



# Estudos de Propagação em *Crataegus monogyna*

Margarida Moura

20210848

Licenciatura em Agronomia

## **Orientadores**

Professora Doutora Fernanda Delgado

Professora Doutora Cristina Canavarro

Doutora Joana Domingues

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciado em Agronomia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Fernanda Delgado e da Professora Doutora Cristina Canavarro, do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Doutora Joana Domingues do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior

**julho 2024**



## Agradecimentos

Às Sílvias, por todas as vivências, momentos de partilha e trabalho conjunto, foram sem dúvida o melhor destes 3 anos.

Ao meu marido João, cuja coragem em não se acomodar me motivou a concluir esta licenciatura.

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Fernanda Delgado, Professora Doutora Cristina Canavarro e Doutora Joana Domingues, pelos valiosos ensinamentos, partilhas, apoio e orientação.

Os meus sinceros agradecimentos a todos.



## Resumo

Esta investigação, efetuada no âmbito do estágio da Licenciatura em Agronomia, aborda o estudo da propagação do Pilriteiro (*Crataegus monogyna* Jacq.), uma espécie autóctone, com valor ecológico, ornamental e medicinal. O principal objetivo deste estudo foi a valorização da espécie, investigando as principais complexidades na sua propagação e procurando encontrar formas de superar essas dificuldades. Os ensaios decorreram nas instalações do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI) e no Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESACB).

Foram testadas metodologias de propagação seminal ou sexuada e, vegetativa ou assexuada. Na propagação seminal, foram realizados ensaios *in vitro* e *ex vitro*. Nos ensaios *in vitro* efetuou-se germinação em placas de Petri (testaram-se diferentes períodos de estratificação e a influência da luz na quebra de dormência das sementes) e germinação em meio de cultura (testando-se o período de conservação da semente, os desinfetantes utilizados no processo de desinfeção e a remoção do endocarpo antes ou após o processo de desinfeção). Nos ensaios *ex vitro* foram testados dois substratos diferentes e as sementes foram submetidas ao mesmo período de estratificação (dez semanas a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  e 16 semanas a  $4^\circ\text{C}$ ). Na propagação vegetativa (macropropagação) utilizaram-se estacas terminais e intermédias tratadas com ácido indolbutírico (AIB) 0,5% (com um controlo para cada tipo de estaca sem regulador) e foi estudada também a micropropagação com explantes provenientes de germinação em meio de cultura.

Os resultados obtidos demonstram que, no período em que decorreu o estágio, a germinação apenas ocorreu no ensaio *in vitro* em meio de cultura em todas as modalidades estudadas. Neste ensaio, as taxas de germinação mais elevadas (50%) e o período de latência mais baixo (5 dias) ocorreram quando foram usadas sementes frescas, desinfetadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) nas duas modalidades de remoção do endocarpo. O tempo médio de germinação mais baixo aconteceu na modalidade em que a remoção do endocarpo foi anterior ao processo de desinfeção. Na propagação vegetativa não ocorreu enraizamento nas modalidades de macropropagação embora se tenha verificado formação de *callus*. As estacas intermédias foram favorecidas pelo tratamento com AIB 0,5%, enquanto as estacas terminais não foram beneficiadas pelo mesmo tratamento. Na micropropagação, a taxa média de multiplicação apurada na segunda avaliação (5,8 novos explantes por explante avaliado) foi superior à taxa média da primeira avaliação (3 novos explantes por explante avaliado).

## Palavras chave

Dormência; Espécies endógenas; Germinação; Pilriteiro; Propagação vegetativa



## Abstract

This research, conducted as a requirement for the Agronomy undergraduate internship, addresses the study of the propagation of the native hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.), a plant with ecological, ornamental, and medicinal properties. This study's primary goal was to assess the species' value by looking at the key factors that complicate its reproduction and attempting to identify solutions. The experiments were conducted in Beira Interior Plant Biotechnology Center (CBPBI) and in the Biology Laboratory at the School of Agronomy from the Polytechnic Institute of Castelo Branco (ESACB).

Seminal or sexual and vegetative or asexual propagation methodologies were tested. In seminal propagation, *in vitro* and *ex vitro* tests were carried out. In *in vitro* tests, germination was carried out in Petri dishes (different periods of stratification and the influence of light on seed dormancy breaking were tested) and germination in culture medium (the seed conservation period, the disinfectants used in the disinfection process and the removal of the endocarp before or after the disinfection process). In *ex vitro* tests, two different substrates were tested and the seeds were subjected to the same stratification periods (10 weeks at a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  and 16 weeks at  $4^\circ\text{C}$ ). In vegetative propagation (macropropagation), terminal and intermediate cuttings treated with 0.5% indolebutyric acid (IBA) were used (with a control for each type of cutting without regulator) and micropropagation with explants originated from germination in culture media was also studied.

The results show that, during the internship period, out of all the investigated modalities, germination only happened in the *in vitro* trial in culture media. In this trial, the highest germination rates (50%) and the shortest latency period (5 days) occurred when fresh seeds disinfected with sodium hypochlorite were used in both endocarp removal modalities. The lowest average germination time occurred when endocarp was removed prior to the disinfection process. In vegetative propagation, no rooting occurred in the macropropagation modalities, although callus formation was observed. Intermediate cuttings were favored by the treatment with 0,5% IBA, while terminal cuttings did not benefit from the same treatment. In micropropagation, the average multiplication rate determined in the second evaluation (5,8 new explants per evaluated explant) was higher than the average rate in the first evaluation (3 new explants per evaluated explant).

## Keywords

Dormancy ; Endogenous species ; Germination ; Hawthorn ; Vegetative propagation



# Índice geral

Agradecimentos.....	III
Resumo .....	V
Abstract.....	VII
Índice geral.....	IX
Índice de figuras.....	XI
Lista de quadros.....	XII
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	XIII
1. Introdução.....	1
2. Pilriteiro - <i>Crataegus monogyna</i> .....	2
2.1. Distribuição.....	2
2.2. Morfologia.....	3
2.3. Utilizações.....	4
3. Propagação de plantas .....	5
3.1. Propagação seminal .....	5
3.1.1. Produção de semente .....	6
3.1.2. Apomixia.....	7
3.1.3. Germinação.....	7
3.1.4. Dormência.....	8
3.2. Propagação vegetativa .....	9
3.2.1. Macropropagação.....	9
3.2.2. Micropropagação.....	9
4. Material e métodos.....	10
4.1. Propagação Seminal <i>ex vitro</i> .....	10
4.2 Propagação Seminal <i>in vitro</i> .....	11
4.2.1 Germinação em placa de Petri.....	11
4.2.3 Germinação em meio de cultura.....	11
4.3 Teste de tetrazólio .....	12
4.4. Propagação Vegetativa.....	12
4.4.1 Macropropagação.....	12
4.4.2 Micropropagação.....	13
5. Resultados e discussão.....	14
5.1. Propagação Seminal <i>ex vitro</i> .....	14

5.2 Propagação Seminal <i>in vitro</i> .....	15
5.2.1 Germinação em placa de Petri .....	15
5.2.2 Germinação em meio de cultura .....	15
5.3 Propagação Vegetativa .....	17
5.3.1 Macropropagação .....	17
5.3.2 Micropropagação .....	18
6. Considerações finais .....	18
7. Referências bibliográficas .....	19
Apêndices .....	i
Apêndice I – Ficha informativa relativa a <i>Crataegus monogyna</i> .....	i
Apêndice II - Protocolo de germinação <i>in vitro</i> de <i>Crataegus monogyna</i> .....	ii
Apêndice III – Comparação de modalidades através de análise ANOVA .....	iv
Apêndice IV – Variação de temperatura e humidade registadas com o sensor Termopro® .....	vi

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Distribuição da espécie <i>Crataegus monogyna</i> : a) distribuição global; b) distribuição nacional (in GBIF: <i>Crataegus monogyna</i> , sem data., adaptado).....	2
<b>Figura 2</b> - Diferentes fases de floração e frutificação de <i>Crataegus monogyna</i> , (fotografias originais, Margarida Moura, 2023 e 2024). .....	4
<b>Figura 3</b> - Esquema representativo do ciclo reprodutivo das angiospérmicas, adaptado de Hartmann <i>et al.</i> , 2014.....	6
<b>Figura 4</b> - Representação da morfologia da semente de pera, adaptado de Hartmann <i>et al.</i> , 2014.....	7
<b>Figura 5</b> - Esquema representativo de diferentes formas de apomixia, adaptado de Hartmann <i>et al.</i> , 2014.....	7
<b>Figura 6</b> - Exemplos de várias técnicas de propagação vegetativa, adaptado de Hartmann <i>et al.</i> , 2014.....	9
<b>Figura 7</b> - Início do ensaio de germinação <i>ex vitro</i> .....	10
<b>Figura 8</b> - Modalidades do ensaio de germinação em placa de Petri: MOD1, MOD2, MOD3 e MOD4.....	11
<b>Figura 9</b> - Delineamento do ensaio de propagação vegetativa, Macropropagação. ....	13
<b>Figura 10</b> - Imagens do ensaio de micropropagação.....	14
<b>Figura 11</b> -Diferentes fases do ensaio do teste do tetrazólio.....	14
<b>Figura 12</b> - Sementes em que se verifica a abertura do endocarpo.....	15
<b>Figura 13</b> - Tempo de latência, tempo médio de germinação (TMG) e percentagem de germinação das modalidades em estudo.....	15
<b>Figura 14</b> – Gráfico com as médias de percentagem de germinação acumuladas entre as modalidades estudadas.....	16
<b>Figura 15</b> - Evolução das médias de germinação ao longo do tempo.....	16
<b>Figura 16</b> - Germinação e desenvolvimento inicial de <i>C. monogyna</i> em meio de cultura .....	17
<b>Figura 17</b> - Avaliação do ensaio de macropropagação, onde se pode verificar a presença de <i>callus</i> em estacas terminais e intermédias. ....	17
<b>Figura 18</b> – Exemplo de alguns explantes avaliados.....	18

## Lista de quadros

<b>Quadro 1</b> - Características morfológicas de <i>Crataegus monogyna</i> (in Flora Ibérica: <i>Crataegus monogyna</i> , sem data).....	3
<b>Quadro 2</b> - Chave dicotômica para diferenciar tipos de dormência adaptado de Baskin & Baskin, (2014). .....	8
<b>Quadro 3</b> - Modalidades do ensaio de germinação em meio de cultura. ....	12
<b>Quadro 4</b> - Resumo de resultados das avaliações de multiplicação de <i>C. monogyna</i> .....	18
<b>Quadro 5</b> - ANOVA uni fatorial, para avaliação de diferenças das 6 modalidades entre si (apenas um fator: modalidade) .....	iv
<b>Quadro 6</b> - Teste de comparações múltiplas de Scheffé com as modalidades agrupadas em cinco grupos homogêneos.....	iv
<b>Quadro 7</b> - ANOVA bi fatorial para avaliação do efeito do tempo em conjunto com as seis modalidades .....	v

## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

AIB - Ácido Indolbutírico

ANOVA - Analysis of Variance

BAP - 6-benzilaminopurina

CBPBI - Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior

ESACB - Escola Superior Agrária de Castelo Branco

GBIF—The Global Biodiversity Information Facility

M&S - Murashige & Skoog

MOD1 - Modalidade 1

MOD2 - Modalidade 2

MOD3 - Modalidade 3

MOD4 - Modalidade 4

PAM - Plantas Aromáticas e Medicinais

S10CHgCl - sementes com 10 semanas, com casca, desinfetadas com bicloreto de mercúrio

S10CNaOCl - sementes com 10 semanas, com casca, desinfetadas com hipoclorito de sódio

S10NaOCl - sementes com 10 semanas, sem casca, desinfetadas com hipoclorito de sódio

SFCHgCl - sementes frescas, com casca, desinfetadas com bicloreto de mercúrio

SFCNaOCl - sementes frescas, com casca, desinfetadas com hipoclorito de sódio

SFNaOCl - sementes frescas, sem casca, desinfetadas com hipoclorito de sódio

SPSS® - Statistical Package for the Social Sciences

TMG - tempo médio de germinação



# 1. Introdução

As atividades desenvolvidas neste trabalho tiveram lugar, na sua maioria, nas instalações do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI). Este, é um centro de investigação e desenvolvimento experimental que tem como missão criar conhecimento e valorizar a investigação na área da biotecnologia de plantas associada aos setores produtivos da fileira agrícola, florestal e das plantas aromáticas e medicinais.

A propagação de plantas é uma atividade essencial da humanidade e, a sua descoberta, deu início ao que agora chamamos de civilização e também ao início do domínio do ser humano sobre o planeta. Com o início da agricultura há cerca de 10.000 anos, os povos antigos que eram sobretudo caçadores e recolectores começaram a cultivar plantas e a domesticar animais. Estas atividades permitiram o estabelecimento de comunidades estáveis, onde as pessoas começaram a seleccionar e propagar os tipos de plantas que garantiam um maior e mais conveniente fornecimento de alimentos (e também de outros produtos). Estas comunidades conseguiram, então, permanecer no mesmo local por longos períodos, criando assim centros de atividade que eventualmente se tornariam cidades e depois países. A propagação e multiplicação de plantas é, então, o processo deliberado de reprodução de plantas, levado a cabo por indivíduos apaixonados pelas mesmas e que se foram especializando a partir de métodos tradicionais. Atualmente, estas práticas são já desenvolvidas por empresas que as produzem com diversos usos: alimento, fibra, material de construção, medicinal, cosmético (Hartmann *et al.*, 2014).

As práticas de propagação têm por base dois mecanismos distintos: o crescimento de uma nova planta originária da germinação de uma semente (processo germinativo ou sexuado) e o crescimento de uma nova planta com origem numa parte (órgão ou tecido) de uma planta mãe (processo vegetativo ou assexuado).

Os processos de produção de novas plantas possuem diversas dificuldades: no processo germinativo podem existir dormências, no processo de propagação vegetativa, as dificuldades prendem-se com o tipo de estacas, época de colheita, particularidades das espécies, fatores ambientais e outros.

A importância do conhecimento a nível de técnicas de propagação e multiplicação de plantas estende-se também a espécies autóctones, que não são comumente utilizadas para produção direta de alimentos, mas que têm interesse a vários níveis, nomeadamente: fomento da biodiversidade (ao constituírem refúgio e alimento para a fauna silvestre); aumento da sustentabilidade e resiliência dos ecossistemas (por possuírem características de rusticidade e capacidade de regeneração natural); resistência à seca, à poluição, e por vezes ao fogo; algumas valorizadas enquanto espécies ornamentais e pelo seu valor medicinal.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de “olhar” para uma espécie que, sendo autóctone e possuindo todas as potencialidades acima referidas, é subvalorizada quando pode ser um recurso a explorar. Para isso foi efetuada pesquisa bibliográfica sobre a espécie, sobre métodos de propagação para a mesma e, foi possível perceber que a nível dos constituintes que a tornam uma planta medicinal bastante promissora, existe bastante informação. Já o mesmo não acontece a respeito das técnicas de propagação, sendo escassa essa informação. Nesta investigação tentou-se perceber se existem dificuldades em algum dos métodos de propagação,

quais são estas dificuldades e como podem ser ultrapassadas. Ao mesmo tempo, procurou-se avaliar qual o método que conduz a melhores resultados.

O presente relatório encontra-se organizado com a seguinte ordem:

- A espécie – *Crataegus monogyna*
- Propagação de plantas
- Materiais e métodos
- Resultados e discussão
- Considerações finais.

## 2. Pilriteiro - *Crataegus monogyna*

### 2.1. Distribuição

O género *Crataegus*, pertence à família das Rosáceas e é encontrado principalmente nas regiões temperadas do hemisfério norte. Está bem definido, contudo, as espécies nele incluídas constituem desafios taxonómicos devido à ocorrência de apomixia, hibridização e introgressão com outras espécies estreitamente relacionadas. A Eurásia abriga cerca de 50 a 100 espécies nativas, enquanto a América do Norte apresenta uma maior diversidade: 100 a 1100 espécies (Fichtner & Wissemann, 2021).

Ainda de acordo com Fichtner & Wissemann, 2021, a espécie *Crataegus monogyna* é exclusivamente encontrada na Europa, Norte de África e Oeste da Ásia, no entanto, consultando a plataforma *GBIF—the Global Biodiversity Information Facility*, podem verificar-se registos desta espécie na América, Sul de África, Este da Ásia e Oceânia (Figura 1 a). É autóctone e amplamente distribuída em Portugal Continental, introduzida na Madeira e inexistente no Arquipélago dos Açores (Figura 1 b).



**Figura 1** - Distribuição da espécie *Crataegus monogyna*: a) distribuição global; b) distribuição nacional (in GBIF: *Crataegus monogyna*, sem data., adaptado)

## 2.2. Morfologia

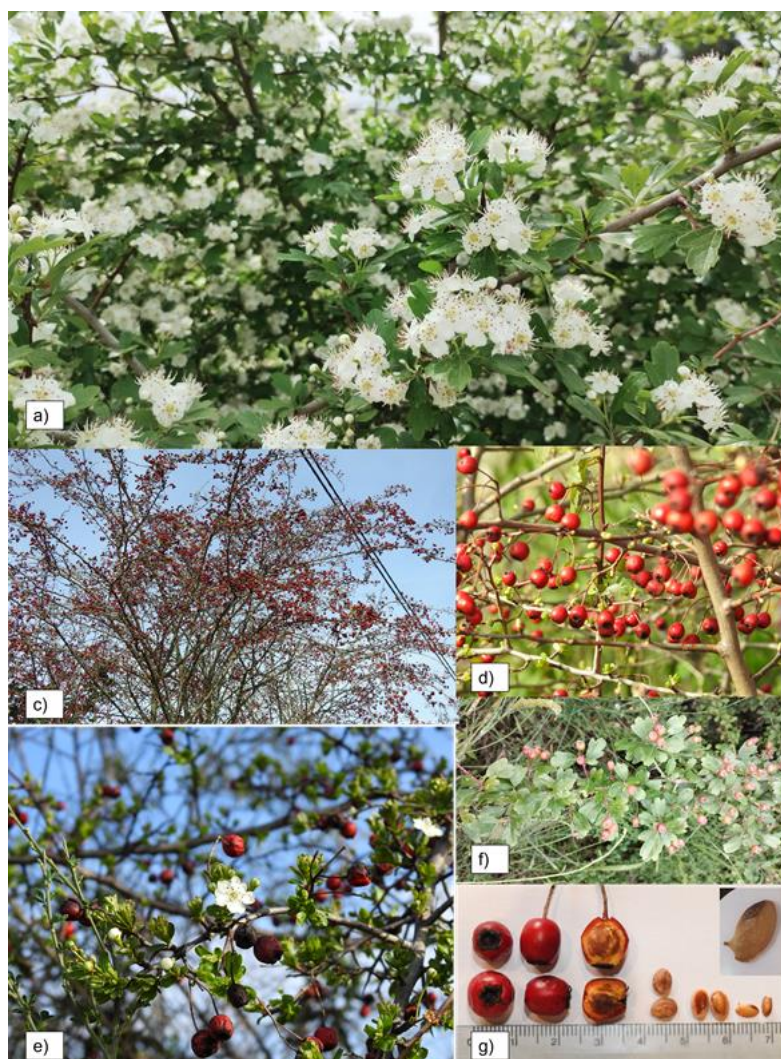
Este arbusto caducifólio ou pequena árvore, apresenta uma floração exuberante a partir do mês de março (*in Flora-on: Crataegus monogyna*, sem data), e a partir do outono frutifica com os seus pequenos pomos (frutos) vermelhos, contribuindo significativamente para a estética dos locais onde se encontra e presenteando os observadores com a sua beleza singular.

As suas características botânicas encontram-se descritas no Quadro 1.

**Quadro 1** - Características morfológicas de *Crataegus monogyna* (*in Flora Ibérica: Crataegus monogyna*, sem data).

Característica	Descrição
Altura	5 a 10 metros
Ramos jovens	Glabros ou vilosos
Espinhos	Sim, até 2,5 cm
Folhas	Base atenuada ou cuneada, raramente arredondada. Às vezes coriáceas, variando de glabras a ± vilosas na face superior e inferior. Limbo de 10-30(57) x 8-32(60) mm
Lóbulos das folhas	± profundamente lobados, com 1-3 (3) pares de lóbulos laterais. Lóbulo inferior de 4-6 (9,3) mm de largura, dividido em 35-80% do seu comprimento, agudo, com dentes apicais e muito raramente 1-2 denticulos na margem basal.
Estípulas	3-15 mm, inteiras ou com um par de dentes na base
Pecíolo	1-30 mm, glabro ou viloso
Inflorescências	Com 4-11 flores
Pedicelos	3-30 mm, glabros ou vilosos
Brácteas	0,5-7,5 x 0,3-2mm, caducas, de margem inteira ou denticulada
Recetáculo	2-4mm, glabro ou viloso
Sépalas	1,5-4,5 x 1,5-2,5 mm ± triangulares, glabras ou vilosas
Pétalas	47,8 x 4-7 mm, brancas, muito raramente vermelhas
Estames	15-20, anteras rosado-purpúreas
Estiletos	Um, muito raramente e somente em algumas flores, até 3
Pomo	5,5-10(12,8) x 4,4-9,5(10,8) mm, subgloboso ou cilíndrico, vermelho
Pireno	Um, muito raramente e só em alguma flor até 3, dorsal e ventralmente sulcados

Na Figura 2, podem observar-se algumas das características descritas no Quadro 1.



a) *Crataegus monogyna* em plena floração; b) detalhe de flor; c) exemplar da ESACB com frutificação abundante; d) gomos abrolhados com frutificação ainda em abundância; e) início da floração; f) frutos vingados e a mudarem de cor, detalhe de frutos e semente

**Figura 2** - Diferentes fases de floração e frutificação de *Crataegus monogyna*, (fotografias originais, Margarida Moura, 2023 e 2024).

### 2.3. Utilizações

*Crataegus monogyna* é uma espécie com valor medicinal rica em vários metabolitos secundários, incluindo (Martinelli *et al.* 2021):

- **Flavonóides:** propriedades antioxidantes e antimicrobianas que estimulam a produção de anticorpos.
- **Vitamina-C:** nutriente essencial que o ser humano não é capaz de sintetizar e que previne o stress oxidativo relacionado com várias patologias como cancro e doenças cardiovasculares por atuar como antioxidante.
- **Glicósidos, antocianinas, saponinas, compostos fenólicos e taninos:** Atuam em sinergia com outros metabolitos contribuindo para o valor medicinal da planta.

Alguns compostos bioativos importantes presentes nesta espécie incluem procianidinas, epicatequina, hiperósido, isoquercetina, ácido clorogénico, ácido ursólico e ácido oleanólico.

Em virtude de possuir um elevado nível destes compostos, estudos demonstraram ter potencial no tratamento de doenças crónicas e degenerativas. As principais propriedades farmacológicas incluem: atividade antioxidante, efeitos anti-inflamatórios, efeitos cardioprotetores, propriedades antidiabéticas, efeitos sedativos e ansiolíticos (Martinelli *et al.*, 2021).

Vem sendo usado tradicionalmente por vários povos pelos seus benefícios a nível medicinal. Alguns dos seus usos etnobotânicos incluem (Martinelli *et al.*, 2021):

- **Saúde cardiovascular:** usado para tratar doenças cardíacas, melhorar a circulação e baixar a pressão sanguínea.
- **Saúde digestiva:** consumido para aliviar distúrbios digestivos tais como indigestão e dores de estômago.
- **Anti-inflamatório e antioxidante:** usado pelas suas propriedades de reforçar a saúde no geral, particularmente reduzindo a inflamação e prevenindo o stress oxidativo.
- **Alívio do stress e ansiedade:** empregue pelos seus efeitos relaxantes.
- **Saúde respiratória:** utilizado no tratamento de condições respiratórias como asma e bronquite.

Os compostos que lhe conferem estas propriedades estão presentes nas folhas, flores e frutos (Dinçer *et al.* 2023, Martinelli *et al.*, 2021) em quantidades variáveis. É usado em várias preparações tais como infusões, tinturas e extratos (Martinelli *et al.*, 2021).

Em Portugal, num estudo efetuado por investigadores do Instituto Superior de Agronomia, para avaliar a mortalidade e a capacidade de regeneração de 11 espécies após a ocorrência de incêndio, pode-se observar que, além de demonstrar capacidade regeneração a partir da base *C. monogyna*, apresentou uma taxa de mortalidade de 0% no primeiro e segundo ano após ocorrência de incêndio (Catry *et al.*, 2006). Estas características poderão torná-lo uma espécie de interesse para usar como recurso em zonas vulneráveis.

Salienta-se ainda o seu papel como importante fonte de habitat e alimento para a vida selvagem no inverno e como fonte de néctar para abelhas (Dinçer *et al.* 2023). Esta espécie tem ainda valor ornamental, sendo aprazível para uso em arquitetura paisagística (Dinçer *et al.* 2023).

No Apêndice I, encontra-se a ficha informativa relativa a *C. monogyna*.

### 3. Propagação de plantas

A propagação de plantas pode realizar-se de forma sexuada ou assexuada. A forma sexuada ou seminal pressupõe o uso de semente, a propagação assexuada ou vegetativa implica fazer crescer uma nova planta a partir de uma parte (órgão ou tecido) da planta mãe (Awotedu *et al.*, 2021).

#### 3.1. Propagação seminal

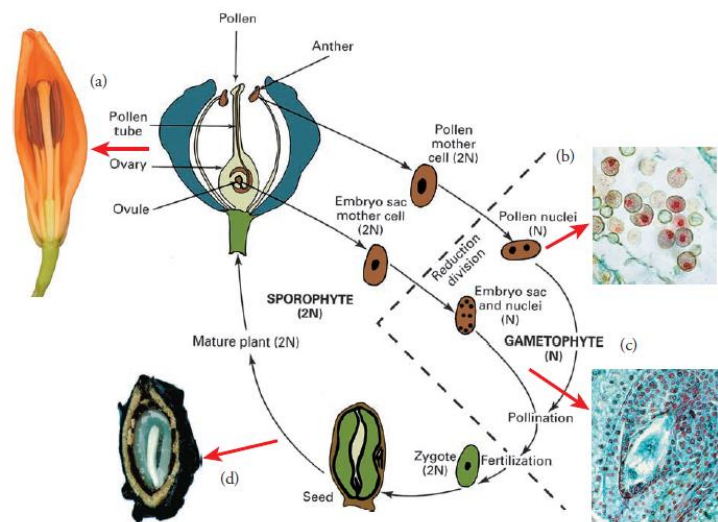
Um fator fundamental para aumentar a diversidade genética e com isso a capacidade adaptativa das espécies, é a reprodução sexuada (Delgado, 2010).

Há cerca de 400 milhões de anos, o desenvolvimento da raiz e de um sistema vascular, possibilitaram às plantas a transição do ambiente aquático para o ambiente terrestre, onde

ficaram relativamente imóveis. As primeiras plantas vasculares reproduziam-se por esporos e necessitavam de um ambiente húmido para que o gâmeta masculino fecundasse o feminino. O desenvolvimento do mecanismo de produção de semente permitiu que as plantas deixassem de estar condicionadas pela humidade ambiental e fossem capazes de colonizar outros locais. As produtoras de sementes, sobretudo angiospérmicas foram extremamente bem-sucedidas chegando a um número estimado de 250.000 espécies, tornando-o no grupo mais diversificado do reino *Plantae* (Hartmann *et al.*, 2014).

### 3.1.1. Produção de semente

Uma das características das angiospérmicas é a dupla fertilização: gâmetas masculinos entram no óvulo, um funde-se com o ovo para formar o zigoto e o segundo funde-se com dois núcleos polares para formar o endosperma. Esta dupla fertilização conduz a um endosperma triploide (Figura 3).



**Figura 3** - Esquema representativo do ciclo reprodutivo das angiospérmicas, adaptado de Hartmann *et al.*, 2014.

A semente é então constituída por um embrião, tecido de reserva (endosperma) e por uma proteção exterior (endocarpo). A estrutura base do embrião é um eixo com crescimento nas duas extremidades, uma que irá originar a radícula e outra que irá originar o caule. O tecido de reserva, contido principalmente no endosperma, tem a função de suprir as necessidades nutricionais do embrião durante a germinação e até que a plântula tenha capacidade de produzir os seus próprios recursos através da fotossíntese. O endocarpo envolve a semente e confere proteção física podendo excluir a entrada de água e gases, é normalmente constituído por duas camadas, uma mais externa e uma mais interna, transparente na maior parte dos casos. A proteção que estas estruturas conferem à semente permitem que esta seja

transportada a longas distâncias e armazenada por longos períodos de tempo (Hartmann *et al.*, 2014). Na Figura 4, encontra-se a constituição de uma semente de pera.

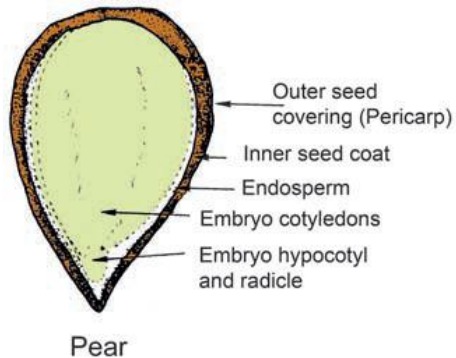


Figura 4 - Representação da morfologia da semente de pera, adaptado de Hartmann *et al.*, 2014.

### 3.1.2. Apomixia

Apomixia é a formação de um embrião sem que ocorra o processo normal de meiose e fertilização. O genótipo do embrião e da plântula originada será igual ao da planta mãe. É, portanto, um processo assexuado de produção de semente. Os indivíduos resultantes deste fenômeno são denominados apomíticos. Algumas espécies ou indivíduos apenas produzem embriões apomíticos (apomíticos obrigatórios), contudo, a maior parte das espécies apomíticas produz embriões apomíticos e sexuados na mesma planta (apomíticos facultativos) (Hartmann *et al.*, 2014). Na Figura 5 estão representadas diferentes formas de apomixia.

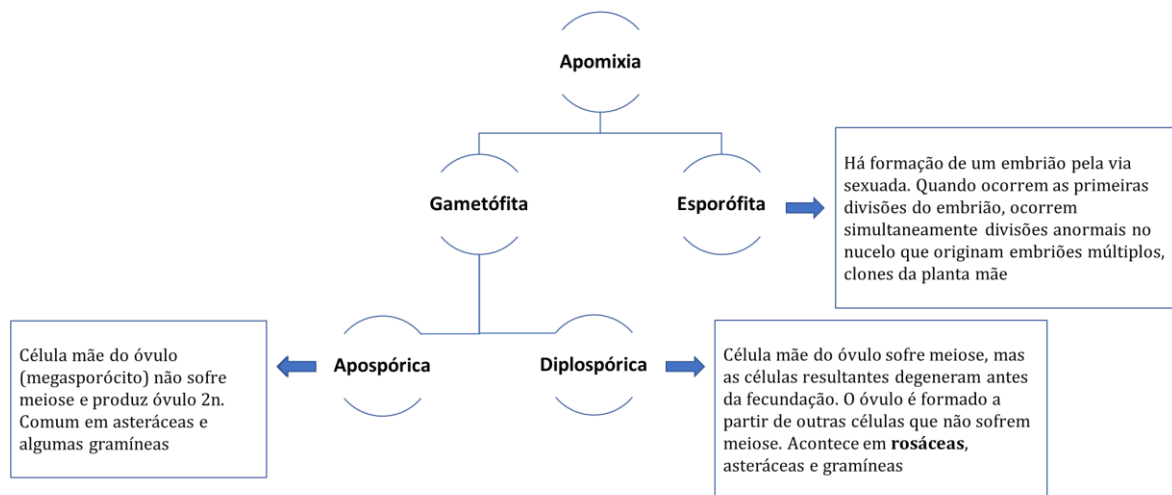


Figura 5 - Esquema representativo de diferentes formas de apomixia (adaptado de Hartmann *et al.*, 2014).

### 3.1.3. Germinação

A germinação das sementes é condicionada por fatores ambientais (temperatura, luz, água e oxigênio), fatores inerentes à própria semente (permeabilidade da camada externa protetora,

localização das substâncias de reserva, existência de mecanismos de dormência) (Delgado, 2010).

### 3.1.4. Dormência

A dormência pode ser de vários tipos: fisiológica, morfofisiológica, física, física e fisiológica. No Quadro 2 pode ser consultada uma chave dicotômica para identificar os diferentes tipos de dormências.

**Quadro 2** - Chave dicotômica para diferenciar tipos de dormência adaptado de Baskin & Baskin, (2014).

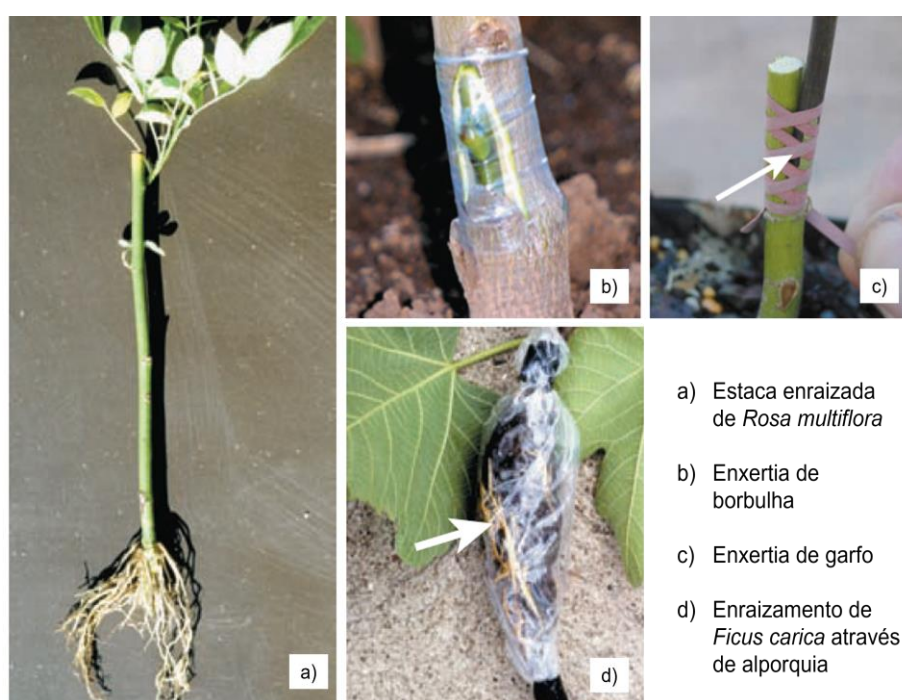
#	Estado da Semente	Seguinte
1	Embrião diferenciado e totalmente desenvolvido	2
2	Sementes absorvem água	3
3	Emergência da raiz ocorre em cerca de 4 semanas (geralmente em poucos dias)	4
4	Após a emergência da raiz, a emergência do rebento ocorre dentro de alguns dias	NÃO DORMENTE
4	Após a emergência da raiz, a emergência do rebento é atrasada 3-4 semanas ou mais	DORMÊNCIA FISIOLÓGICA EPICOTÍLICA
3	Emergência da raiz demora mais de 4 semanas	5
5	Após a emergência da raiz, a emergência do rebento ocorre dentro de alguns dias	DORMÊNCIA FISIOLÓGICA REGULAR
5	Após a emergência da raiz, a emergência do rebento é atrasada 3-4 semanas ou mais	DORMÊNCIA FISIOLÓGICA EPICOTÍLICA
2	Sementes não absorvem água	6
6	Sementes escarificadas tornam-se completamente embebidas (geralmente em 1 dia) e germinam em cerca de 4 semanas (geralmente em poucos dias)	DORMÊNCIA FÍSICA
6	Sementes escarificadas tornam-se completamente embebidas (geralmente em 1 dia) mas não germinam em cerca de 4 semanas	DORMÊNCIA COMBINADA
1	Embrião indiferenciado ou se diferenciado, está subdesenvolvido	7
7	Embrião não diferenciado	8
8	Após a dispersão da semente, o embrião diferencia-se e cresce na semente embebida	DORMÊNCIA MORFOLÓGICA
8	Sementes germinam em cerca de 4 semanas	DORMÊNCIA MORFOFISIOLÓGICA
8	Sementes não germinam em cerca de 4 semanas	DORMÊNCIA MORFOFISIOLÓGICA
7	Embrião diferenciado, mas subdesenvolvido	11
11	Após serem colocadas em substrato húmido, o embrião cresce, e as sementes germinam em cerca de 4 semanas	DORMÊNCIA MORFOLÓGICA
11	Após serem colocadas num substrato húmido, o embrião não cresce, e as sementes não germinam em cerca de 4 semanas	DORMÊNCIA MORFOFISIOLÓGICA

## 3.2. Propagação vegetativa

A propagação vegetativa de plantas refere-se à produção de clones. Prática que é essencial para a produção de várias espécies com interesse agronómico: cultivares e porta enxertos, espécies florestais, hortícolas e ornamentais e também culturas usadas para produções em extensão (cana de açúcar, ananás) (Hartmann *et al.*, 2014). A propagação vegetativa pode dividir-se em dois grupos distintos de metodologias: macropropagação e micropropagação.

### 3.2.1. Macropropagação

Os métodos utilizados nesta metodologia de propagação vegetativa são: estacaria (Figura 6 a)), enxertia (Figura 6 b), e c)) mergulhia e/ou alporquia (Figura 6 d)) e a separação (Hartmann *et al.*, 2014).



**Figura 6** - Exemplos de várias técnicas de propagação vegetativa, adaptado de Hartmann *et al.*, 2014.

### 3.2.2. Micropropagação

A micropropagação e a cultura de tecidos são duas áreas da biotecnologia. A cultura de tecidos baseia-se no conceito de totipotência (conceito teórico que diz que uma única célula tem a capacidade de formar uma nova planta) (Hartmann *et al.*, 2014).

A micropropagação é uma forma de cultura de tecidos que permite a regeneração, produção e manutenção de plantas em ambiente estéril. A micropropagação é uma técnica utilizada para produção em grande número de novas plantas, e permite um controlo preciso de cada uma das fases deste processo. Recorre-se a esta técnica para propagar plantas com baixas taxas de multiplicação ou que não se conseguem propagar por outras técnicas (Hartmann *et al.*, 2014).

## 4. Material e métodos

Foram testados os métodos de propagação vegetativa e seminal, com várias modalidades: propagação seminal *ex vitro*, sementes sujeitas a estratificação e com dois substratos diferentes, propagação seminal *in vitro* em placa de Petri, com períodos diferentes de estratificação e com e sem luminosidade; propagação seminal *in vitro* em meio de cultura, com sementes colhidas em alturas diferentes, e sujeitas a processos de desinfecção diferentes; propagação vegetativa (macropropagação com estacas terminais e intermédias, com e sem regulador de crescimento e micropropagação com explantes resultantes de germinação em meio de cultura).

Foi efetuado o teste de tetrazólio numa amostra de sementes das modalidades em que não ocorreu germinação.

Os dados foram registados semanalmente, no mínimo uma vez por semana (exceto para o ensaio de propagação vegetativa em que os dados foram registados aos 30 dias após o início).

Todos os dados foram tratados com recurso ao software estatístico SPSS v.28.0 (SPSS, 2021). A metodologia da ANOVA uni-fatorial e bi-fatorial (Analys of Variance) foi aplicada para avaliar a capacidade germinativa das sementes em diferentes condições, assim como ao longo do tempo. Os pressupostos de aplicação da ANOVA foram todos validados (Maroco, 2011).

### 4.1. Propagação Seminal *ex vitro*

Neste ensaio, o objetivo foi avaliar a influência de diferentes substratos na germinação: perlite e areia. As sementes utilizadas foram submetidas a dois processos de estratificação: calor e frio e provieram de frutos colhidos no dia 3 de dezembro de 2023, em dois exemplares sites no lugar de Vinhas, união de Freguesias Cebolais de Cima e Retaxo, coordenadas 39°44'27"N7°34'43"W e 39°44'28"N7°34'43"W (Figura 7 a)). Antes da remoção da polpa, os

frutos foram submetidos ao primeiro processo de estratificação: 10 semanas a temperatura de  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  em condições de obscuridade. Findo este período a polpa foi removida, e as sementes lavadas em água corrente. Os substratos foram colocados em caixas de  $8\text{ cm} \times 7\text{ cm} \times 12\text{ cm}$  (Figura 7 d)) e foram esterilizados em autoclave. Para dar início ao segundo processo de estratificação, em frio, as sementes foram colocadas nas caixas com os diferentes substratos, a cerca de 1 cm de profundidade e, as caixas foram colocadas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  em condições de obscuridade durante quatro meses (Figura 7c)) Fizeram-se três repetições de 50 sementes para cada substrato (Figura 7e)).



Figura 7 - Início do ensaio de germinação *ex vitro*.

## 4.2 Propagação Seminal *in vitro*

### 4.2.1 Germinação em placa de Petri

Para a realização deste ensaio foram utilizadas sementes provenientes dos mesmos exemplares do ensaio anterior e também sujeitas ao primeiro processo de estratificação (10 semanas a temperatura de  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  em condições de obscuridade).

Com o objetivo de avaliar o efeito da luz e de diferentes períodos de estratificação na quebra de dormência fisiológica da semente definiram-se 4 modalidades (Figura 8):

- MOD1 - 2 meses a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e germinação com luminosidade
- MOD2 - 2 meses a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e germinação sem luminosidade
- MOD3 - 4 meses a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e germinação com luminosidade
- MOD4 - 4 meses a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e germinação sem luminosidade

Para cada uma destas modalidades fizeram-se 4 repetições de 50 sementes.

As placas de Petri (já com o papel de filtro) foram a esterilizar em autoclave e antes de colocadas nas placas, as sementes foram sujeitas a um processo de desinfecção: 20 minutos em água corrente → 10 minutos em fungicida (Mancozebe, 0,5g/l) → 30 segundos em álcool 70% → 15 minutos em lixívia (NaOCl 3%) → três passagens por água destilada durante 1 minuto.

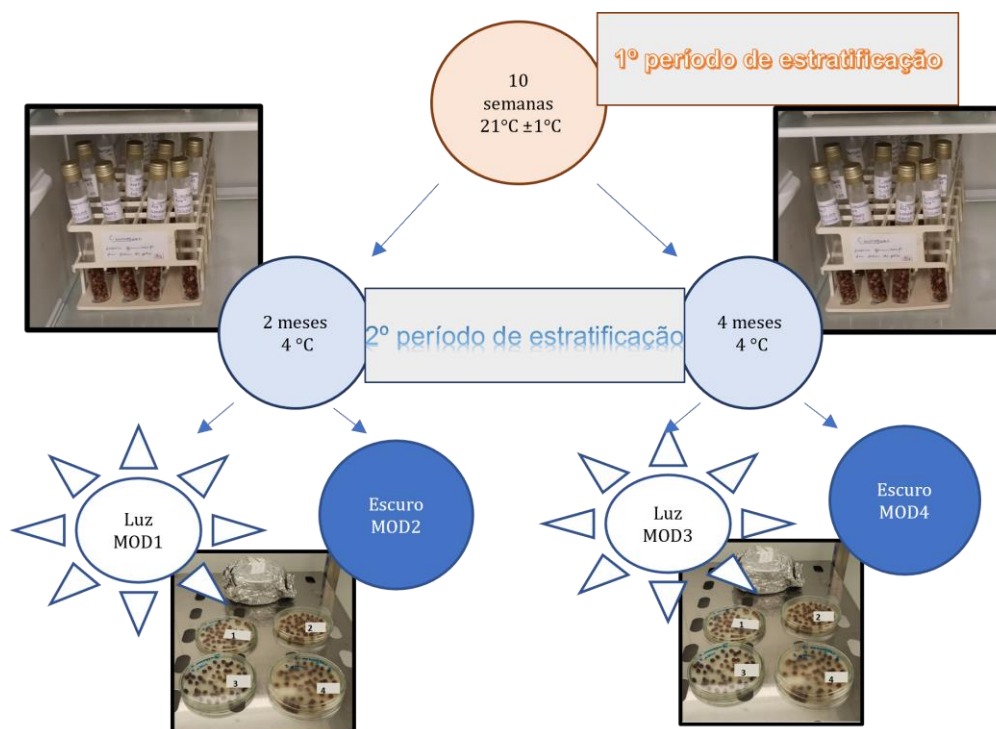


Figura 8 - Modalidades do ensaio de germinação em placa de Petri: MOD1, MOD2, MOD3 e MOD4.

### 4.2.3 Germinação em meio de cultura

Para este ensaio, definiram-se seis modalidades (Quadro 3) e os objetivos foram: avaliar o efeito de três fatores: período de conservação da semente, desinfetante utilizado no protocolo de desinfecção, remoção do endocarpo anterior ou posterior à desinfecção (para um dos desinfetantes em estudo). As sementes foram colocadas em tubos com meio de cultura

Murashige & Skoog (M&S) com 3 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP) e 1 mg/L de cinetina. Os explantes obtidos foram utilizados para a realização de um ensaio de multiplicação *in vitro*.

O protocolo de desinfeção utilizado faz parte deste relatório (Apêndice II).

**Quadro 3** - Modalidades do ensaio de germinação em meio de cultura.

Período de conservação	Desinfetante	Endocarpo ("casca")	Código
10 semanas	Hipoclorito de sódio	Remoção pré desinfeção	S10NaOCl
		Remoção pós desinfeção	S10CNaOCl
Sem período de conservação ("Sementes frescas")	Hipoclorito de sódio	Remoção pré desinfeção	SFNaOCl
		Remoção pós desinfeção	SFCNaOCl
10 semanas	Bicloreto de mercúrio	Remoção pós desinfeção	S10HgCl
Sem período de conservação ("Sementes frescas")		Remoção pós desinfeção	SFHgCl

### 4.3 Teste de tetrazólio

Sendo esta uma ferramenta eficaz para avaliar a viabilidade do embrião (Delgado, 2010), optou-se pela realização deste teste numa amostra de cada uma das modalidades em que não ocorreu germinação.

Este teste baseia-se na alteração que ocorre quando o corante incolor tetrazólio é reduzido e surge uma coloração avermelhada. Isto acontece quando a cadeia transportadora de eletrões da respiração celular está funcional (Delgado, 2010).

Estando já as sementes hidratadas, procedeu-se à remoção do endocarpo e do tegumento e, com ajuda de pinça e bisturi fez-se um corte longitudinal com máximo de cuidado para não danificar o embrião. Depois, as sementes foram colocadas em placas de Petri devidamente identificadas e submersas com solução de cloreto de tetrazólio 1%. Após o tempo de reação as sementes foram observadas à lupa para verificar se o embrião adquiriu a tonalidade avermelhada (indicador de viabilidade).

## 4.4. Propagação Vegetativa

### 4.4.1 Macropropagação

Com o objetivo de determinar a influência do tipo de estaca e da utilização ou não de reguladores de crescimento no sucesso da propagação vegetativa de *C. monogyna*, usaram-se estacas terminais e intermédias do exemplar existente na ESACB, coordenadas 39.821943, -7.455033 (Figura 9 a)), e herborizado no Herbário de Plantas aromáticas e medicinais (PAM) do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI).

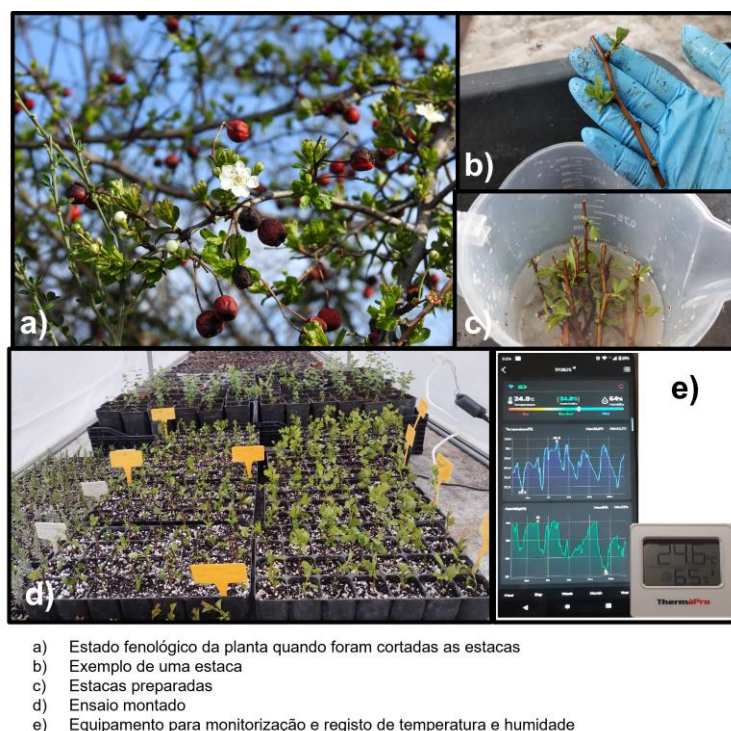
Cortaram-se estacas terminais e intermédias com pelo menos três nós. Eliminaram-se as folhas, deixando-se apenas duas ou três folhas terminais (Figura 9 b)) e depois colocou-se este material em água (Figura 9 c)). Definiram-se três modalidades:

- Modalidade 0 (testemunha) – estacas intermédias e terminais sem indutor de enraizamento;
- Modalidade 1- estacas terminais com indutor de enraizamento;
- Modalidade 2 - estacas intermédias com indutor de enraizamento.

Fizeram-se três repetições de 28 estacas para as modalidades 1 e 2 (Figura 9 d)).

O material de corte foi desinfetado com álcool etílico 70%, o indutor de enraizamento utilizado nas modalidades 1 e 2 foi o ácido indolbutírico (AIB) a uma concentração de 0,5%. As estacas foram colocadas em tabuleiros alveolares, preenchidos com mistura de substrato de germinação e perlite (2:1). Depois de preparados e identificados, os tabuleiros com as estacas ficaram na estufa do CBPBI, numa bancada aquecida e com rega por nebulização. Monitorizou-se a temperatura e humidade relativa com um sensor Thermopro® (Figura 9 e)).

Este ensaio teve início no dia 1 de março de 2024 e decorreu durante 70 dias. Nesta altura o exemplar já apresentava crescimento vegetativo e, inclusive algumas flores abertas.



**Figura 9** - Delineamento do ensaio de propagação vegetativa, Macropropagação.

#### 4.4.2 Micropropagação

Para o ensaio de micropropagação, foram usados explantes provenientes do ensaio de germinação em meio de cultura (Figura 10 a)). Estes foram colocados em meio de cultura M&S com 3mg/L de BAP e 1mg/L de cinetina (Figura 10 b)). Efetuaram-se quatro ciclos (de 30 dias) de multiplicação. No final, os parâmetros avaliados foram o número de novos rebentos, o

tamanho do maior e do menor rebento e a taxa de multiplicação, sendo esta obtida pelo número de novos rebentos gerados.

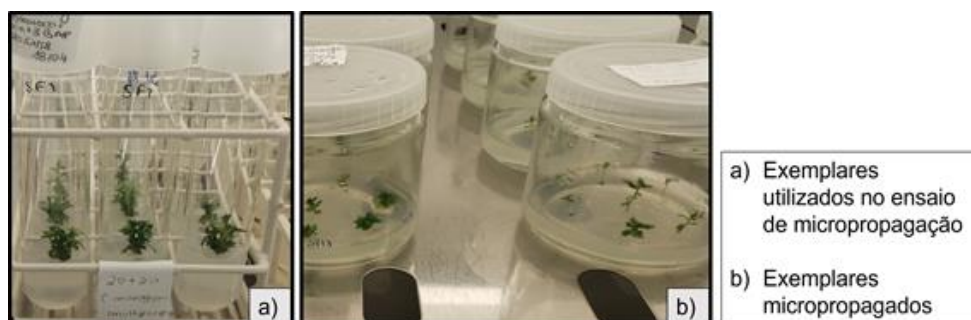


Figura 10 - Imagens do ensaio de micropropagação.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Propagação Seminal *ex vitro*

Desde o dia inicial do ensaio até ao final do período de estágio (28 dias), não ocorreu germinação em nenhuma das modalidades em estudo. Após o teste de tetrazólio foi possível contabilizar 80% de sementes viáveis no ensaio com perlite e 100% de sementes viáveis no ensaio com areia. Pôde verificar-se também, que o embrião ocupa a maioria da cavidade seminal, e que o endosperma envolve o embrião numa camada fina. Encontrando-se os embriões viáveis, a baixa capacidade de germinação só se pode dever a dormências existentes nesta espécie que, pelos estudos efetuados, tudo indica que as sementes desta espécie possuem dormência morfofisiológica (Baskin & Baskin, 2014).

Na Figura 11 a) pode-se observar a fase inicial do teste de tetrazólio; na Figura 11 b) podem ser visualizadas as sementes submersas na solução; na Figura 11 c) já é possível perceber a mudança de cor nas sementes na fase final do teste; na Figura 11 d) é bem visível a coloração avermelhada na semente, o que indica viabilidade do embrião e, na Figura 11 e) pode ser observada uma semente que não adquiriu a tonalidade avermelhada, o que indica inviabilidade.

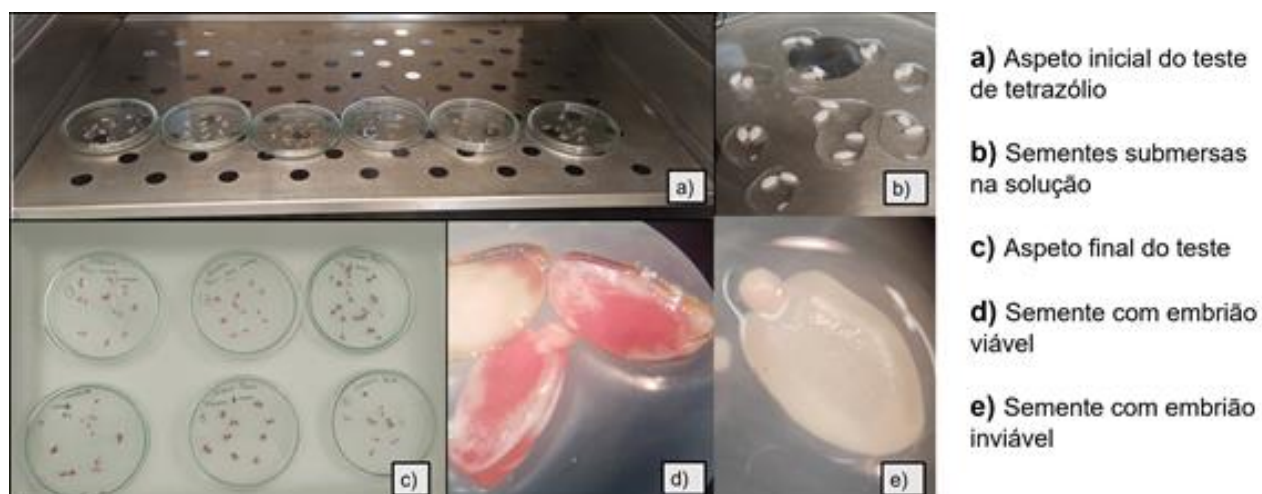


Figura 11 -Diferentes fases do ensaio do teste do tetrazólio.

## 5.2 Propagação Seminal *in vitro*

### 5.2.1 Germinação em placa de Petri

Até ao final deste ensaio, que teve a duração de 28 dias para as sementes que foram submetidas a quatro meses de estratificação e de 84 dias para as que foram submetidas a dois meses de estratificação, não foi observada germinação em nenhuma das modalidades estudada. No entanto, nas sementes que sofreram dois meses de estratificação a 4 °C, verificou-se a abertura do endocarpo (Figura 12): em média, em 24% daquelas cujo ensaio de germinação foi realizado em condições de obscuridade e, em média, em 13% das sementes cujo ensaio ocorreu na ausência de luminosidade.

Após o teste de tetrazólio verificou-se a existência de 100% de sementes viáveis em todas as modalidades exceto MOD1(dois meses de estratificação a 4°C e germinação em condições de luminosidade) que apresentou 90% de sementes viáveis.



Figura 12 - Sementes em que se verifica a abertura do endocarpo.

### 5.2.2 Germinação em meio de cultura

Neste ensaio existiu germinação em todas as modalidades em estudo. Para avaliar as diferenças entre estas, determinou-se a percentagem de germinação, o tempo de latência (período necessário para que as primeiras sementes germinem) e o tempo médio de germinação (TMG), calculado pela fórmula:  $TMG = \frac{N1T1+N2T2+\dots+NnTn}{N1+N2+\dots+Nn}$  (em que N1, N2, ..., Nn corresponde ao n.º de sementes germinadas no tempo T1, T2, ..., Tn)(Delgado, 2010).

As modalidades que tiveram maior percentagem de sementes germinadas foram: sementes frescas, sem casca, desinfetadas com NaOCl e sementes frescas, com casca, desinfetadas com NaOCl (conforme os códigos no Quadro 3), com 50% germinação. Nestas modalidades o período de latência foi de 5 dias (mais curto relativamente às outras) e foram também, as que apresentaram menor tempo médio de germinação (TMG), tendo as sementes frescas, sem casca, desinfetadas com NaOCl exibido um TMG de 11 dias e, para as sementes frescas, com casca, desinfetadas com NaOCl este período decorreu em 17 dias. Os dados relativos ao tempo de latência, TMG e percentagem de germinação podem ser observados no gráfico da Figura 13.

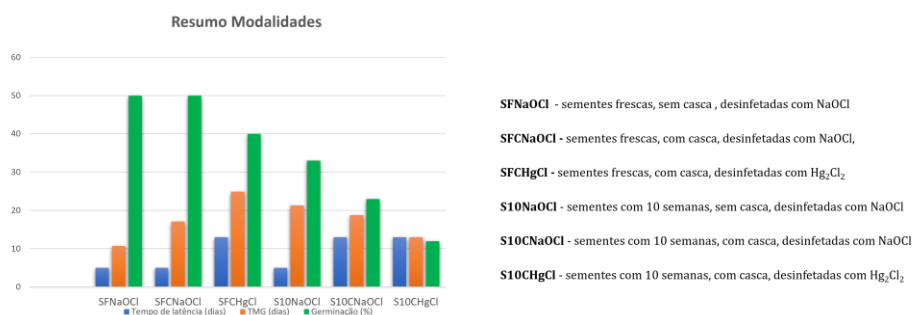
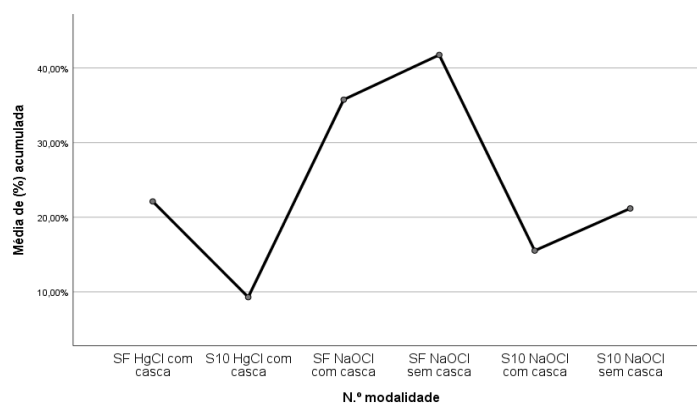


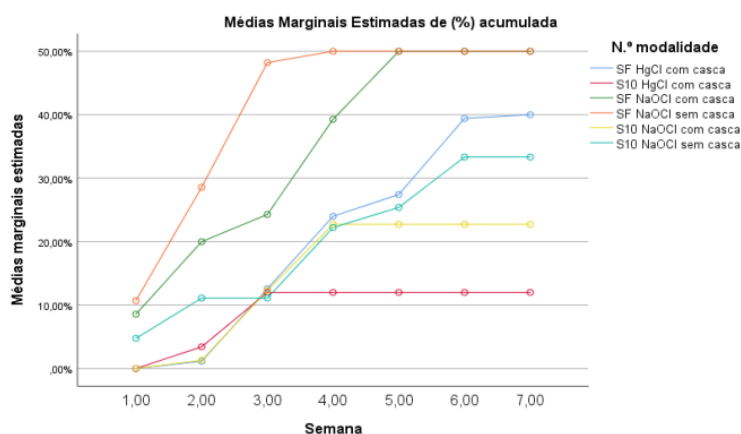
Figura 13 - Tempo de latência, tempo médio de germinação (TMG) e percentagem de germinação das modalidades em estudo.

Após a análise estatística dos resultados, foi possível concluir que existem diferenças significativas entre modalidades. No gráfico da Figura 14 é possível observar os valores médios da percentagem acumulada de germinação das diferentes modalidades, cuja comparação efetuada através da ANOVA, permitiu identificar diferenças significativas (para um nível de significância de 5 tendo sido as modalidades agrupadas em cinco grupos homogêneos, conforme o teste de comparações múltiplas de Scheffé (Apêndice III)). A modalidade S10CHgCl difere de todas as outras tendo a média de percentagem de germinação acumulada mais baixa, seguindo-se as modalidades de S10CNaOCl e S10NaOCl (estatisticamente iguais). A modalidade com maior capacidade de germinação e estatisticamente diferente de todas as outras, é SFNaOCl, tendo-se atingido um valor médio de 41,745%.



**Figura 14** - Gráfico com as médias de percentagem de germinação acumuladas entre as modalidades estudadas.

Em relação à germinação ao longo do tempo (Figura 15), observa-se que, na primeira semana, a capacidade germinativa é baixa em todas as modalidades. Nas semanas subsequentes, aumenta continuamente apresentando diferenças entre as modalidades. A partir da 6.ª semana já não há diferenças significativas.



**Figura 15** - Evolução das médias de germinação ao longo do tempo

A avaliação da capacidade germinativa (% acumulada) foi efetuada através da comparação entre as médias da % acumulada das seis modalidades, utilizando-se para o efeito o teste de Análise de Variância (ANOVA) com uma fonte de variação (modalidade), e com dois fatores

(modalidade e semanas) (Apêndice III). Os pressupostos de aplicação da ANOVA foram todos validados e em todos os testes foi utilizado um nível de significância de 5%.

Na Figura 16 exibem-se as fases iniciais de germinação e desenvolvimento de *C. monogyna* em meio de cultura.

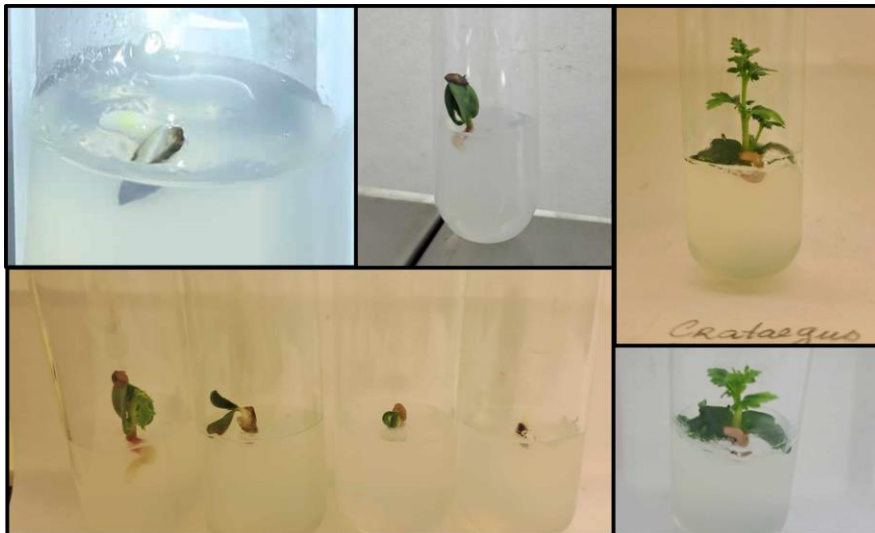


Figura 16 - Germinação e desenvolvimento inicial de *C. monogyna* em meio de cultura

## 5.3 Propagação Vegetativa

### 5.3.1 Macropropagação

No ensaio de macropropagação pode-se verificar que as estacas intermédias são favorecidas pelo tratamento com AIB 0,5% e que as estacas terminais não são favorecidas pelo mesmo tratamento. Nas estacas intermédias verificou-se a formação de *callus* quando se fez tratamento com AIB 0,5%, e no controlo (sem AIB) não existiu qualquer resposta. Nas estacas terminais a formação de *callus* ocorreu com e sem tratamento. Na Figura 17, pode ser observado o *callus* desenvolvido em estacas terminais e intermédias.



Figura 17 - Avaliação do ensaio de macropropagação, onde se pode verificar a presença de *callus* em estacas terminais e intermédias.

Relativamente à formação de raiz, esta não ocorreu em nenhuma das modalidades em estudo e foi verificada uma elevada mortalidade (superior a 90%) nos dois tipos de estacas.

### 5.3.2 Micropropagação

Foram efetuados 4 ciclos de multiplicação (aproximadamente 30 dias cada um) após a germinação inicial e fizeram-se duas avaliações. A primeira após três ciclos e a segunda passados 30 dias da primeira. Foram observados 30 explantes em cada avaliação (Figura 18).



Figura 18 - Exemplo de alguns explantes avaliados.

Entre a primeira e a segunda avaliação verifica-se um aumento do número médio de rebentos por explante, do comprimento médio do rebento maior, do total de rebentos e da taxa de multiplicação (Quadro 4).

Quadro 4 - Resumo de resultados das avaliações de multiplicação de *C. monogyna*

	1.ª Avaliação					2.ª Avaliação				
	Média	Desvio padrão	C. V. <sup>1</sup> (%)	Mín.	Máx.	Média	Desvio padrão	C. V. (%)	Mín.	Máx.
Nº de rebentos por explante	3,8	2,3	60,9	1,0	10,0	7,3	3,7	50,6	1,0	18,0
Comp. do maior rebento, (cm)	1,2	0,3	28,8	0,7	2,2	1,9	0,6	34,2	1,0	3,7
Comp. do menor rebento (cm)	0,6	0,2	26,5	0,4	1,0	0,5	0,1	30,7	0,3	1,0
Taxa de multiplicação	3,0	2,0	66,7	1,0	9,0	5,8	3,7	63,4	1,0	14,0

## 6. Considerações finais

No âmbito das metodologias de propagação seminal e vegetativa efetuadas nestes estudos poderemos considerar alguns aspetos relevantes para a preservação e /ou melhoramento da espécie *Crataegus monogyna*.

<sup>1</sup> O coeficiente de variação, C.V. (%) = (desvio padrão/média) × 100 mede a dispersão relativa dos valores observados. Valores superiores a 30% indicam grande dispersão.

As sementes frescas, isto é, as sementes do ano, que são colhidas e colocadas de imediato a germinar, sem período de armazenamento, apresentam maior capacidade germinativa. Por outro lado, as sementes que são conservadas vão acumulando dormência morfofisiológica, o que permite à espécie sobreviver a condições adversas e possibilita a germinação quando as condições são favoráveis. Isto foi possível observar nos ensaios de germinação *ex vitro* e em placa de Petri, pois que, ao serem submetidas ao teste de tetrazólio se verificou que, apesar de não ter ocorrido germinação, as sementes mantinham o embrião vivo, portanto, com viabilidade para a germinação. Estes resultados estão de acordo com Kheloufi *et al.*, 2019.

Sem trabalhos de melhoramento, que permitam a quebra da dormência, as sementes desta espécie não devem ser comercializadas em casas de semente pelos obstáculos observados na germinação em sementes conservadas.

No que diz respeito à germinação em meio de cultura, esta metodologia revelou-se eficaz na quebra de dormência ocorrendo germinação na primeira semana de ensaio. Resultados semelhantes foram obtidos por Dinçer *et al.*, 2023. No entanto, nos ensaios levados a cabo no presente trabalho, o tegumento não foi removido como em Dinçer *et al.*, 2023, pois não foi encontrado um método que não danificasse a semente. Apesar disso, obteve-se sucesso na germinação, o que levanta questões sobre a necessidade deste processo.

No que se refere à propagação vegetativa da espécie, destaca-se a vantagem das técnicas de micropropagação, tanto em termos de sucesso na produção de novas plantas, como na rapidez com que é possível obter um grande número de novas plantas. Os resultados obtidos nesta metodologia de propagação, são coerentes com os obtidos por Dinçer *et al.*, 2023.

Durante o período em que decorreu o ensaio de propagação vegetativa – macropropagação, existiram picos de temperatura (mínimas de 9 °C e máximas de 31 °C, dados que podem ser consultados no apêndice IV) que poderão ter influenciado os resultados. O fato de o exemplar já estar em início de floração é outro fator que pode ter tido impacto. Ensaios com a espécie noutro estado fenológico poderão levar a resultados diferentes. De qualquer forma, a dificuldade nesta metodologia de propagação está de acordo com Dinçer *et al.*, 2023.

Mais uma vez estes resultados alertam-nos para a importância da preservação desta espécie e da possibilidade de efetuar futuros estudos de melhoramento para que, os fatores que afetam a propagação seminal, bem como a propagação vegetativa possam ser ultrapassados. Por outro lado, estudos de propagação em diferentes épocas do ano, poderão vir a otimizar esta tecnologia que é mais praticável por viveiristas.

## 7. Referências bibliográficas

- Awotedu, B. F., Omolola, T. O., Akala, A. O., Awotedu, O. L., & Olaoti-Laaro, S. O. (2021). *Vegetative Propagation: A Unique Technique of Improving Plants Growth*.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2014). *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination* (Second edition). Elsevier/AP.
- Catry, F. X., Rego, F. C., Bugalho, M. N., Lopes, T., Silva, J. S., & Moreira, F. (2006). Effects of fire on tree survival and regeneration in a Mediterranean ecosystem. *Forest*

- Ecology and Management*, 234, S197.  
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.08.316>
- Delgado, F.M.G. (2010) *Conservação e Valorização de Asphodelus Bento-rainhae P. Silva e Lavandula luisieri (Rozeira) Rivas-Martínez da Beira Interior*. Ph.D. Thesis, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal
- Dinçer, D., Bekiryazıcı, F., Dünder, H., & Ögçe, H. (2023). Germination and Micropropagation of *Crataegus monogyna* Jacq. Seeds by Tissue Culture Method. *Forest Science*, 69(2), 178–186.  
<https://doi.org/10.1093/forsci/fxac051>
- Fichtner, A., & Wissemann, V. (2021). Biological Flora of the British Isles: *Crataegus monogyna*. *Journal of Ecology*, 109(1), 541–571.  
<https://doi.org/10.1111/1365-2745.13554>
- Género *Crataegus* | *Flora Ibérica* (sem data). Obtido em 10 de junho de 2024, de [http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/06\\_087\\_22%20Crataegus.pdf](http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/06_087_22%20Crataegus.pdf)
- Género *Crataegus* | *Flora-On Portugal Continental*. (sem data). Obtido em 10 de junho de 2024, de <https://flora-on.pt/?q=Crataegus>
- Género *Crataegus* | *GBIF*. (sem data). Obtido em 10 de junho de 2024, de [https://www.gbif.org/occurrence/map?taxon\\_key=9220780&occurrence\\_status=present](https://www.gbif.org/occurrence/map?taxon_key=9220780&occurrence_status=present)
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. L. (2014). *Hartmann & Kester's Plant Propagation Principles and Practices* (Eight Edition). Pearson.
- Kheloufi A, Mansouri LM, Vanbellinghen C (2019) Seed germination of *Crataegus monogyna* – a species with a stony endocarp. *Reforesta* 7: 73-80. DOI: <http://dx.doi.org/10.21750/REFOR.7.06.68>
- Martinelli, F.; Perrone, A.; Yousefi, S.; Papini, A.; Castiglione, S.; Guarino, F.; Cicatelli, A.; Aelaei, M.; Arad, N.; Gholami, M.; et al. Botanical, Phytochemical, Anti-Microbial and Pharmaceutical Characteristics of Hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.), Rosaceae. *Molecules* 2021, 26, 7266.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26237266>
- Maroco J., (2011) *Análise Estatística com o SPSS statistics* (5ª Edição). ISBN 978-989-96763-2-9
- SPSS, 2021. IBM Corp. Released 2021. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0. Armonk, NY: IBM Corp



## Apêndice II - Protocolo de germinação *in vitro* de *Crataegus monogyna*

07-02-2024

Meio de cultura:

MS+vit 000+ 3 mg/L BAP+ 1mg/L cinetina, pH=5,7-5,8, ágar=6,5 g/L, sacarose=30g/L;

10 mL de meio/tubo

Lotes de sementes:

70 sementes frescas (SF)

70 sementes 10 semanas (S10)

Tratamentos de desinfecção:

- Passagem em água corrente durante 20 minutos (colocar as sementes em coadores devidamente separadas e identificadas);

- Na CFL, permanência durante 30 segundos em álcool a 70%, nas sementes em que foi removida a cápsula reduziu-se o tempo para 15 seg;

- Seguido de 15 min em NaOCl 3%, com 2 gotas de tween 20, nas sementes em que foi removida a cápsula reduziu-se o tempo para 7 minutos;

- Para testar outro agente desinfetante, substituir a permanência em NaOCl pela permanência em bicloreto de mercúrio (250 mg/L) durante 5 minutos (apenas as sementes com cápsula);

- Passagem por água esterilizada 3 x durante 3 min (1 min por cada passagem).

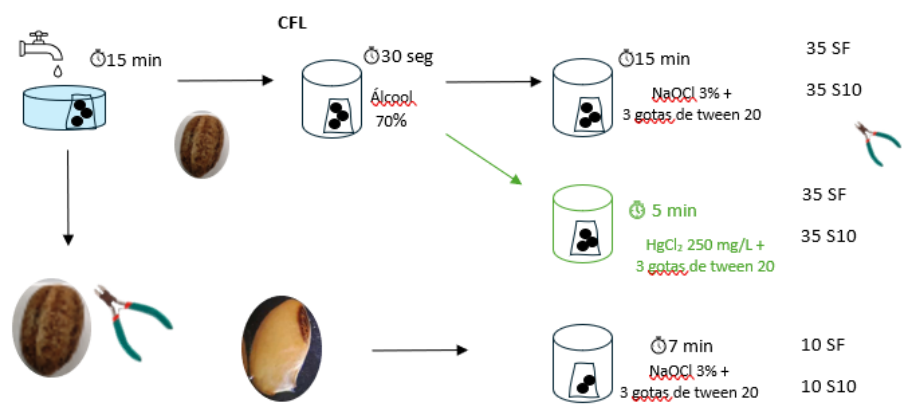
Notas:

- As sementes foram todas submetidas ao 1º passo de 20 minutos em água corrente, separam-se 10 sementes de cada lote (SF e S10) para a remoção da cápsula antes do processo de desinfecção. As restantes foram sujeitas ao processo de desinfecção com a cápsula.

- As sementes foram quebradas com alicate esterilizado;

- As sementes foram colocadas no meio de cultura de forma vertical com a protuberância submersa o meio (Figura abaixo).





## Apêndice III - Comparação de modalidades através do teste da ANOVA

**Quadro 5** - ANOVA uni fatorial, para avaliação de diferenças das 6 modalidades entre si (apenas um fator: modalidade)

ANOVA					
(% ) acumulada					
	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Entre Grupos	39889,811	5	7977,962	47,786	0,000
Nos grupos	52089,428	312	166,953		
Total	91979,240	317			

**Quadro 6** - Teste de comparações múltiplas de Scheffé com as modalidades agrupadas em cinco grupos homogêneos

Scheffe <sub>a,b</sub>						
(% ) acumulada						
Modalidade	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
S10CHgCl com casca	53	9,283%				
S10CNaOCl com casca	53		15,523%			
S10 NaOCl sem casca	53			21,1744%		
SF HgCl com casca	53			22,113%		
SF NaOCl com casca	53				35,755%	
SF NaOCl sem casca	53					41,745%
Sig.		1,000	1,000	0,878	1,000	1,000

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.  
Com base em médias observadas.  
O termo de erro é Quadrado Médio (Erro) = 13,142.  
a. Usa o Tamanho da Amostra de Média Harmônica = 53,000.  
b. Alfa = 0,05.

**Quadro 7** - ANOVA bi fatorial para avaliação do efeito do tempo em conjunto com as seis modalidades

<b>Testes de efeitos entre sujeitos</b>					
Variável dependente: (%) acumulada					
Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Modelo	275596,057 <sup>a</sup>	42	6561,811	499,302	0,000
N.ºmodalidade	37869,330	5	7573,866	576,311	0,000
Semana	39829,300	6	6638,217	505,116	0,000
N.ºmodalidade * Semana	8632,943	30	287,765	21,897	0,000
Erro	3627,185	276	13,142		
Total	279223,242	318			
a. R Quadrado = ,987 (R Quadrado Ajustado = ,985)					

Apêndice IV - Variação de temperatura e humidade registadas com o sensor Termopro®

