolverem até à chegada do período de estio, aumentando, assim, a probabilidade de morte por falta de água.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram a hipótese levantada anteriormente. Os locais a sul deste estudo não apresentam diferenças significativas entre o tratamento controlo e os tratamentos seguintes e o local mais a norte apresentam diferenças significativas entre o controlo e os tratamentos seguintes. Apesar de Penamacor apresentar diferenças significativas entre os tratamentos, é de salientar que apresenta uma taxa elevada de germinação para o tratamento controlo.

Relativamente aos tratamentos, é seguro dizer que as sementes de medronheiro não se mantêm viáveis após um tratamento de 30 minutos com ácido sulfúrico (95-97%), por outro lado Narbona (2003) concluiu que se o tratamento for realizado durante apenas 5 minutos que a germinação não é afetada significativamente. Este tratamento foi realizado na mesma data

de realização dos ensaios de viabilidade como resposta aos resultados obtidos na estratificação sem GA₃ para a maioria das proveniências de sementes. Não se sabendo na altura o problema que as sementes apresentavam hipotetizou-se que sementes de certas localizações de Portugal necessitassem de um tratamento de escarificação que outras localizações, testadas pelos autores citados acima, não apresentaram.

Da proveniência Pen. pode-se concluir que apenas a partir de 46 dias de estratificação há um aumento significativo da taxa de germinação das sementes, obtendo uma taxa de 91,1%. Este valor está em linha com Martins (2012) e Pipinis *et al.* (2017). Em relação ao tratamento 7, que para além da estratificação incluiu um tratamento com GA₃, permitiu na proveniência Mon. atingir o seu valor mais alto. Para as restantes proveniências em que ocorreu germinação, o tratamento com GA₃ obteve resultados inferiores ao controlo, contrariando assim a bibliografia consultada. Esta interação negativa entre os 2000 mg L⁻¹ de GA₃ e algumas proveniências pode evidenciar um excesso de concentração de GA₃ que pode afetar certas localizações. Simiris *et al.* (2006) obtiveram resultados superiores de taxas de germinação para 2000 mg L⁻¹ quando comparado com os 3000 mg L⁻¹ com estratificação de 90 dias. Para os locais estudados essa diminuição da taxa de germinação pelo aumento da concentração de GA₃ pode acontecer a concentrações menores.

Para além do local de proveniência das sementes, foi realizado uma análise de variância com dois fatores (ANOVA) (lote x tratamento) de modo a perceber se dentro de cada local havia variabilidade. Para um nível de significância de 0,05, o lote, ou seja, o indivíduo que originou as sementes em estudo, influenciou significativamente a taxa de germinação.

Como é possível observar pela Figura 29 existe um elevado número de sementes que germinaram a 4 °C e que apodreceram dentro do frigorífico devido ao excesso de tempo de estratificação que estiveram sujeitos. Apenas nos indivíduos Pen. foi possível observar esta reação por parte das sementes, sendo que o Pen. 15 (Figura 29) apresentou 27% de rebentos podres no tratamento de 75 dias de estratificação e 43% no tratamento de 90 dias de frio.

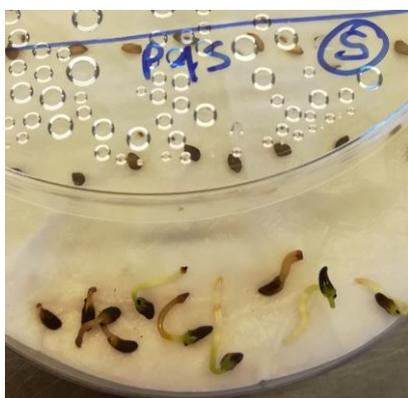


Figura 24. Detalhe de sementes que germinaram no frigorífico e que apodreceram.

4.1.4.1. Germinação de sementes que flutuam

Para além do ensaio descrito acima foram postas a germinar 114 sementes que flutuaram, estas foram retiradas dos ensaios de germinação no momento posterior a desinfecção das sementes e colocadas a estratificar como as outras durante 90 dias. Das 114 sementes que flutuaram, nenhuma germinou. Estas sementes englobam todos os lotes de semente usados nos ensaios de germinação e, por essa razão, seria de esperar, caso as sementes de medronheiro que flutuam germinem, que, pelo menos, algumas sementes germinassem, das proveniências Pen. e Mon.

Estes resultados vêm comprovar a afirmação de Narbona *et al.* (2003) de que sementes de medronheiro que flutuam não têm embrião e por isso não são viáveis.

4.2. Reserva *ex situ* no campo – banco de germoplasma

Nas Figuras 30 e 31 são apresentadas fotografias do crescimento das jovens plântulas dentro da estufa da empresa Greenclon, em duas datas diferentes.



Figura 25. Pen. 20 e Pen. 21 no dia 12 de abril de 2019.



Figura 26. Pen. 1 e Pen. 2 no dia 13 de maio de 2019.

4.2.1. Taxa de mortalidade

Na Figura 32 é apresentada a evolução da taxa de mortalidade das plântulas por local.

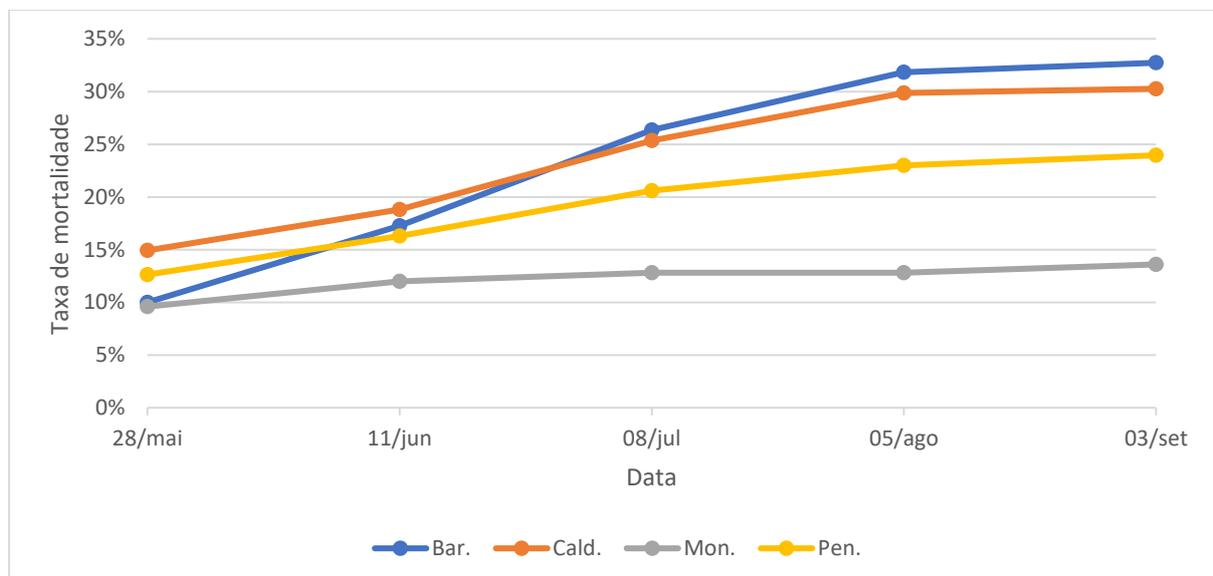


Figura 27. Taxa de mortalidade por local e por data.

Como é possível observar, Monchique é a proveniência que apresenta menor taxa de mortalidade, 14% no dia 3 de setembro de 2019, dentro do horizonte temporal estudado.

Seguiu-se Penamacor com 24%. Penamacor e Monchique voltam-se a destacar como bons locais de colheita de sementes para germinar em condições de viveiro. Monchique, por um lado, e Caldeirão e Barrocal, por outro, apresentam diferenças consideráveis na taxa de mortalidade das plântulas. Isto pode indicar, que o potencial para produção de medronho, definido no Quadro III, teve efeito na mortalidade das plântulas. Este potencial para produção engloba dois grandes fatores: fatores climáticos, neste caso, apesar de as localizações apresentarem climas similares, a influência do microclima da serra de Monchique pode ter um carácter importante; fatores genotípicos, que demonstram o elevado interesse em aprofundar este estudo.

4.2.2. Crescimento das plântulas

No Quadro XIII é apresentada a média de crescimento por local das plântulas.

Quadro XIII. Evolução do crescimento das plântulas, em cm, ao longo do tempo.

	28/mai	11/jun	24/jun	8/jul	23/jul	5/ago	19/ago
Local	Comprimento da plântula em centímetros						
Pen.	2,06 a	2,87 a	3,40 a	3,79 a	4,24 a	4,85 a	5,62 a
Mon.	1,78 b	2,72 a	3,06 ab	3,58 ab	3,95 ab	4,76 a	5,53 a
Cald.	1,78 b	2,63 a	3,05 b	3,47 b	3,88 b	4,55 a	5,25 a
Bar.	1,55 b	2,05 b	2,32 c	2,88 c	3,28 c	3,91 b	4,5 b

Letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes segundo teste de comparação múltipla de Tukey a dois fatores para $\alpha = 0,05$.

Como é possível verificar no Quadro XIII existem diferenças significativas entre as proveniências das sementes que deram origem às plântulas estudadas. Realizou-se, ainda, um teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha = 0,05$ e conclui-se que existem diferenças significativas no crescimento das plântulas dentro do mesmo local sendo os que têm maior crescimento as plântulas do indivíduo Pen. 8, tendo a média das plântulas deste indivíduo ficado 7,08 cm de altura no dia 19 de agosto. No final do período de monitorização as diferenças entre Pen., Mon. e Cald. não foram significativas, por outro lado, as plântulas provenientes do Barrocal apresentaram sempre valores significativamente inferiores aos outros três locais.

Na Figura 33 é apresentado um conjunto de fotografias de diferentes datas no âmbito da monitorização das plântulas em viveiro.

No Quadro XIV apresentam-se as precipitações médias anuais, nos locais estudados, de acordo com os dados disponibilizados pelo portal do clima do IPMA (Normais climatológicas: Histórico simulado – 1971-2000, Média temporal: Anual, Estatística: Média 30 anos, Modelo Regional: Ensemble, Modelo Global: Ensemble).



Figura 28. Monitorização dos crescimentos das plântulas.

Quadro XIV. Precipitação por local em estudo (IPMA, 2015).

Local	Precipitação (mm)
Penamacor	989,5
Monchique	944,4
Caldeirão	758,5
Barrocal	705,3

Relativamente às diferenças no crescimento observadas e com base no Quadro XIV é possível verificar que o crescimento das plântulas acompanhou a mesma ordem das precipitações. Locais de maior precipitação obtiveram plântulas com maiores crescimentos em altura, estando os resultados de acordo com Vasques *et al.* (2013), que concluíram que locais de proveniência com maior precipitação apresentam um maior potencial de crescimento, em condições de conforto hídrico.

Este comportamento poderá dever-se a um melhor estado fisiológico das sementes no fruto resultante de um maior conforto hídrico durante a fase de acumulação de reservas na semente para os locais mais chuvosos.

Na Figura 34 é possível observar diferenças entre os crescimentos das plântulas com o avançar dos dias. Para a fotografia do dia 05 de agosto de 2019 é possível observar que a plântula apresenta as manchas foliares descritas por Navarro-Cerrillo *et al.* (2013).



Figura 29. Detalhe da altura de diferentes plântulas em dias diferentes.

4.3. Análise aos objetivos do projeto

Como referido no material e métodos, para este projeto são necessárias 10 plantas de cada lote de sementes para a instalação do banco de germoplasma. Na Figura 35 é apresentada a proporção do número de plantas necessárias para o projeto em curso em função do número de plantas existentes no dia 3 de setembro de 2019.

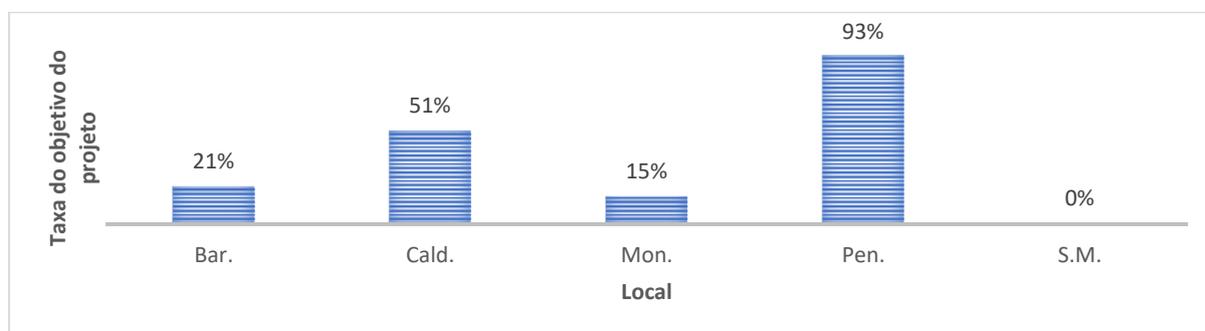


Figura 30. Proporção do número de plantas necessárias para o projeto em curso no dia 03 de setembro de 2019.

Como ficou demonstrado em cima, o tempo de amolecimento da polpa dos frutos influenciou imensamente a viabilidade das sementes e isso teve como consequência a diminuição do número de plantas existentes no viveiro e a instalar como banco de germoplasma. Como podemos ver na Figura 35 os indivíduos de Penamacor apresentaram uma taxa do cumprimento dos objetivos do projeto de 93%. Os indivíduos de São Mamede foram os mais penalizados com uma taxa de cumprimento dos objetivos de aproximadamente 0%. À data da última contagem do número de plantas apenas existia uma plântula desta localização.

5. Conclusão e perspectivas

A elaboração desta dissertação visou contribuir para um aumento da diversidade de genótipos a utilizar num futuro programa de melhoramento da espécie *Arbutus unedo* e a sua conservação.

O local de proveniência e a exposição preferencial a que a planta que originou as sementes está sujeita influenciam significativamente o número de sementes por quilograma.

O tempo de amolecimento da polpa afeta significativamente a viabilidade da semente e nunca deve ser superior a 20 dias, com o risco de se perder a totalidade da viabilidade das sementes. Isto deve-se, possivelmente, à ocorrência de fermentação, que ocorre em condições de anaerobiose, e que por esse motivo não permitiu que os tecidos vivos da semente realizassem as trocas gasosas necessárias à manutenção da sua viabilidade.

Alguns locais de proveniência de sementes de medronheiro em Portugal, Penamacor e Caldeirão, apresentam elevadas taxas de germinação sem qualquer tipo de estratificação efetuada. Dentro do mesmo local de prospeção existem diferenças significativas nas suas taxas de germinação.

Tendo em conta os resultados deste estudo pode-se concluir que tanto Penamacor, como Caldeirão apresentam altas taxas de germinação sem o gasto energético da estratificação. A escolha de estes locais por parte dos produtores de plantas ornamentais é uma boa aposta e acarreta custos baixos a nível energético. Para além da estratificação, Monchique, seguido de Penamacor, apresentam as menores taxas de mortalidade em condições de viveiro quando comparados com o Barrocal e Caldeirão. Sendo estas duas localizações as que permitem obter o maior número de plantas por plântulas transplantada após germinação.

Estudos que validem e que delimitem quais os locais que apresentam altas taxas de germinação sem estratificação são recomendados.

Os resultados deste trabalho apontam, ainda, que os locais Penamacor e Monchique apresentaram o maior potencial de crescimento existindo diferenças significativas entre Penamacor e Barrocal. Dos quatro locais analisados Penamacor é o que apresenta maior precipitação média anual (989,5 mm) e Barrocal a menor (705,3 mm). Os resultados obtidos estão de acordo com os obtidos por Vasques *et al.* (2013). Na perspetiva do produtor de plantas a escolha da proveniência das sementes deve incidir sobre os locais que apresentam maior potencial de crescimento, pois são estes que apresentam maiores probabilidades de atingirem os 15 cm de altura mínimos, necessários para a sua plantação (Navarro-Cerrillo *et al.*, 2013), com o menor gasto de água, aquecimento (no caso da estufa ser aquecida) e tempo de ocupação na estufa.

Relativamente ao projeto em que esta dissertação se encontra inserida, é aconselhada a repetição da prospeção na Serra de São Mamede, em que a proporção de cumprimento dos

objetivos se encontra a 0%, na Serra de Monchique, com 15% dos objetivos cumpridos e na Serra do Caldeirão, com 51% dos objetivos cumpridos, desta vez com um período de amolecimento preferencialmente inferior a 24 horas como aconselham, García-Fayos *et al.* (2001), Demirsoy *et al.* (2010) e Martins (2012), ou obrigatoriamente inferior a 20 dias, que este trabalho comprovou que para a localização de Penamacor a viabilidade das sementes não é afetada.

A estratificação deverá, preferencialmente, manter-se nos 2 meses, visto que apenas a partir do tratamento de 46 dias de estratificação se obteve taxas de germinação significativamente superiores à das sementes não estratificadas para a localização Penamacor. A estratificação deverá ser inferior a 60 dias, pois a partir deste tratamento, aos 75 dias, ocorreu a germinação das sementes a 4 °C levando ao seu apodrecimento.

6. Referências bibliográficas

- Alía, R., Alba, N., Agúndez, D. e Iglesias, S. (coord.) (2005). *Manual para la comercialización y producción de semillas y plantas forestales. Materiales de base y de reproducción. Serie Forestal*. Madrid: DGB. 384 p.
- Alves, A.A.M., (1988). *Técnicas de Produção Florestal. Fundamentos, tipificação e métodos*. (2.ª edição). Lisboa: Instituto Nacional de Investigação Científica. 331 p.
- Anastácio, J.R. (2014). *Contributo para o estudo do medronheiro (Arbutus unedo L.): caracterização morfológica de clones e fisiológica pós-colheita do fruto*. Dissertação para obtenção do Grau Mestre em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Araújo, P.V., Carapeto, A., Porto, M., Clamote, F., Pereira, A.J., Holyoak, D.T., Almeida, J.D., Lourenço, J., *et al.* (2019). *Arbutus unedo* L. - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wArbutus+unedo>. Consulta realizada em 27/12/2019.
- Baskin, C.C. e Baskin, J.M (1989). Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology. Em Leek, M. A., Parker, V. C. e Simpson, R. L. . *Ecology of soil seed banks*. San Diego: Academic Press, Elsevier. 53-66.
- Bertsouklis, K.F. e Papafotiou, M. (2013). Seed germination of *Arbutus unedo*, *A. andrachne* and their natural hybrid *A. andrachnoides* in relation to temperature and period of storage. *HortScience*. 48: 347-351.
- Beyhan, N. e Serdar, U. (2008). Assessment of pollen viability and germinability in some European chestnut genotypes (*Castanea sativa* L.). *HortScience*. 35: 171-178.
- Bingre P., Aguiar C., Espírito-Santo D., Arsénio P. e Monteiro-Henriques T. (2007). Guia de árvores e arbustos de Portugal Continental. Lisboa: Jornal Público, Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Liga para a Proteção da Natureza. Em *Árvores e Florestas de Portugal*. (Edição IX). ISBN 978-989-619-106-1.
- Borza, J.K., Westerman, P.R. e Liebman, M. (2007). Comparing estimates of seed viability in three foxtail (*Setaria*) species using the imbibed seed crush test with and without additional tetrazolium testing. *Weed Technology*. 21:518-522.
- Brotero, F. A. (1804). *Flora lusitânica, seu plantarum, quae in lusitania vel sponte crescunt, vel frequentius coluntur, ex florum praesertim sexubus systematice distributarum, synopsis*. Olissipone (Lisboa): Regia. 607 p.
- CMP. (sd). *Caracterização do Concelho de Penamacor*. [online] Disponível na Internet via WWW.URL: <http://www.cm-penamacor.pt/cmp/index.php/conhecer/caraterizacao>. Arquivo capturado em 01 de setembro de 2019.

- Carvalho, J. (2008). Ocupação com medronheiro com base nos dados campo do IFN 2005 por concelho: com interpolação em ambiente SIG concelhos CAOP. Divisão de Informação Florestal.
- Catalán, G. (1991). *Semillas de árboles y arbustos forestales*. (4.^a edição). Madrid: ICONA, D.L. 392 p.
- Caudullo, G., Welk, E. e San-Miguel-Ayanz, J., (2017). Chorological maps for the main European woody species. Data in Brief 12, 662-666. DOI: doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.007.
- Celikel, G., Demirsoy, L. e Demirsoy, H. (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*. 118: 115-119.
- Chiarucci, A., Pacini, E. e Loppi, S. (1993). Influence of temperature and rainfall on fruit and seed production of *Arbutus unedo* L. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 111: 71-82.
- CMOA. (2012). A Espécie da Estação: *Arbutus unedo* L. Medronheiro. Divisão Municipal de Ambiente e Conservação da Natureza - Município de Oliveira de Azeméis. 3.
- Correia, A.V., (1998). *Monografias de Espécies Florestais a Utilizar na Arborização das Zonas a Sul do Tejo*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Florestal. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Correia, P. e Varela, J., (1996). Os sistemas da alfarrobeira e do medronheiro no Algarve. *Revista Florestal*. 9 (4): 28-35.
- Coutinho, A.X.P. (1939). *Flora de Portugal (plantas vasculares) disposta em chaves dicotómicas*. (2.^a edição dirigida por Palhinha, R.T.). Lisboa: Bertrand. 933 p.
- Demirsoy, L., Demirsoy, H., Celikel, G., Macit, I. e Ersoy, B. (2010). Seed treatment with GA3 or stratification enhances emergence of some strawberry tree genotypes – short communication. *Horticultural Science*. 37 (1): 34-37.
- Dias, V.L.A. (2014). *Estruturas secretoras em medronheiro (*Arbutus unedo* L.): caracterização morfológica, estrutural e histoquímica e avaliação da atividade proteásica da secreção*. Dissertação para obtenção do Grau Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências e Tecnologias. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Dinis, D.F.P. (2015). *Medronheiro e Fungos Micorrízicos: parceria para o futuro*. Dissertação para obtenção do Grau Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências e Tecnologias. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Elwes, H.J. e Henry, A. (1906). *The Trees of Great Britain and Ireland*. Edinburgh: Privately printed. 2596 p.
- Ertekin, M. e Kirdar, E. (2010). Breaking seed dormancy of strawberry tree (*Arbutus unedo*). *International Journal of Agriculture & Biology*. 12 (1): 57-60.
- ESAC. (2019). Relatório de progresso relativo ao 1º ano de atividade do Programa de Conservação e Melhoramento Genético do medronheiro, a que corresponde o código nº PDR 2020-784-042742.

- Figueiredo, S.R.F.C.F. (2017). *Processo de extração de polpa de medronho coadjuvado pela ação de enzimas carboidrases*. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar. Escola Superior Agrária de Coimbra. Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra.
- Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. [online] Disponível na Internet via WWW.URL: <https://flora-on.pt/?q=Arbutus>. Consulta efetuada em 11-9-2019.
- Font Quer, P. (1996). *Plantas medicinales. El dioscórides renovado*. Barcelona: Labor. 1096 p.
- Franco, J.A., (1943). *Dendrologia Florestal*. Lisboa: Imprensa Lucas. 244 p.
- Franco, J.A., (1984). *Nova flora de Portugal. Continente e Acores. 2. Clethraceae – Compositae, Vol II*. Lisboa. 686 p.
- Franco, J. (2014). O medronheiro – da planta ao fruto, as práticas culturais (1^{os} resultados).
- Freitas, G. (2018, outubro). *Execução do PDR2020*. Comunicação oral apresentada no evento Palestra PDR2020, da Associação Internacional de Estudantes de Agricultura e Ciências Relacionadas, Lisboa.
- García-Fayos, P. et al., (2001). *Bases ecológicas para la recolección, almacenamiento y germinación de semillas de especies de uso forestal de la Comunidad Valenciana*. Valencia: Banc de Llavors Forestals, Conselleria de Medi Ambient, Generalitat Valenciana. ISBN 84-482-2934-7. 82 p.
- Godinho-Ferreira, P., Azevedo, A. e Rego, F. (2005). *Carta da tipologia florestal de Portugal continental*. Silva Lusitana. 13(1): 1-34.
- Godinho, B. (2009). *Avaliação da qualidade ambiental da envolvente das Minas da Panasqueira. Vertente solo-água-Arbutus unedo. Um caso de estudo com orientação ambiental e social*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente - Tecnologias Ambientais. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Goes, E., (1991). *A floresta portuguesa. Sua importância e descrição das espécies de maior interesse*. Lisboa: Portucel. 263 p.
- Gomes, C.J.P. e Ferreira, R.J.P. (2005). *Flora e Vegetação do Barrocal Algarvio (Tavira - Portimão)*. Faro: Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Algarve. ISBN 972-95734-9-2. 354 p.
- Gomes, C.M.L. (2006). *Validação do método de análises de espectrofotometria de absorção atômica/emissão de chama para determinação de minerais na fermentação de Medronheiro (Arbutus unedo L.)*. Dissertação para obtenção do Grau Mestre em Qualidade em Análises, especialização em Análises de Águas. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade do Algarve, Faro.

- Gomes, F. e Canhoto, J.M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 45: 72-82.
- Gomes, F., Lopes, M.L., Santos, T. e Canhoto, J.M. (2009). Micropropagation of selected trees of *Arbutus unedo* L. through auxillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. Em: Hanke, M.V. *et al.* Proc. 1st IS on Biotechnol. of Fruit Species. *Acta Horticulturae*. 839.
- Gomes, F., Simões, M., Lopes, M.L. e Canhoto, J.M. (2010). Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). *New Biotechnology*. 27: 6.
- Gomes, M.F.F.N. (2011). *Strategies for the improvement of Arbutus unedo L. (strawberry tree): in vitro propagation, mycorrhization and diversity analysis*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Biologia. Faculdade de Ciências e Tecnologias de Coimbra – Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Gomes, F., Machado, H., Portugal, E.S.M.A. e Canhoto, J. (2013). Mycorrhizal synthesis between *Pisolithus arhizus* and adult clones of *Arbutus unedo* in vitro and in nursery. *Journal of Forestry Research*. 24(4): 659-670.
- Gomes, F., Franco, J., Pato, R., Botelho, G., Rodrigues, I., Figueiredo, P. e Casau, F. (2017). Medronheiro: Produção de Medronho para Destilar. Em Coelho *et al.* *Medronheiro: Caderno Técnico*. Oeiras: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. 76 p.
- Gomes F. *et al.*, (2018). *Medronheiro - Manual de boas práticas para a cultura*. (2.^a edição). Coimbra: REN - Redes Energéticas Nacionais, IPC - Instituto Politécnico de Coimbra, ESAC - Escola Superior Agrária de Coimbra, CERNAS - Centro de Estudos e Recursos Naturais Ambiente e Sociedade, CPM - Cooperativa Portuguesa de Medronho crl. ISBN 978-972-99205-6-1. 110 p.
- Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Miguel, M.G.C. e Antunes, M.D.C. (2013a). The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. *Scientia Horticulturae*. 159: 96-102.
- Guerreiro, A., Gago, C., Miguel, G., Faleiro, M.L., Panagopoulos, T. e Antunes, M.D. (2013b). Potential of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo* L.) for fresh consumption and its behavior through storage. Em: Artés-Hernández, F. *et al.* Proc. VIII International Postharvest Symposium: Enhancing Supply Chain and Consumer Benefits – Ethical and Technological Issues. *Acta Horticulturae*. 1194: 941-946.
- Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Faleiro, M.L., Miguel, M.G.C. e Antunes, M.D.C. (2015). The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. *Postharvest Biology and Technology*. 100 (2015) 226-233.
- Guerreiro, A.C. e Antunes, D. (2018). Boas práticas pós-colheita e proposta de norma de comercialização para o medronho. *Voz do Campo*. 4: 4-5.

- Hammami, I., Jellali, M., Ksontini, M. e Rejeb, M.N. (2005). Propagation of the strawberry tree through seed (*Arbutus unedo*). *International Journal of Agriculture & Biology*. 1560-8530: 457-459.
- Hileman, L.C., Vasey, M.C. e Parker, V.T. (2001). Phylogeny and biogeography of the *arbutoideae* (*ericaceae*): implications for the madrean-tethyan hypothesis. *Systematic Botany*. 26(1): 131-143.
- ICNF. (sd). *Geologia, hidrologia e clima do Parque Natural da Serra de São Mamede*. [online] Disponível na Internet via WWW.URL: <http://www2.icnf.pt/portal/ap/p-nat/pnssm/geo>. Arquivo capturado em 01 de setembro de 2019.
- IPCC. (2013). Climate change 2013: the physical science basis. In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V. e Midgley, P.M., eds. *Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge / New York: Cambridge University Press. 1535 p.
- IPMA. (2015). *PORTAL DO CLIMA*. Programa ADAPT Alterações Climáticas em Portugal. [online] Disponível na Internet via WWW.URL: <http://portaldoclima.pt/pt/>. Arquivo capturado em 01 de setembro de 2019.
- ISTA, International Seed Testing Association. (1985). International rules for seed testing 1985. *Seed Science and Technology*. 13:300-520.
- Karam, N.S. e Al-Salem M.M. (2001). Breaking dormancy in *Arbutus andrachne* L. seeds by stratification and gibberellic acid. *Seed Science and Technology*. 29: 51-56.
- Lagarto, V., Gomes, F., Franco, J. e Oliveira, F. (2013). Estudo de mercado sobre as potencialidades do medronho na região centro. *Agrotec*. 6: 78-81.
- Lopes, L., Sá, O., Pereira, J.A. e Baptista, P. (2012). Genetic diversity of portuguese *Arbutus unedo* L. populations using leaf traits and molecular markers: an approach for conservation purposes. *Scientia Horticulturae*. 142: 57-67.
- Martins, J.F.S. (2012). *Estudos de cultura in vitro em medronheiro (Arbutus unedo L.) aplicados ao seu melhoramento*. Dissertação para obtenção do Grau Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências - Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Mesléard, F. e Lepart, J. (1991). Germination and seedling dynamics of *Arbutus unedo* and *Erica arborea* on Corsica. *Journal of Vegetation Science*. 2: 155-164.
- Narbona, E., Arista, M. e Ortiz, P.L. (2003). Germinación de las semillas del madroño (*Arbutus unedo* L., Ericaceae). *Acta Botanica Malacitana*. 28: 73-78.
- Navarro Cerrillo, R.M. e Gálvez Ramirez C., (2001). *Manual para la Identificación y Reproducción de Semillas de especies vegetales autóctonas de Andalucía. Vol I*. Córdoba: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. ISBN 84-95785-02-1. 420 p.

- Navarro Cerrillo, R.M., Plaza Arregui, L., Sánchez Lancha, A., Arroyo Sauces, M., Marchal Gallardo, F. e Lara Gómez, M.A. (2013). *Arbutus unedo* L. Em: *Pemán, J., Producción y manejo de semillas y plantas forestales*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. ISBN 978-84-8014-837-5. 1018 p.
- Navarro García, A., Bañón Árias, S.P., Morte, A. e Sánchez-Blanco, M.J. (2011). Effects of nursery preconditioning through mycorrhizal inoculation and drought in *Arbutus unedo* L. plants. *Mycorrhiza*. 21: 53-64.
- Oliveira, I., Baptista, P., Bento, A. e Pereira, J.A. (2011). *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health (Review). *Journal of Food and Nutrition Research*. 50: 73-85.
- Papafotiou, M., Bertsoyklis, K.F. e Trigka, M. (2013). Micropropagation of *Arbutus unedo*, *A. andrachne*, and their natural hybrid, *A. x andrachnoides* from seedling explants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 88 (6) 768-775.
- Passarinho, J.A., Sousa, R.M. e Coelho, I.S. (2017). A produção de medronho para fruto não destilado. Em Coelho *et al. Medronheiro: Caderno Técnico*. Oeiras: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. 76 p.
- Pedro, J.P. (1994). *Carta da Distribuição de Figueira e Medronheiro – Notícia Explicativa*. Lisboa: Direcção-Geral do Ambiente, Direcção de Serviços de Informação e Acreditação. ISBN 972-9392-37-4.
- Piotto B. e Di Noi A. (2001). *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. Roma: ANPA. ISBN 88-448-0271-6. 212 p.
- Pipinis, E., Stampoulidis, A., Millios, E., Kitikidou, K. e Radoglou, K. (2017). Effects of cold stratification and GA₃ on germination of *Arbutus unedo* seeds of three provenances. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*. 14(1): 318-323.
- Polunin, O. e Huxley, A. (1967). *Flowers of the Mediterranean*. London: Chatto e Windus. 272 p.
- Rau, P., 2008. Cultura do medronheiro. Método biológico. *Jardins*. 6 (68): 61-62.
- Raven, P.H., Evert, R. e Eichhorn, S. (2014). *Biologia Vegetal*. (8.^a edição). Brasil: Guanabara Koogan 738 p.
- Resolução do Conselho de Ministros n.º 115-A/2008 de 21 de Julho de 2008. *Diário da República, 1.ª série - N.º 139 - 21 de Julho de 2008*. ANEXO II - Fichas de Sítios da Lista Nacional (Sítios) e Zonas de Protecção Especial (ZPE), b) e c) - Fichas de ZPE – Caldeirão e Monchique. Lisboa.
- Ribeiro, D., Ribeiro, H. e Louro, V. (2001). *Produção em viveiros florestais*. Lisboa: DGDR. 149 p. ISBN 972-8693-05-2. 149 p.
- Ribeiro, M.M., Piotti, A., Ricardo, A., Gaspar, D., Costa, R., Parducci, L. e Vendramin, G.G. (2017). Genetic diversity and divergence at the *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) westernmost distribution limit. *PLOS ONE*. 12(4): e0175239.

- Ricardo, C.P.P. e Veloso, M.M. (1987). Features of seed germination in *Arbutus unedo* L. Em Tenhunen, J.D., Catarino, F.M., Lange, O.L. e Oechel, W.C., eds. Plant response to stress. Functional analysis in Mediterranean ecosystems. NATO ASI Series, Series G: *Ecological Sciences*, Vol. 15: 565-572.
- Ruiz de la Torre J., (2006). *Flora Mayor*. Madrid: Organismo Autónomo Parques Nacionales, Dirección General para la Biodiversidad. 1259-1262.
- Santiso, X., López, L., Gilbert, K.J., Barreiro, R., Whitlock, M.C. e Retuerto, R. (2015). Patterns of genetic variation within and among populations in *Arbutus unedo* and its relation with selection and evolvability. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 17: 185-192.
- Santos, C., Franco, J. e Botelho, G. (2013). Contributo para a avaliação da maturação do medronho na sua pós-colheita. *Agrotec*. 9: 28-31.
- Sawma, J. T. e C. L. Mohler. (2002). Evaluating seed viability by an unimbibed seed crush test in comparison with the tetrazolium test. *Weed Technology*. 16: 781-786.
- Sealy, J.R. (1949). *Arbutus unedo* L. *Journal of Ecology*. 37: 365-388.
- Sealy, J.R. e Webb, D.A. (1950). *Arbutus unedo* L. *Journal of Ecology*. 38: 223-236.
- Smiris, P., Pipinis, E., Aslanidou, M., Mavrokordopoulou, O., Milios, E. e Kouridakis, A. (2006). Germination study on *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*) and *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. (*Fabaceae*). *Journal of Biological Research*. 5: 85-91.
- Sulusoglu, M., Cavusoglu, A. e Erkal, S. (2011). *Arbutus unedo* L. (strawberry tree) selection in Turkey Samanlı mountain locations. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 3545-3551.
- Takrouni, M.M., Ali, I.B.H., Messaoued, C. e Boussaid, M. (2012). Genetic variability of Tunisian wild strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) populations interfered from isozyme markers. *Scientia Horticulturae*. 146: 92-98.
- Tapum, J.A.M. (1980). *Breves notas sobre a cultura do medronheiro na serra algarvia. Passado, presente e futuro*. Lagos: Instituto Geográfico e Cadastral, Direcção dos Serviços de Cadastro, Divisão dos Serviços de Avaliação e Conservação Cadastral. 41 f.
- Tilki, F. (2004). Improvement in seed germination of *Arbutus unedo* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7: 1640-1642.
- Torres, J.A., Valle, F., Pinto, C., García-Fuentes, A., Salazar, C. e Cano, E. (2002). *Arbutus unedo* L. communities in southern iberian peninsula mountains. *Plant Ecology*. 160: 207-223.
- Vasques, A., Chirino, E., Vilagrosa, A., Vallejo, V. R., e Keizer, J. J. (2013). The role of seed provenance in the early development of *Arbutus unedo* seedlings under contrasting watering conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 96: 11-19.

Anexo 1 – exemplo de ficha de colheita de espécies silvestres

N.º DE COLHEITA Pen 08

N.º ACESSO Pen 08

FICHA DE COLHEITA DE ESPECIES SILVESTRES

GÉNERO: Arbutus
 ESPÉCIE: Unedo
 SUBESPÉCIE: _____
 NOME DOS COLECTORES: Filomena Gomes, José Borralho, Neuzá Nazaré

HABITAT

- | | |
|-------------------------------------|------------------------|
| 1. Floresta | 8. Alpino |
| 2. Bosque | 9. Charneca/Gândora |
| 3. Mato | 10. Terreno cultivad |
| 4. Campo arbustivo | 11. Terrenos marginais |
| 5. Pastagem | 12. PUtano |
| 6. Floresta c/ pastagem sob coberto | 13. Outras _____ |
| 7. Deserto | |

NÚMERO DE COLHEITA: Pen 08
 INSTITUIÇÃO COLECTORA: Escola Superior Agraria de Coimbra
 DATA DACOLHEITA: 19 de Dezembro de 2018
 PAÍS DACOLHEITA: Portugal
 DISTRITO: Castelo Branco
 CONCELHO: Penamacor
 FREGUESIA: Salvador
 N.º DO LOCAL DE COLHEITA: 5
 LOCAL DACOLHEITA: Salvador
 Cidade/vila mais próxima: Salvador
 distancia(em Km): 3,19
 direção: _____

MICROAMBIENTE

- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| 1. Cume (montanha/serra) | 8. Pasto queimado |
| 2. Rochedo/Penhasco | 9. Bancos de areia |
| 3. Encosta da Montanha | 10. Margem (rio/mar) |
| 4. Base do Vale | 11. Áreas marítimas |
| 5. Planície | 12. Urbano/Perímetro urbano |
| 6. Margem da floresta | 13. Margem da estrada |
| 7. Área florestal queimada | 14. Outras _____ |

FISIOGRAFIA DO LOCAL

- | | | |
|-------------|-----------------|-----------------|
| 1. Planície | 4. Planalto | 7. Montanha |
| 2. Bacia | 5. Terras Altas | 8. Outras _____ |
| 3. Vale | 6. Colina | |

TOPOGRAFIA DO LOCAL

- | | | |
|--------------|--------------|----------------|
| 1. Plano | 4. Cume | 7. Montanhoso |
| 2. Ondulado | 5. Depressão | 8. Outro _____ |
| 3. Declivoso | 6. Colinado | |

TEXTURE DO SOLO

- | | | |
|--------------------|------------------|---------------------|
| 1. Arenoso | 5. Argiloso | 9. Franco-limoso |
| 2. Franco | 6. Limoso | 10. Argilo-arenoso |
| 3. Franco arenoso | 7. Argilo-limoso | 11. Alante orgânico |
| 4. Franco argiloso | 8. Limo-arenoso | 10. Outra _____ |

LATITUDE DO LOCAL: 40.083923

LONGITUDE DO LOCAL: -7.053858

ALTITUDE DO LOCAL: 526

FONTE DE COLHEITA:

- | | | |
|-----------------------|----------------------|---------------|
| 1. Habitat silvestre: | 2. Quinta: | 3. Mercado: |
| 1.1 Floresta/Bosque | 2.1 Campo cultivado | 3.1 Municipal |
| 1.2 Matagal | 2.2 Pomar | 3.2 Vila |
| 1.3 Prado | 2.3 Jardim | 3.3 Cidade |
| 1.4 Habitat aquático | 2.4 Terra de pouso | 3.4 Comercial |
| | 2.5 Pastagem | 3.5 Outro |
| | 2.6 Armazém agrícola | |
| | 2.7 Vinha | |

4. Instituição 5. Outra _____

ESTATUTO DA AMOSTRA:

- | |
|---------------|
| 1. Silvestre |
| 2. Infestante |

PEDREGOSIDADE

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 1. Nenhuma | 3. Media (5 a25%) |
| 2. Pouca (1 a 5%) | 4. Alta (>25%) |

DRENAGEM

- | | |
|-------------|--------------|
| 1. Pobre | 3. Boa |
| 2. Moderada | 4. Excessiva |

AMOSTRA DE SOLO sim nao

GESTÃO HUMANA DO HABITAT

- | |
|----------------------------|
| 1. Áreas de Pastagem |
| 2. Gestão florestal |
| 3. Terra de pouso |
| 4. Campos abandonados |
| 5. Regeneração da floresta |
| 6. Sem gestão humana |
| 7. Outra _____ |

FACTORES DE PERTURBAÇÃO

- | | |
|-----------|-----------------|
| 1. Humana | 4. Inundações |
| 2. Animal | 5. Mineração |
| 3. Fogo | 6. Outros _____ |

PARTE DA PLANTA UTILIZADA

- | | | |
|--|------------------------|------------------------|
| 1. Caule/Ironco | 5. Casca | 8. Semente |
| 2. Ramos | 6. Flor/infloroscência | 9. Raiz |
| 3. Folha | 7. Fruto | 10. Seiva/Resina/Latex |
| 4. Rizoma, bolbo, tubérculo ou outros propágulos vegetativos | | |

UTILIZAÇÃO DA PLANTA

- | | | |
|----------------|--------------|---------------------|
| 1. Alimento | 5. Bebida | 9. Foragem/Pastagem |
| 2. Medicinal | 6. Fibras | 10. Construção |
| 3. Aromática | 7. Madeira | 11. Ornamental |
| 4. Condimentar | 8. Artesanal | 12. Outras _____ |

TIPO DE AMOSTRA COLHIDA

- | | | |
|---------------|------------|----------|
| 1. vegetativo | 2. semente | 3. ambos |
|---------------|------------|----------|

NOME LOCAL DA PLANTA: _____

NUMERO DE PLANTAS ENCONTRADAS _____

Por local 1 Tamanho do local 30 (m²)

NUMERO DE PLANTAS AMOSTRADAS: 1

TIPO DE AMOSTRAGEM: Vegetal

QUANTIDADE DEMATERIAL: 200 g de fruto e 100 g de folhas

FOTOGRAFIA sim n.º de fotos: 3

FORAM COLHIDAS OUTRAS AMOSTRAS DO MESMO

GRUPO DE ESPECIES DE PLANTAS sim nao

ESPECIME DE HERBARIO sim nao n.º _____

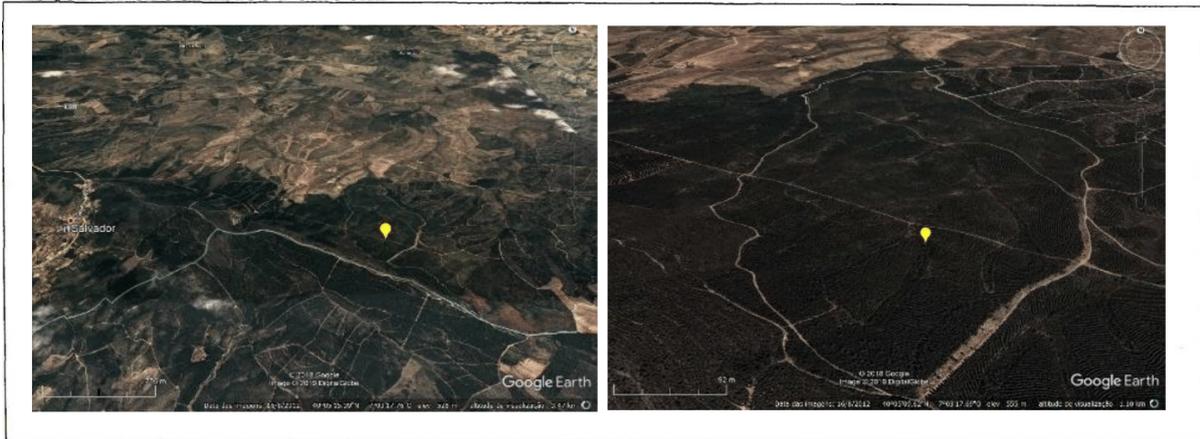
PRINCIPAL AMEAÇA DA POPULAÇÃO - Erosão genética

- | |
|-------------------|
| 1. Desertificação |
| 2. Erosão do solo |
| 3. Desflorestação |
| 4. Outras _____ |

TIPOS DE PROPAGAÇÃO NATURAL 1

- | | |
|----------------|-----------------------------|
| 1. Por semente | 3. Por semente e vegetativa |
| 2. Vegetativa | 4. Apomítico |

ESQUEMA GEOGRÁFICO DO LOCAL



MODOS DE PROPAGAÇÃO NATURAL

1. Por semente

1.1 Predominantemente autogâmico

1.2 Obrigatoriamente alogâmico

1.3 Alogâmico facultativo

1.4 Outros _____

2. Vegetativa

2.1 Rizomas

2.2 Estolhos

2.3 Tubérculos

2.4 Bolbos e bolbilhos

2.5 Raízes gemífera

2.6 Turiões

2.7 Clones

2.8 Outros _____

3. Apomítico

TIPO FISIONOMICO

1. Plantas propagadas por semente e ciclo de vida de menos de 1 ano - TERÓFITOS

2. Plantas herbáceas vivazes que na época desfavorável só subsistem devido aos órgãos subterrâneos (bolbos, rizomas, tubérculos, bolbilhos, etc.) - CRIPTÓFITOS

3. Plantas herbáceas vivazes, pelo menos bianuais, com gemas de renovo a superfície do solo - HEMICRIPTÓFITOS

4. Plantas lenhosas ou herbáceas vivazes cujas gemas de renovo se

encontram a menos de 50 cm do solo - GAMÉFITOS

5. Plantas lenhosas cujas gemas de renovo se encontram a mais 50 cm do solo - FANERÓFITOS

6. Plantas trepadeiras lenhosas de caules flexíveis que podem atingir grande desenvolvimento e altura vegetando sobre outras árvores, rochedos ou muros - LIANAS

A POPULAÇÃO ENCONTRA-SE ISOLADA DE OUTRAS?

sim

nao

QUAIS SÃO AS BARREIRAS ENTRE POPULAÇÕES NESTA ÁREA?

DENSIDADE POPULACIONAL

1. Poucos indivíduos dispersos

2. Muito escasso (< 1 % cobertura do solo)

3. Escasso (1 - 5% cobertura)

4. Presente (> 5% - 25% cobertura)

5. Alta (> 25%)

DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS INDIVÍDUOS DESTA ESPÉCIE NA POPULAÇÃO

1. Isoladas

2. Em grupos, manchas ou tufos

3. Em tapete

EXPOSIÇÃO

EXPOSIÇÃO		pH	
N 1	S 5	muito baixo (4)	1
NE 2	SE 6	baixo (4 - 5.5)	2
E 3	W 7	médio (5.5 - 7.5)	3
SE 4	NW 8	elevado (7.5 - 9)	4
		muito elevado (9)	5

COMUNIDADE EM QUE SE INSERE _____

Área interior do país de maior influência mediterrânica

ESPÉCIES DEPLANTAS DOMINANTES:

Área Carvalho negral, pinheiros

ESPÉCIES SILVESTRES ASSOCIADAS: azinheira, carvalho, negral, giesta, pinheiro

VARIAÇÃO MORFOLÓGICA ENCONTRADA:

EXISTEM FORMAS AFINS CULTIVADAS COMO CULTIVO

NOS ARREDORES ?

sim

nao

DOENÇAS E PRAGAS:

OUTRAS OBSERVAÇÕES:

RELAÇÃO HCL

nenhuma 1
ligeira 2
forte 3

LUZ

sol 1
semi sombra 2
sombra 3