

Germinação *in vitro* de sementes de framboesa e camarinha

Carolina Isabel Diogo Mendes

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadores: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Doutora Maria Teresa Moreira Valdiviesso

Júri:

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

Vogais: Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutor Pedro Nogueira Brás de Oliveira, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária;

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

Agradecimentos

A escrita desta dissertação foi uma das fases mais desafiantes, mas também mais enriquecedoras da minha vida, com muitos obstáculos, conquistas e também decisões importantes. Nada disto seria possível sem o apoio e ajuda incondicional das pessoas à minha volta, o meu muito obrigada a todos quanto, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização desta última etapa para a obtenção do grau de mestre.

À Professora Doutora Mariana Mota, orientadora desta dissertação, pelo constante exemplo de resiliência, dedicação, carinho, disponibilidade e respeito. Por me mostrar que, neste longo caminho que é a vida, nem quando confrontados com grandes obstáculos, podemos perder a esperança, força e motivação. O meu enorme obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não o fazia, pela amizade e por todas as palavras carinhosas e motivadoras que me transmitiu ao longo deste percurso, a professora foi imprescindível para a conclusão desta etapa.

À Doutora Maria Teresa Moreira Valdivieso, orientadora desta dissertação, pela disponibilidade, pela partilha de conhecimento, pelo apoio, dedicação e amizade ao longo deste percurso e pelo empenho e rigor na supervisão deste trabalho.

Ao Programa de Melhoramento de Framboesa, ao INIAV, I.P. (Oeiras) e a todos os seus colaboradores, agradeço a oportunidade e pronta ajuda, que permitiram a realização deste trabalho.

A todos os colaboradores e alunos do ISA que, de uma forma ou de outra, me ajudaram na realização dos ensaios, sempre com uma enorme simpatia, em especial à D. Nídia, que foi uma excelente ajuda e companhia nos meus dias na faculdade, o meu muito obrigada.

A todos os meus amigos e colegas, o meu muito obrigada pela sua valiosa ajuda e apoio moral nesta etapa. Sentir que não estava sozinha foi essencial para manter a motivação e foco.

Um enorme obrigada à minha família, por estarem sempre lá para mim, nos dias bons e maus, por me apoiarem em todas as decisões que tomo, por me ajudarem e me proporcionarem a oportunidade de avançar e concluir mais uma etapa da minha vida académica. Em especial, ao meu avô, que sempre me incentivou a correr atrás dos meus sonhos, oferecendo a sua ajuda e apoio incondicional, mesmo quando não lhe competia. Espero que esteja orgulhoso da sua agrónoma.

Por fim, um obrigada especial ao Gonçalo que foi, como sempre é, imprescindível em mais uma etapa da minha vida, que me apoiou incondicionalmente, que tinha sempre a palavra certa e um abraço apertado para me confortar e motivar nos dias menos bons, que me ajudou no desenvolvimento do meu trabalho e que, nem por um segundo, duvidou que eu seria capaz.

Resumo

O programa de melhoramento de framboesa (*Rubus idaeus* L.) e camarinha (*Corema album* L.) conduzido pelo INIAV assenta no desenvolvimento de métodos eficazes para a germinação de sementes, tendo os trabalhos anteriores, baseando-se na germinação *in vivo*, apresentado taxas de germinação muito baixas. Este trabalho procura assim estabelecer uma nova abordagem de germinação de sementes que garanta taxas mais elevadas, com base na germinação *in vitro*. Testaram-se dois tipos de sementes de framboesa, conservadas a frio e frescas, e sementes conservadas de camarinha, diferentes formas de pré-tratamento da semente/embrião, condições de desinfecção pré-instalação, meio de cultura de germinação (QL e MM, com e sem sacarose) e de aclimatização (MS suplementado com BAP, vários substratos). Em framboesa conservada, o método de desinfecção mais promissor recorreu à solução de desinfecção combinada com aplicação de fungicida, permitindo obter 75,9% de germinação, tendo-se conseguido uma taxa de germinação média de 97,6% com o meio de cultura QL. Na framboesa fresca, os resultados obtidos foram inferiores, na variedade Clarita obteve-se 55,5% de germinação para o meio QL, enquanto a variedade 8F471 obteve com o meio MM uma taxa de germinação máxima de 48,7%. A camarinha conservada obteve os piores resultados nos ensaios de germinação, com um máximo de 37,4% de sementes germinadas para o meio MM.

Nos ensaios relativos à aclimatização, a framboesa conservada revelou resultados semelhantes na aclimatização sequencial (passagem por MS suplementado com BAP antes do substrato *ex vitro*) e na transferência direta para substrato turfa/perlite (cerca de 25%). A framboesa fresca foi aclimatizada de forma sequencial tendo-se obtido, para a variedade 8F471, uma taxa de viabilidade final de 38,7% para o meio MS em frasco. Para a variedade Clarita, da framboesa fresca, e a camarinha conservada, não se obtiveram plântulas viáveis no fim da aclimatização, devido a contaminações precoces.

Palavras-chave: *Corema album*, *Rubus idaeus*, dormência das sementes, propagação seminal *in vitro*, sementes conservadas.

Abstract

The raspberry (*Rubus idaeus* L.) and portuguese crowberry (*Corema album* L.) breeding program conducted by INIAV is based on the development of effective methodologies for seed germination. Previous studies, based on *in vivo* germination, obtained very low germination rates, therefore this work aims to establish a new approach towards seed germination, based on *in vitro* germination, that enables higher rates. Dry and fresh raspberry seeds and dry crowberry seeds were tested, as well as different seed/embryo pretreatments, pre-installation disinfection conditions, germination culture medium (QL and MM, with and without sucrose), and acclimatization conditions (MS supplemented with BAP, various substrates). In the dry raspberry seeds, the most promising disinfection method was the disinfection solution combined with fungicide application, which obtained global germination rates of 75,9%, having achieved an average germination rate of 97,6% with the QL culture medium. In the fresh raspberry seeds, the obtained results were lower, in the Clarita variety it was obtained 55,5% of germination for the QL medium, while the 8F471 variety obtained, with the MM medium, a maximum germination rate of 48,7%. The dry crowberry seeds got the worst results in the germination tests, with a maximum of 37,4% of seeds germinated for the MM medium.

In the acclimatization tests, the dry raspberry seeds presented similar results in the sequential acclimatization (passage through MS supplemented with BAP before the *ex vitro* substrate) and in direct transfer to peat/perlite substrate (about 25%). The seedlings derived from the fresh raspberry seeds, sequentially acclimatized, for the 8F471 variety, obtained a final viability rate of 38,7% for the MS medium in a flask. For the Clarita variety of fresh raspberry seeds and dry crowberry seeds, no viable seedlings were obtained at the end of the acclimatization assay, due to early contaminations.

Keywords: *Corema album*, *Rubus idaeus*, seed dormancy, *in vitro* seminal propagation, preserved cold seeds.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice	v
Índice de figuras.....	viii
Índice de quadros	xi
Abreviaturas, acrónimos, siglas e símbolos.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1 A espécie <i>Rubus idaeus</i>	4
2.1.1. Distribuição geográfica	5
2.1.2. Interesse para a agricultura em Portugal	5
2.2 A espécie <i>Corema album</i>	6
2.2.1. Distribuição geográfica	7
2.2.2. Interesse para a agricultura em Portugal	7
2.3 A semente	8
2.3.1. Reservas nutritivas da semente	9
2.4 Germinação da semente	9
2.4.1. Fatores que afetam a germinação	10
2.4.2. Dormência da semente	11
2.5 Germinação <i>in vitro</i>	13
2.5.1. Preparação do material vegetal	13
2.5.2. Meio de cultura.....	15
2.5.3. Condições de cultura	18
2.5.4. Aclimatização.....	19
3. Material e métodos	22
3.1 Material vegetal em estudo	22
3.2 Meio de cultura.....	22

3.3	Preparação do material vegetal	23
3.3.1.	Pré-tratamento	23
3.3.2.	Desinfecção superficial	24
3.4	Sementeira em placas de Petri.....	25
3.5	Aclimatização.....	26
3.6	Ensaio realizados	26
3.6.1.	Germinação das sementes	26
3.6.2.	Aclimatização.....	29
3.7	Medições	34
3.8	Tratamento estatístico	36
4.	Resultados e discussão	37
4.1	Germinação das sementes de framboesas conservadas.....	37
4.1.1.	Efeitos da preparação do material vegetal na germinação	38
4.1.2.	Efeito do meio de cultura na germinação.....	42
4.2	Germinação das sementes de framboesas frescas	44
4.2.1.	Efeitos da preparação do material vegetal na germinação	45
4.2.2.	Efeito do meio de cultura na germinação.....	46
4.2.3.	Efeito da variedade utilizada nos ensaios.....	49
4.3	Efeito do estado de conservação do material vegetal na germinação	52
4.4	Germinação das sementes de camarinha.....	55
4.4.1.	Efeitos da preparação do material vegetal na germinação	55
4.4.2.	Efeito do meio de cultura na germinação.....	56
4.5	Aclimatização.....	58
4.5.1.	Transferência sequencial de meio <i>in vitro</i> para <i>ex vitro</i>	60
4.5.2.	Transferência direta de meio <i>in vitro</i> para <i>ex vitro</i>	65
5.	Conclusões e perspectivas.....	69
6.	Referências bibliográficas	A
7.	Anexos.....	A
7.1	Dimensões do material vegetal	A
7.2	Elaboração dos meios de cultura para os ensaios realizados	A
7.2.1.	Protocolo para preparação das soluções stock	A

7.2.2.	Protocolo para preparação do meio de cultura	C
7.3	Germinação de sementes de framboesa conservada	E
7.4	Germinação de sementes de framboesa fresca	F
7.5	Efeito da variedade de framboesa fresca na germinação	H
7.6	Efeito do estado de conservação da framboesa na germinação	H
7.7	Germinação de sementes de camarinha	I
7.8	Aclimatização	I
7.9	Artigo “Germinação <i>in vitro</i> de <i>Rubus idaeus</i> L.”	M

Índice de figuras

Figura 1 – Frutos de <i>Rubus idaeus</i> L.	4
Figura 2 – Distribuição de <i>Rubus idaeus</i> L., em Portugal (GPP, 2006).	5
Figura 3 – Frutos de <i>Corema album</i> L.	6
Figura 4 – Distribuição de <i>Corema album</i> L. (Marques, 2007).	7
Figura 5 – Corte da semente, transversal ao eixo embrionário. Semente de framboesa (a) e semente de camarinha (b).	24
Figura 6 – Caixa de bigodes relativa às taxas de germinação das sementes de framboesa conservada em função da solução de corte utilizada: água (a), ácido ascórbico (b) e fungicida (c).	39
Figura 7 – Percentagem de placas em ensaio com sementes contaminadas, em função do método de desinfecção utilizado em sementes de framboesa conservada.	41
Figura 8 – Taxa de germinação média (em %) ao longo do ensaio 1, em função do meio de cultura. Os registos para o ensaio com o meio QL iniciaram-se no dia 29/4, com o meio QL _S e QL _{SA} no dia 12/7 e com o meio MM _S no dia 13/9.	43
Figura 9 – Percentagem de placas em ensaio com contaminação de sementes, para cada meio de cultura em estudo, em framboesa fresca da variedade 8F471.	47
Figura 10 – Taxa de germinação média (em %) ao longo do ensaio 2 para framboesa fresca da variedade Clarita, em função do meio de cultura. Os registos para o ensaio com o meio QL _S e MM _S iniciaram-se no dia 8/11.	48
Figura 11 – Taxa de germinação média (em %) ao longo do ensaio 2 para framboesa fresca em função das variedades, para o meio QL _S (a) e para o meio MM _S (b).	50
Figura 12 – Percentagem de placas contaminadas para cada variedade em estudo no ensaio 2 no meio de cultura MM _S (a) e o meio de cultura QL _S (b).	51
Figura 13 – Taxa de germinação média (em %) ao longo do ensaio para a variedade Clarita de framboesa fresca e do ensaio 4 para a framboesa conservada, para o meio MM _S (a) e para o meio QL _S (b).	53
Figura 14 – Número de placas em ensaio com e sem contaminação de sementes, para a variedade Clarita de framboesa fresca e do ensaio 4 para framboesa conservada, para o meio de cultura MM _S (a) e o meio de cultura QL _S (b).	54

Figura 15 – Taxa de germinação média (em %) ao longo ensaio 3 relativo à camarinha, em função do meio de cultura. Os registos para o ensaio iniciaram-se para o meio MMs dia 15/11 e para o meio QLS dia 22/11.	57
Figura 16 – Sementes germinadas no ensaio 1 (a), plântulas com folhas cotiledonares, no fim da fase 1 de aclimatização (b) e plântulas com folhas verdadeiras, no fim da fase 2 da aclimatização, em frasco (c) e em tubo individual (d), para framboesa conservada.....	59
Figura 17 – Plântulas de framboesa conservada transferidas da segunda fase do ensaio 5.1, submetidas a condições ambientais mais próximas às <i>ex vitro</i> , ao fim das duas semanas de observação.	60
Figura 18 – Número de explantes viáveis na fase 1 (a) e na fase 2 (b) da aclimatização do ensaio 5.1 para a framboesa conservada.	61
Figura 19 – Número de placas contaminadas para cada meio de cultura estudado no ensaio 5.1 para a framboesa conservada, na fase 1 (a) e na fase 2 (b) da aclimatização.	62
Figura 20 – Número de explantes viáveis na fase 1 (a) e na fase 2 (b) da aclimatização do ensaio 5.1 para a variedade 8F471 de framboesa fresca.	64
Figura 21 – Número de explantes viáveis para cada meio de aclimatização (a) e para cada meio de humedecimento (b) testados na aclimatização do ensaio 5.2 de framboesa conservada....	66
Figura 22 – Dimensões da semente de camarinha (a) e da semente de framboesa (b).	A
Figura 23 – Comparação entre a semente de camarinha e framboesa, a nível de dimensões. .	A
Figura 24 – Percentagem de placas em ensaio eliminadas por contaminação, em função do método de desinfeção utilizado em sementes de framboesa conservada.	E
Figura 25 – Placa com sementes contaminadas (contaminações isoladas) (a) e placa contaminada (eliminada por essa razão) (b), respeitante ao ensaio 1 de framboesa conservada.	F
Figura 26 – Percentagem de placas em ensaio, da variedade 8F471, com sementes contaminadas.	G
Figura 27 – Taxa de germinação média (em %) ao longo do ensaio 2 para framboesa fresca da variedade 8F471, em função do meio de cultura. Os registos para o ensaio com o meio QLS iniciaram-se no dia 25/10 e com o meio MMs no dia 18/10.	G
Figura 28 – Condições de testagem para as plântulas provindas da segunda fase do ensaio 5.1. As plântulas foram dispostas, numa caixa plástica fechada (com furos para entrada de oxigénio), em substrato turfa/perlite sendo, posteriormente, colocadas em suporte plástico onde se procedeu à colocação do meio de cultura para humedecimento.	I

-
- Figura 29** – Placa de Petri com estruturas germinadas de framboesa conservada contaminadas, na fase 1 do ensaio 5.1 (a) e plântula de framboesa conservada contaminada, em tubo de ensaio, na fase 2 do ensaio 5.1 (b).....J
- Figura 30** – Testagem da transferência de sementes germinadas diretamente para substrato (condição próxima à *ex vitro*) em placa de Petri fechada (a) e em cuvete plástica coberta (b).
- Figura 31** – Número de placas contaminadas para cada meio de cultura estudado no ensaio 5.1, para a variedade 8F471 de framboesa fresca, na fase 1 (a) e na fase 2 (b) da aclimatização. .. K
- Figura 32** – Contaminação de sementes germinadas na fase 1 do ensaio 5.1, para a camarinha conservada. K
- Figura 33** – Número de frascos contaminados para cada meio de aclimatização (a) e para cada meio de humedecimento (b) estudado no ensaio 5.2 para a framboesa conservada.L

Índice de quadros

Quadro 1 – Tratamentos realizados no ensaio 1, com sementes de framboesa conservada, em meio de cultura QL, com e sem sacarose, e em meio de cultura MM sem sacarose.	27
Quadro 2 – Tratamentos efetuados no ensaio 2, para sementes de framboesa fresca, de duas variedades distintas, a 8F471 (ensaio 2.1) e a Clarita (ensaio 2.2), em meio de cultura QLs e meio de cultura MM _s	28
Quadro 3 – Tratamentos efetuados no ensaio 3, com sementes de camarinha conservada, em meio de cultura MM _s (ensaio 3.1) e em meio de cultura QL _s (ensaio 3.2).	28
Quadro 4 – Tratamentos efetuados no ensaio 4, com sementes de framboesa conservadas, em meio de cultura MM _s (ensaio 4.1) e em meio de cultura QL _s (ensaio 4.2).	29
Quadro 5 – Modalidades testadas na primeira fase da aclimatização do ensaio 5.1 para a framboesa conservada.	30
Quadro 6 – Modalidades testadas na segunda fase da aclimatização do ensaio 5.1 para a framboesa conservada.	30
Quadro 7 – Modalidades testadas na primeira e segunda fase da aclimatização do ensaio 5.1 para a variedade 8F471 de framboesa fresca.	31
Quadro 8 – Modalidades testadas na primeira fase da aclimatização do ensaio 5.1 para a variedade Clarita de framboesa fresca.	32
Quadro 9 – Modalidades testadas na primeira fase da aclimatização do ensaio 5.1 para a camarinha conservada.	32
Quadro 10 – Modalidades testadas na fase de aclimatização do ensaio 5.2 para a framboesa conservada.	34
Quadro 11 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização de cada método de desinfecção testado no ensaio 1, com framboesa conservada.	40
Quadro 12 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada meio de cultura testado no ensaio 1, com framboesa conservada.	42
Quadro 13 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada meio de cultura testado no ensaio 3 relativo à camarinha.	56

- Quadro 14** – Concentrações necessárias à preparação dos meios de cultura em estudo, segundo bibliografia consultada. B
- Quadro 15** – Concentrações relativas às soluções stock e à quantidade utilizada para 1 L de meio de cultura, de macro e micro nutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, para cada meio testado..... D
- Quadro 16** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada solução de corte no ensaio 1 relativo à framboesa conservada.....E
- Quadro 17** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada meio de cultura testado no ensaio 4, com framboesa conservada.....F
- Quadro 18** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada método de escarificação mecânica testado no ensaio 2, com framboesa fresca da variedade Clarita. F
- Quadro 19** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada meio de cultura testado no ensaio 2, com framboesa fresca da variedade 8F471.F
- Quadro 20** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada meio de cultura testado no ensaio 2, com framboesa fresca da variedade Clarita..... G
- Quadro 21** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada variedade de framboesa fresca testada no ensaio 2, para o meio de cultura QL_s. H
- Quadro 22** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada variedade de framboesa fresca testada no ensaio 2, para o meio de cultura MM_s. H
- Quadro 23** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização respeitantes a cada estado de conservação estudado para a framboesa, no meio MM_s. H
- Quadro 24** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização respeitantes a cada estado de conservação estudado para a framboesa, no meio QL_s..... H

-
- Quadro 25** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização respeitantes à solução de hidratação do pré-tratamento estudada para a camarinha.....I
- Quadro 26** – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada método de desinfeção testado para a camarinha.I
- Quadro 27** – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de cultura em estudo na fase 1 da aclimatização (ensaio 5.1) para a framboesa conservada.....I
- Quadro 28** – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de cultura em estudo na fase 2 da aclimatização (ensaio 5.1) para a framboesa conservada.....J
- Quadro 29** – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de cultura em estudo na fase 1 da aclimatização (ensaio 5.1) para a variedade 8F471 de framboesa fresca.....J
- Quadro 30** – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de cultura em estudo na fase 2 da aclimatização (ensaio 5.1) para a variedade 8F471 de framboesa fresca.....J
- Quadro 31** – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de aclimatização em estudo no ensaio 5.2 para a framboesa conservada.L
- Quadro 32** – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de cultura para humedecimento em estudo no ensaio 5.2 para a framboesa conservada.....L

Abreviaturas, acrónimos, siglas e símbolos

AA	Ácido ascórbico
ABA	Ácido abscísico
Ads	Hemisulfato de adenina
BAP	6-benzilaminopurina
CTC	Capacidade de troca catiónica
IAA	Ácido indolacético
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
GA₃	Ácido giberélico
QL	Quoirin & Lepoivre (1977)
QL_S	Meio de cultura QL sem adição de sacarose
QL_{SA}	Meio de cultura QL sem adição de sacarose e agar
MM	Murashige & Miller (1976)
MM_A	Meio de cultura MM sem adição de agar
MM_S	Meio de cultura MM sem adição de sacarose
MM_{SA}	Meio de cultura MM sem adição de sacarose e agar
MS	Murashige & Skoog (1962)
MS₁	Meio de cultura MS em placa de Petri
MS₂	Meio de cultura MS em tubo de ensaio
MS₃	Meio de cultura MS em frasco
Nº	Número
rpm	Rotações por minuto
2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético

1. Introdução

A espécie *Rubus idaeus* L., vulgarmente designada por framboesa vermelha, é uma espécie inserida na família Rosaceae, na ordem Rosales, no género *Rubus* e subgénero *Idaeobatus*, que engloba cerca de 200 espécies sendo a mais comum, no continente europeu, a *Rubus idaeus* L. (Funt & Hall, 2013). Esta espécie está dispersa um pouco por todo mundo, no entanto a sua distribuição encontra-se mais centrada na Europa, Ásia e América do Norte. Atualmente, Portugal é um dos países emergentes na produção deste pequeno fruto, sendo a sua produção destinada sobretudo para o mercado externo (Funt & Hall, 2013; Graham & Woodhead, 2011; Oliveira & Fonseca, 2007).

A espécie *Corema album* L., comumente designada por camarinha ou camarinheira, é uma espécie endémica das dunas da costa atlântica da Península Ibérica. Esta espécie insere-se na subfamília Ericoideae, na família Ericaceae e na ordem Ericales apresentando duas subespécies, subsp. *azoricum* e a subsp. *album* (Oliveira & Dale, 2012).

As duas espécies em estudo pertencem ao grupo dos pequenos frutos uma vez que se incluem sob este nome genérico todos os frutos pequenos de tamanho (“small fruits”) que possuem polpa branda (“soft fruits”), normalmente de forma redonda que se destinam a serem consumidos em fresco, independentemente da estrutura do fruto (Oliveira & Fonseca, 2007).

Ao longo das décadas, o grupo dos pequenos frutos tem vindo a despertar um elevado interesse agronómico resultante da sua expansão no mercado, isto deve-se a diversos fatores como o aumento da sua disponibilidade para o mercado em fresco por períodos mais extensos, o melhoramento da qualidade dos frutos, bem como a perceção por parte do consumidor dos benefícios que estes têm na saúde (Barney et al., 2007; Graham & Brennan, 2018). Sendo a framboesa uma espécie com elevado valor comercial neste setor e a camarinha uma espécie com elevado potencial para introdução no mercado, tem-se vindo a desenvolver diversos estudos de melhoramento destas espécies, selecionando populações com características desejáveis para o consumidor (Oliveira et al., 2007; Santos et al., 2014).

Em Portugal, os estudos de melhoramento destas espécies têm sido dirigidos pelo INIAV, principalmente através do seu programa de melhoramento em framboesa, tendo a germinação de sementes de framboesa e camarinha, resultantes de polinizações controladas, um papel fundamental. Este programa envolve o cruzamento de vários genótipos bem como a colheita e germinação das sementes resultantes, seguindo-se a análise e seleção dessas descendências, dependendo o seu sucesso de um bom protocolo de germinação de sementes.

O método tradicional de escarificação e estratificação, baseada na germinação *in vivo*, não atinge as taxas de germinação pretendidas no programa, atingindo um máximo de 40% nos ensaios para a escarificação e um máximo de 50% nos de estratificação realizados por Contreras et al. (2016), para a framboesa. Por outro lado, nos ensaios de escarificação realizados por Wada & Reed (2011) para diferentes variedades de *Rubus* foram obtidas taxas de germinação mais elevadas, na ordem dos 70-80%, enquanto os ensaios realizados por Clark & Moore (1993), obtiveram taxas muito inferiores para a framboesa, com um máximo de 22% e certas variedades sem germinação. Peacock & Hummer (1996) também testaram diferentes métodos de escarificação e estratificação em duas variedades de *Rubus*, tendo obtido, na generalidade, sementes sem germinação ou com taxas na ordem dos 20-50%. Relativamente à camarinha, este método atinge um máximo de 30% nos ensaios realizados por Santos (2013) e um máximo de 50% nos ensaios realizados por Lisboa (2017). É por isso necessário obter um método cujos resultados apresentem taxas mais elevadas e, para isto, há que explorar diferentes métodos experimentais para as espécies em estudo.

De acordo com Ismaini et al. (2017a), Lim & Knight (2000), Martínez-Cruz et al. (2013) e Mian et al. (1995), o método da germinação *in vitro* apresentou já resultados positivos com sementes do género *Rubus*, por outro lado, para as sementes do género *Corema* não se conhecem estudos para este método. Assim, a germinação *in vitro* apresenta-se então como um método interessante no contexto do problema apresentado.

Vai ser assim avaliado o método de indução da germinação *in vitro*, de modo a determinar se será, ou não, o método experimental a realizar no programa de melhoramento no futuro. Desta maneira, serão testadas diferentes abordagens da mesma de modo a obter a melhor combinação de tratamentos para as duas espécies.

Este estudo tem como finalidade a maximização da taxa de germinação de sementes conservadas e frescas de framboesa e camarinha bem como a identificação das condições que a proporcionam. Em particular, apresenta diferentes objetivos de modo a obter o melhor protocolo para cada uma das espécies, sendo estes: testagem de dois tipos de sementes (secas e conservadas em frio *versus* frescas); testagem de condições de desinfeção e preparação das sementes pré-germinação; testagem de dois meios de cultura *in vitro* (Quorin & Lepoivre e Murashige & Miller); testagem do corte da semente *versus* extração do embrião e testagem de diferentes processos de aclimatização.

2. Revisão bibliográfica

2.1 A espécie *Rubus idaeus*

A espécie *Rubus idaeus* L., vulgarmente designada por framboesa vermelha (Figura 1), é uma espécie inserida na família Rosaceae, na ordem Rosales, no género *Rubus* e subgénero *Idaeobatus*, que engloba cerca de 200 espécies sendo esta a mais comum, no continente europeu. (Funt & Hall, 2013).



Figura 1 – Frutos de *Rubus idaeus* L.

Rubus idaeus ($2n = 14$) é um arbusto perene que pode atingir até 2 metros de altura. Existem dois tipos de framboesa utilizados na produção da mesma, podendo ser não remontantes ou remontantes, consoante a sua frutificação. A frutificação não remontante é a mais comum entre as framboesas, sendo que estas variedades são designadas por bienais, i.e., apresentam lançamentos vegetativos no primeiro ano com desenvolvimento dos gomos florais e diferenciação floral, entrando, posteriormente, num período de dormência no inverno; no segundo ano ocorre a produção de frutos (Barney et al., 2007; Hudson, 1959; Jennings, 1988; Lim & Knight, 2000). Por outro lado, a frutificação remontante diz respeito às variedades que completam um ciclo de crescimento, com formação de inflorescência, diferenciação floral dos gomos e produção de frutos em apenas um ano (Barney et al., 2007; Funt & Hall, 2013; Lim & Knight, 2000).

A framboesa necessita de um determinado período sujeita a baixas temperaturas para a quebra da dormência e, conseqüentemente, a germinação das sementes. Assim, a planta deve ter as necessidades de frio supridas até ao início da primavera, altura em que as temperaturas aumentam. Dependendo das cultivares, devem ser expostas durante, aproximadamente, 800-1400 horas a temperaturas abaixo de 7°C para atingir as condições necessárias (Barney et al., 2007; Funt & Hall, 2013; Oliveira et al., 2002)

Segundo Funt & Hall (2013), esta espécie é propagada através de vetores animais que, ao consumirem as suas bagas, as dispersam promovendo a sua germinação, assim que as condições climáticas para tal o permitem. Estes vetores são, maioritariamente, aves e pequenos mamíferos.

2.1.1. Distribuição geográfica

Rubus idaeus encontra-se distribuída um pouco por todo mundo, no entanto a sua distribuição encontra-se mais centrada no hemisfério norte, em particular na Europa, Ásia e América do Norte (Funt & Hall, 2013; Graham & Woodhead, 2011).

De acordo com a GPP (2006), a produção de framboesa, a nível nacional, tem maior expressão no Litoral Alentejano e na região do Fundão, Guimarães e Bragança (Figura 2), sendo a principal região produtora, o Sudoeste Alentejano.



Figura 2 – Distribuição de *Rubus idaeus* L., em Portugal (GPP, 2006).

2.1.2. Interesse para a agricultura em Portugal

Derivado do interesse, já mencionado, que se tem vindo a desenvolver pelo setor dos pequenos frutos, a produção da cultura de framboesa encontra-se em expansão por todo o mundo, sendo esta a espécie mais cultivada de entre os pequenos frutos (Oliveira & Fonseca, 2007).

O seu elevado valor comercial bem como o aumento da procura pelo consumidor, aliados às condições favoráveis à sua produção em Portugal, tornam o território nacional um dos países emergentes na produção de *Rubus idaeus*. No entanto, a produção nacional tem apenas em vista o mercado da exportação, dado o baixo consumo deste fruto no mercado interno.

A produção de framboesa na Europa concentra-se no período entre maio e agosto pelo facto de as condições climáticas não permitirem a sua produção nos meses de inverno. Como Portugal apresenta um clima ameno durante o outono/inverno, torna-se possível a obtenção de frutos de elevada qualidade nesta altura do ano, pelo que a produção nacional consegue suprir a procura do mercado em época baixa de produção nos outros países, tornando-se assim um setor competitivo e rentável no mercado externo (GPP, 2006; Oliveira & Fonseca, 2007).

2.2 A espécie *Corema album*

A espécie *Corema album* L., comumente designada por camarinha ou camarinheira (Figura 3), é uma espécie endémica das dunas da costa atlântica da Península Ibérica. Esta espécie, classificada como angiospérmica dicotiledónea, insere-se na subfamília Ericoideae, na família Ericaceae e na ordem Ericales (Andrade et al., 2015; León-González et al., 2013; Marques, 2007; Oliveira & Dale, 2012). É uma de duas



Figura 3 – Frutos de *Corema album* L.

espécies do género *Corema*, e apresenta duas subespécies, subsp. *azoricum* e a subsp. *album* (Andrade et al., 2015; Diaz-Barradas et al., 2000; Oliveira & Dale, 2012; Santos et al., 2014).

Corema album ($2n = 26$) é um pequeno arbusto dióico, perene, que pode atingir até 1 metro de altura. Possui caule com numerosas ramificações cujo comprimento varia, geralmente, entre os 30 e 75 cm, mantendo-se verde todo o ano (Oliveira & Dale, 2012; Santos et al., 2014).

O crescimento vegetativo decorre entre fevereiro e julho, atingindo o seu pico entre abril e junho, e é renovado a partir dos gomos com cerca de 25 mm acima do solo. A floração ocorre desde fevereiro até ao final de abril, sendo a maturação dos frutos entre junho e setembro, consoante a localização geográfica da planta (Andrade et al., 2015; Diaz-Barradas et al., 2000; Oliveira & Dale, 2012).

A camarinha é referida por diversos autores como uma espécie de difícil propagação em condições laboratoriais, sendo que este método atinge um máximo de 30% nos ensaios realizados por Santos (2013) e um máximo de 50% nos ensaios realizados por Lisboa (2017), com as primeiras germinações ocorridas ao fim de cerca de 3 meses com a realização de pré-tratamentos de escarificação e estratificação.

De acordo com diversos autores (Marques, 2007; Oliveira & Dale, 2012; Santos et al., 2014), a propagação da espécie está associada a vetores animais através do consumo das suas

bagas por diferentes vertebrados, tais como coelhos, raposas, gaivotas e melros, sendo a dispersão e germinação das sementes assegurada pelos mesmos.

2.2.1. Distribuição geográfica

Corema album é uma espécie característica da costa atlântica da Península Ibérica, que se estende desde a Finisterra até Gibraltar (Santos et al., 2014). De acordo com Oliveira & Dale (2012), existem populações extensas em três grandes sistemas dunares, em Asperillo no Parque Natural de Doñana no sul de Espanha, desde Sines a Tróia no sudoeste de Portugal e desde a Nazaré a Ovar, no centro norte de Portugal, existindo exemplares da espécie em arribas e sistemas dunares ao longo da costa atlântica (Figura 4).



Figura 4 – Distribuição de *Corema album* L. (Marques, 2007).

2.2.2. Interesse para a agricultura em Portugal

Segundo diversos autores, a espécie *Corema album*, com as suas características organoléticas bem como o seu elevado valor nutricional, tem um elevado interesse agronómico por representar uma potencial introdução no grupo dos pequenos frutos (Andrade et al., 2015; Lisboa, 2017; Oliveira & Dale, 2012; Santos et al., 2014). Como mencionado, este setor tem vindo a evoluir no mercado mundial, pelo que a introdução de um pequeno fruto com características únicas (baga de cor branca), pode ser uma vantagem para o setor em Portugal e, conseqüentemente, uma mais valia para a economia nacional.

2.3 A semente

A semente é uma estrutura através da qual o embrião completamente desenvolvido é disperso, permitindo que este sobreviva ao período entre a maturação da semente e o desenvolvimento da plântula, assegurando assim a propagação da espécie através da próxima geração (Bewley et al., 2013; Koornneef et al., 2002).

Ao nível da constituição deste órgão, o mesmo possui as seguintes estruturas:

1. Embrião, diferenciado a partir do zigoto, é constituído pelo eixo embrionário e cotilédones, que podem ter ou não função de reserva (Bewley et al., 2013; Hartmann et al., 2018). O eixo embrionário é constituído pela radícula (ou raiz embrionária), pelo hipocótilo (que conecta a radícula aos cotilédones) e o epicótilo (que conecta os cotilédones à plúmula), pela plúmula (meristema apical caulinar envolvido por folhas embrionárias) e por dois entrenós caulinares (Aguiar, 2012a; Bewley et al., 2013). O eixo embrionário tem função reprodutiva, tendo capacidade de promover divisões celulares (Popinigis, 1985).

2. Tecidos de reserva, destinados a fornecer ao embrião em crescimento a fonte de alimento e energia necessárias ao seu desenvolvimento, durante a germinação da semente. As principais reservas fornecidas são hidratos de carbono, lípidos e proteínas, podendo ainda fornecer, em pequenas quantidades, minerais, vitaminas e outras substâncias. Consoante o tipo de semente, estas reservas nutritivas podem ser encontradas dentro dos tecidos embrionários e extraembrionários, endosperma e perisperma (estrutura pouco usual nas angiospérmicas), em diferentes proporções, bem como nos cotilédones, presentes no embrião (Aguiar, 2012a; Bewley et al., 2013; Hartmann et al., 2018; Popinigis, 1985).

3. Episperma, vulgarmente designado por testa ou casca da semente, consiste no revestimento envolvente da semente, de origem maternal, resultante do desenvolvimento do primórdio seminal. Esta estrutura tem como função a proteção da semente, servindo de barreira entre o embrião e o ambiente externo sendo constituída por uma ou várias camadas, consoante a espécie (Aguiar, 2012a; Bewley et al., 2013; Hartmann et al., 2018; Popinigis, 1985). A framboesa apresenta três camadas no seu revestimento: a exotesta, a mesotesta e a endotesta, cuja espessura varia consoante a cultivar (Wada et al., 2011). No que respeita a camarinha, não se tem informação relativa à estrutura do seu revestimento, no entanto segundo Santos et al. (2014) esta espécie apresenta um endocarpo espesso mas permeável.

2.3.1. Reservas nutritivas da semente

As reservas nutritivas da semente alimentam o embrião em crescimento através dos tecidos de reserva mencionados na secção 2.3, fornecendo nutrientes e energia para satisfazer as necessidades vitais para a germinação. Segundo Bewley et al. (2013), as principais reservas nutritivas das sementes são:

Os hidratos de carbono, são a maior reserva nutritiva das sementes, encontram-se sob a forma de amido, açúcares e hemicelulose, sendo este último, frequentemente, o hidrato de carbono presente em maior quantidade nos tecidos de reserva (Bewley et al., 2013).

Os lípidos, são uma fonte de energia importante para a semente na germinação existindo sob a forma de triacilgliceróis e, em algumas sementes, sob a forma de fosfolípidos, glicolípidos e esteróis em quantidades consideráveis (Bewley et al., 2013).

As proteínas, polímeros de aminoácidos sintetizados biologicamente por todas as células, encontram-se em todos os tecidos das sementes, funcionando como enzimas (Bewley et al., 2013).

Outros constituintes, são o caso de minerais, alguns aminoácidos e alcaloides mobilizados pela semente como fonte de azoto bem como as fitohormonas, como os promotores de germinação e crescimento (giberelinas, citocininas e auxinas) e os inibidores de germinação (ácido abscísico) (Bewley et al., 2013).

2.4 Germinação da semente

A germinação de sementes é definida como sendo o conjunto de eventos que compreende os acontecimentos que ocorrem desde a imbibição de água até à emergência e alongamento do eixo embrionário, sendo um processo fisiológico resultante da retoma do desenvolvimento do embrião de uma semente madura, a partir dos seus invólucros. Assim, o sinal visível de que existiu germinação é emergência da radícula através dos invólucros da semente (Aguiar, 2012b; Bewley, 1997; Bewley et al., 2013).

O processo da germinação encontra-se dividido em três fases:

1ª fase: Imbibição da semente madura desidratada. Esta fase, controlada pela diferença do potencial hídrico, consiste na intensa absorção de água do meio envolvente para a semente, levando ao aumento do volume da mesma (Bewley, 1997; Bewley et al., 2013; Hartmann et al., 2018).

2ª fase: Fase de latência, onde a absorção de água é reduzida ou nula e ocorre a ativação dos processos metabólicos, praticamente paralisados após maturação da semente e necessários ao crescimento do embrião. Estas alterações são denotadas pelo aumento da taxa respiratória e

pela mobilização das reservas para o eixo embrionário, através da ativação das enzimas hidrolíticas, presentes nas sementes desidratadas, que iniciam a degradação de hidratos de carbono, proteínas e lípidos, entre outras substâncias de reserva da semente (Bewley, 1997; Bewley et al., 2013; Hartmann et al., 2018).

3ª fase: Emergência do eixo embrionário, é a fase final da germinação, onde o embrião, com o aumento de volume devido à imbibição, alonga e pressiona as estruturas de revestimento da semente que, por não terem acompanhado o aumento de volume, rompem. No caso das sementes em estudo, sendo estas angiospérmicas, o embrião encontra-se revestido pelo endosperma e pelo tegumento. Assim, após rutura do endosperma e, posteriormente, do tegumento, ocorre a emergência da radícula (Bewley et al., 2013; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Hartmann et al., 2018).

2.4.1. Fatores que afetam a germinação

A germinação de sementes está dependente de fatores endógenos e exógenos à semente pelo que é necessária a presença de condições favoráveis ao processo, variáveis consoante a espécie em causa (Baskin & Baskin, 2014). Assim, destacam-se os seguintes fatores:

1. Água. É o fator que apresenta maior influência pois, para que ocorra a germinação de uma semente viável, é necessário um nível adequado de hidratação que permita a ativação dos processos metabólicos e emergência da radícula, pelo que é fundamental a absorção de água, i.e., a imbibição para o processo ocorrer (Baskin & Baskin, 2014; Bewley et al., 2013; Hartmann et al., 2018). De acordo com Baskin & Baskin (2014), previamente à testagem da germinação, as sementes devem ser pesadas sendo, posteriormente, submersas em água durante um período de tempo para determinar se são impermeáveis à água, hipótese que se verifica caso não ocorra aumento de peso. Neste caso, têm de ser submetidas a tratamento prévios que facilitem a absorção de água para dar início ao processo da germinação.

2. Temperatura. Este fator pode atuar na quebra de dormência bem como no controlo da germinação das sementes, influenciando fortemente a taxa de germinação das mesmas bem como o tempo de germinação (Bewley et al., 2013; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Hartmann et al., 2018; Yan & Chen, 2020). O intervalo de temperaturas sob as quais as sementes germinam varia consoante a espécie, possuindo uma temperatura máxima e mínima à qual ocorre germinação bem como uma temperatura ótima (Bewley et al., 2013). Esta última, a temperatura ótima, é a temperatura sob a qual existe uma maior taxa de germinação da semente num menor período de tempo, para uma dada espécie, sendo que para a maioria das espécies, encontra-se entre os 20°C e os 30°C. Relativamente à temperatura mínima e máxima,

para a maioria das espécies a mínima registrada é de 10°C e a máxima varia entre 40°C e 57°C, consoante a espécie (Edwards, 1932). Há ainda que referir que a temperatura tem uma forte influência na profundidade da dormência da semente, tornando mais, ou menos, difícil a quebra da mesma e conseqüente germinação. Quando as plantas-mãe são sujeitas a temperaturas baixas, as sementes podem desenvolver dormência profunda, por outro lado quando as sementes são desenvolvidas em zonas com temperaturas mais elevadas têm tendência a apresentar dormência menos profunda (Yan & Chen, 2020).

3. Luz. Segundo diversos autores, a luz pode ser um fator crítico para germinação das sementes, atuando tanto na indução como na quebra da dormência nas sementes. Apenas uns segundos de exposição solar podem originar a germinação de um elevado número de sementes relativamente à ausência de luz tornando este tempo essencial para que as sementes determinem se há, ou não, condições adequadas à sua germinação no ambiente que as rodeia. Os efeitos da luminosidade podem envolver a intensidade, o fotoperíodo e o comprimento de onda, sendo que a reação da semente a estes efeitos, depende tanto do genótipo como de fatores ambientais. (Bewley et al., 2013; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Hartmann et al., 2018; Yan & Chen, 2020).

2.4.2. Dormência da semente

A dormência da semente é caracterizada pela incapacidade de uma semente viável germinar, num certo período de tempo, quando se encontra sob condições ambientais adequadas à sua germinação (Baskin & Baskin, 2014; Baskin & Baskin, 2004; Bewley et al., 2013; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Koornneef et al., 2002).

2.4.2.1. Tipos de dormência da semente

A dormência pode ser classificada, segundo Nikolaeva (1969, 1977) citada por Baskin & Baskin (2014), como endógena ou exógena, consoante a localização ou mecanismos de restrição à germinação. Em certas sementes pode existir dupla dormência, ou dormência combinada, que consiste numa combinação da dormência endógena e exógena, i.e., da dormência fisiológica e física (Baskin & Baskin, 2014; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Hartmann et al., 2018).

A dormência endógena está relacionada com certas características do embrião que restringem a germinação (Baskin & Baskin, 2014), podendo ser dividida em:

- a) dormência fisiológica, onde as sementes apresentam um mecanismo fisiológico inibidor do embrião que impede a emergência da radícula, podendo esta ser leve,

intermédia ou profunda consoante a espécie (Baskin & Baskin, 2014; Baskin & Baskin, 2004; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Hartmann et al., 2018).

- b) dormência morfológica, ocorre quando o embrião não se encontra completamente desenvolvido, estando ou não diferenciado, pelo que precisa de concluir o seu desenvolvimento e/ou diferenciação com condições adequadas ao mesmo para que ocorra germinação (Baskin & Baskin, 2014; Baskin & Baskin, 2004; Bewley et al., 2013; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Hartmann et al., 2018).
- c) dormência morfofisiológica, surge em sementes que apresentam uma combinação da dormência morfológica e fisiológica, onde o embrião não está completamente desenvolvido e se encontra fisiologicamente dormente (Baskin & Baskin, 2014; Baskin & Baskin, 2004; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Hartmann et al., 2018).

A dormência exógena é resultante de características relativas ao revestimento ou outros invólucros que envolvem o embrião e que impedem a germinação de sementes viáveis (Baskin & Baskin, 2014). Estas características podem ser associadas a fatores:

- a) físicos, onde a dormência é causada pela dureza e impermeabilidade do revestimento à água e trocas gasosas que impedem a germinação (Baskin & Baskin, 2014; Bewley et al., 2013; Hartmann et al., 2018).
- b) mecânicos, ocorre quando, apesar de permeáveis, estruturas lenhosas/resistentes dos invólucros impedem emergência da radícula e das estruturas caulinares (Baskin & Baskin, 2014; Hartmann et al., 2018).
- c) químicos, a dormência está associada a inibidores químicos que se encontram presentes nos invólucros da semente, tais como o ácido abscísico, compostos fenólicos, entre outros (Baskin & Baskin, 2014; Bewley et al., 2013; Hartmann et al., 2018).

Relativamente às espécies em estudo, as sementes de *Rubus idaeus* possuem dupla dormência, física e fisiológica. A dormência física diz respeito ao revestimento da semente, que forma uma barreira física impermeável à água impedindo a imbibição e, conseqüentemente, a germinação (Baskin & Baskin, 2014; Contreras et al., 2016; Lim & Knight, 2000; Martínez-Cruz et al., 2013; Mian et al., 1995). A dormência fisiológica verifica-se por existir um mecanismo fisiológico a inibir a emergência da radícula (Baskin & Baskin, 2014); neste caso ocorre pelo facto de as espécies pertencerem ao grupo das recalcitrantes onde, segundo Mian et al. (1995) a dormência é induzida à medida que a semente vai desidratando, podendo perder a sua viabilidade se atingir teores de humidade inferiores a 20% (Hartmann et al., 2018; Sujith,

2015). Por outro lado, segundo Santos et al. (2014), este tipo de dormência não existe nas sementes de *Corema album* pelo facto de o revestimento da semente não se apresentar impermeável à água, não impedindo a imbibição da semente necessária à germinação. No entanto, estas sementes apresentam algum tipo de dormência fisiológica, tendo em conta a sua resposta aos pré-tratamentos realizados com GA₃ (Santos et al., 2014). Considerando os resultados obtidos com os tratamentos de estratificação quente e fria realizados por Lisboa (2017), concluiu-se que as sementes de camarinha possuem dormência fisiológica intermédia.

2.5 Germinação *in vitro*

De acordo com Debergh & Read (1991) e Gonçalves (1992), a propagação *in vitro* é o processo de propagação de plantas em meios de cultura de formulação definida, mantidas em ambiente artificial e controlado, cujo manuseamento é realizado em condições assépticas. Este processo consiste em cinco fases: fase 0 – seleção da plântula-mãe e preparação do explante; fase 1 – estabelecimento da cultura asséptica; fase 2 – fase de multiplicação; fase 3 – preparação para o crescimento em ambiente natural; fase 4 – transferência para o ambiente natural.

Neste caso, a fase 0 corresponde então à fase de preparação da semente da espécie em estudo, incluindo os pré-tratamentos e desinfeção. De seguida, passa à fase 1, onde se processa a colocação da semente em condições assépticas no meio de cultura, iniciando-se a fase 2, onde ocorre a germinação da semente, isto é, a propagação da espécie de interesse sujeita a certas condições de cultura para o sucesso da mesma. Por fim, aquando da germinação, o explante passa para a fase 3 e 4, onde o mesmo vai ser submetido à aclimatização, quer *in vitro* quer *ex vitro*, de modo a permitir a adaptação do mesmo às condições de ambiente natural e promover a autossuficiência fotossintética para que sobreviva em condições *ex vitro* (Debergh & Read, 1991).

2.5.1. Preparação do material vegetal

2.5.1.1. Condição do material vegetal

Segundo vários autores, as sementes a utilizar são colhidas maduras (Ismaini et al., 2017b; Lim & Knight, 2000; Martínez-Cruz et al., 2013; Mian et al., 1995; Wada & Reed, 2011). Popinigis (1985) explica que é na fase da maturação da semente que esta atinge o máximo vigor, bem como o máximo poder germinativo.

Como mencionado anteriormente, as sementes do grupo recalcitrante perdem viabilidade quando atingem teores de humidade abaixo dos 20%. Assim, para atingir as elevadas taxas de germinação requeridas devem ser utilizadas sementes frescas, no entanto podem ser

desidratadas até 12 horas sem que percam viabilidade, embora as taxas de germinação já sejam mais reduzidas que na semente fresca (Mian et al., 1995).

2.5.1.2. Tratamento prévio do material vegetal

Tendo em consideração os tipos de dormência mencionados na secção 2.4.2.1, associados às espécies em estudo, as sementes das mesmas apresentam baixas taxas de germinação no que diz respeito à sementeira tradicional. Para que ocorra germinação, os mecanismos de dormência têm de ser quebrados, com recurso a tratamentos favoráveis à quebra da dormência combinada e dormência fisiológica das sementes de framboesa e camarinha, respetivamente. De acordo com diversos autores, as taxas de germinação podem ser aumentadas com a realização de tratamentos prévios tal como a utilização de protocolos de germinação *in vitro*, realçando a importância deste passo no estudo a decorrer para a elaboração do melhor protocolo de germinação (Ismaini et al., 2017a; Martínez-Cruz et al., 2013; Mian et al., 1995; Wada & Reed, 2011).

A dormência física é quebrada através da remoção do revestimento da semente, que deste modo permite a correta imbibição da semente, promovendo a germinação. Segundo diversos autores, a abordagem mais comum é a escarificação química ou mecânica, sendo a primeira técnica mais utilizada. Na escarificação química, são utilizados diferentes reagentes químicos como o ácido sulfúrico, o hipoclorito de sódio e o nitrogénio líquido, apresentando cada um deles diferentes resultados, consoante o tipo de reagente, a concentração de substâncias utilizadas bem como os tempos de exposição da semente ao reagente (Contreras et al., 2016; Martínez-Cruz et al., 2013; Wada & Reed, 2011). As maiores taxas de germinação foram obtidas com o uso do ácido sulfúrico como reagente, como demonstrado no ensaio realizado por Contreras et al. (2016), onde os melhores resultados foram obtidos para uma concentração de 95% de ácido sulfúrico. Por outro lado, é utilizada a escarificação mecânica, apresentada por Lim & Knight (2000), Mian et al. (1995) e Nesme (1985) que obtiveram elevadas taxas de germinação nos ensaios desenvolvidos, onde efetuaram um corte transversal ao eixo embrionário, de modo a quebrar a barreira física e facilitar a imbibição da semente. Galletta et al. (1986) e Nesme (1985), testaram outro método de escarificação mecânica: a extração do embrião e colocação do mesmo para germinação, tendo também obtido elevadas taxas de germinação nos ensaios realizados.

Para quebra da dormência fisiológica, a técnica mais utilizada e que evidencia melhores resultados é a estratificação, que pode ser quente ou fria. A estratificação fria é feita em ambiente húmido com recurso a baixas temperaturas, na ordem dos 0-10°C, durante diferentes

períodos de tempo, que vão variando consoante a profundidade da dormência, sendo as temperaturas mais comumente utilizadas na ordem dos 5°C (Contreras et al., 2016; Wada & Reed, 2011). Segundo Contreras et al. (2016), as melhores taxas de germinação foram obtidas para um período de estratificação de 3 meses. Por sua vez, a estratificação quente é realizada em ambiente húmido com recurso a temperaturas mais elevadas, iguais ou superiores a 15°C, por diferentes períodos de tempo consoante a profundidade da dormência da semente (Lisboa, 2017).

2.5.1.3. Desinfecção do material vegetal

Antes de se utilizar o material vegetal é essencial que se efetue a desinfecção do mesmo, de maneira a evitar que este seja instalado *in vitro*, contaminado por agentes patogénicos. De um modo geral, o processo de desinfecção segue os mesmos passos nos diferentes ensaios publicados, alterando-se os produtos utilizados e suas concentrações (Dixon & Gonzales, 1995).

As sementes são lavadas em água corrente com detergente de maneira a remover o tegumento da semente. De forma a minimizar o risco de contaminação, são tratadas com uma solução de fungicida e bactericida durante uns minutos. Posteriormente, são esterilizadas superficialmente com recurso a uma solução de NaOCl e, em alguns casos, uma solução com etanol, terminando a desinfecção com a lavagem das sementes em água destilada as vezes necessárias à eliminação total dos produtos utilizados (Ismaini et al., 2017b; Mian et al., 1995). Para a desinfecção superficial, Mian et al. (1995), utilizaram a solução de lixívia (com NaOCl) com um surfactante, de modo a aumentar a adesividade da semente.

2.5.2. Meio de cultura

O meio de cultura é um fator essencial para o sucesso da germinação das sementes por fornecer os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, fornecendo macro e micronutrientes bem como uma fonte de carbono (Dixon & Gonzales, 1995). O meio mais comumente utilizado é o meio MS desenvolvido por Murashige & Skoog (1962), sendo os meios em estudo - Murashige & Miller (1976) e Quoirin & Lepoivre (1977) – adaptações do primeiro, com algumas diferenças relativamente a alguns componentes, como vitaminas e reguladores de crescimento, bem como diferenças relativas às concentrações de certos elementos presentes no meio.

Relativamente à fonte de carbono, na germinação *in vitro*, o mais comum é a sacarose, por esta se encontrar presente na seiva do floema de muitas espécies (Dixon & Gonzales, 1995).

Para os meios abordados, a fonte de carbono usada é a sacarose, sendo a concentração da mesma, para o meio MS e meio MM, 30 g/L enquanto no meio QL é de 20 g/L.

Segundo alguns autores, ao reduzir a concentração de sais do meio de cultura MS, para diferentes espécies, ocorre uma maior taxa de germinação relativamente à concentração de 100%. Uma maior concentração de sais no meio interfere com o potencial osmótico, afetando a imbibição da semente no processo de germinação; este aspeto foi confirmado no ensaio realizado, onde os melhores resultados foram obtidos para a concentração de 50% do meio MS. (Moura et al., 2014; Reis et al., 2008).

2.5.2.1. Macronutrientes

Os macronutrientes são fornecidos à semente pelo meio de cultura sob a forma de sais inorgânicos, variando a concentração dos mesmos conforme a espécie e com o objetivo de alcançar a maior taxa de germinação (Dixon & Gonzales, 1995).

Relativamente aos meios em estudo, os macronutrientes neles contidos são os presentes no meio MS, expressos sob a forma de sais minerais, sendo os principais nutrientes fornecidos da seguinte forma: o nitrogénio (N) sob a forma de NH_4NO_3 , o potássio (K) sob a forma de KNO_3 , KI e KH_2PO_4 , sendo que este último fornece também o fósforo (P). Existem também macronutrientes secundários que são fornecidos desta forma: cálcio (Ca) sob a forma de CaCl_2 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e o magnésio (Mg) sob a forma de MgSO_4 (Murashige & Miller, 1976; Murashige & Skoog, 1962; Quoirin & Lepoivre, 1977). No meio Murashige & Miller (1976), é ainda fornecido sódio (Na) sob a forma de NaH_2PO_4 , que fornece também o fósforo (P).

2.5.2.2. Micronutrientes

Os micronutrientes necessários para que a germinação das sementes ocorra são suplementados através de diversos componentes. No meio desenvolvido por Murashige & Skoog (1962), os estes nutrientes são fornecidos sob a forma de sais minerais, do mesmo modo que os macronutrientes, sendo o ferro (Fe) fornecido sob a forma de FeSO_4 , o manganês (Mn) sob a forma de MnSO_4 , o boro (B) sob a forma de H_3BO_3 , o zinco (Zn) sob a forma de ZnSO_4 , o molibdénio (Mo) sob a forma de Na_2MoO_4 e o cobre (Cu) sob a forma de CuSO_4 . É também incorporado o cobalto (Co) sob forma de CoCl_2 e o iodo (I) sob a forma de KI . A formulação dos micronutrientes para os meios em estudo é a mesma, variando apenas as concentrações dos componentes MnSO_4 e KI , para o meio QL (Murashige & Miller, 1976; Quoirin & Lepoivre, 1977).

2.5.2.3. Vitaminas

Relativamente às vitaminas, no meio MS, estas são fornecidas às sementes sob a forma de mio-inositol, tiamina.HCl, piridoxina.HCl e ácido nicotínico (Murashige & Skoog, 1962), enquanto para o meio MM e o meio QL, estas são fornecidas apenas sob a forma de mio-inositol e tiamina.HCl, sendo a concentração da última mais elevada (Murashige & Miller, 1976; Quoirin & Lepoivre, 1977).

2.5.2.4. Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento que apresentam maior influência na germinação *in vitro* de sementes são o ácido abscísico (ABA) e o ácido giberélico (GA₃). De acordo com vários autores, as giberelinas têm um papel crucial na quebra da dormência pelos seus efeitos positivos na germinação, promovendo a mesma e originando elevadas taxas de germinação das sementes. O ABA, ao contrário do GA₃, induz e mantém a dormência da semente, inibindo assim a germinação, sendo que quanto maior a concentração do mesmo no meio, maior a profundidade da dormência (Ismaini et al., 2017b; Murashige & Skoog, 1962; Staszak et al., 2019; Yan & Chen, 2020). Estes dois reguladores funcionam num equilíbrio dinâmico e antagonístico que permite o controlo da germinação bem como a duração da mesma. A adição de uma concentração mais elevada de GA₃ ao meio leva a uma redução dos níveis endógenos de ABA, promovendo a germinação (Yan & Chen, 2020). Nos meios em estudo, apenas o meio QL contém GA₃, com a concentração de 0,1 mg/L, fator que pode ser relevante para a obtenção de maiores taxas de germinação nos ensaios realizados com o mesmo (Quoirin & Lepoivre, 1977).

Para além dos reguladores de crescimento mencionados acima, as auxinas e citocininas, apresentam também um papel importante na germinação. Estas duas hormonas apresentam melhores resultados quando em equilíbrio, pelo facto de uma maior concentração de uma originar um aumento da concentração da outra. No meio MS e no meio MM, estas hormonas são adicionadas sob a forma de IAA e cinetina, enquanto no meio QL, são fornecidas sob a forma de 2,4-D e BAP (Murashige & Miller, 1976; Murashige & Skoog, 1962; Quoirin & Lepoivre, 1977). É ainda de referir, no meio Murashige & Miller (1976), a adição de adeninas sob a forma de Ads.

2.5.2.5. Agente solidificante

Para obter um meio de germinação suficientemente húmido mas rígido, Murashige & Skoog (1962) utilizaram o agar como agente solidificante, no entanto, afirmaram que a concentração deste agente poderá variar consoante a concentração de sais, o pH e a preparação

do meio. Estes autores consideraram uma concentração de 10 g/L de agar (1%) para o meio MS com concentração de 100% (Murashige & Skoog, 1962). Martínez-Cruz et al. (2013) e Moura et al. (2014), forneceram ao meio MS com uma concentração de 100% bem como ao meio MS com uma concentração de 50%, 7 g/L de agar (0,7%). Outros autores, forneceram 30 g/L (3%) de agar (Lim & Knight, 2000) e 8 g/L de agar (0,8%) (Ismaini et al., 2017a), sendo esta última concentração a referida para o meio Murashige & Miller (1976) e para o meio Quoirin & Lepoivre (1977).

2.5.3. Condições de cultura

2.5.3.1. Temperatura

Como referido na secção 2.4.1, a temperatura é um dos fatores mais importantes para a germinação das sementes. As temperaturas máximas e mínimas podem influenciar negativamente a germinação enquanto que um intervalo de temperaturas médio afeta a mesma de forma positiva, levando a mesma a ocorrer num período curto (Edwards, 1932). A taxa de germinação é maior quando existe alteração nas temperaturas diárias do que quando as temperaturas se mantêm constantes (Edwards, 1932). Segundo Baskin & Baskin (2014), a diferença entre as temperaturas deve ser igual ou superior a 10°C, enquanto que segundo Thompson & Grime (1979) basta a alteração de 1°C durante o período de ensaio para estimular a germinação, em diversas espécies.

Na câmara de crescimento, as sementes são submetidas, geralmente, a uma temperatura que varia entre 22°C e 25°C com alterações de temperatura na ordem dos 1°C-2°C (Ismaini et al., 2017b; Lim & Knight, 2000; Manzur et al., 2014; Martínez-Cruz et al., 2013).

2.5.3.2. Luminosidade

Tendo em conta a importância da presença de luz para a germinação referida na secção 2.4.1, deve ter-se em consideração quais os parâmetros mais favoráveis para a ocorrência do processo. Assim, o fotoperíodo geralmente utilizado é de 16 horas de luz e 8 horas de escuro (Ismaini et al., 2017b; Lim & Knight, 2000; Manzur et al., 2014), no entanto segundo Baskin & Baskin (2014) e Martínez-Cruz et al. (2013) as sementes devem ser submetidas à presença de luz por um período de 12 a 14 horas para a germinação ocorrer.

Relativamente aos efeitos do comprimento de onda na germinação, Toole et al. (1955) verificaram que as sementes têm maiores taxas de germinação nos comprimentos de onda na ordem dos 580-700 nm (luz vermelha), sendo que acima dos 700 nm existe inibição da germinação.

2.5.4. Aclimatização

A fase de aclimatização envolve a passagem da plântula propagada *in vitro* para as condições *ex vitro*, isto é, a transferência de ambiente artificial, asséptico e controlado para o ambiente natural em campo. Esta fase tem como objetivo a transição gradual da plântula, reduzindo o stress e as perdas causadas pelas grandes diferenças entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro* (Gonçalves, 1992; Moura et al., 2014).

Este processo tem uma elevada importância na propagação de plantas *in vitro* por ser a etapa onde se registam as maiores perdas de explantes, isto deve-se ao facto de o material vegetal passar de uma condição heterotrófica - com fornecimento artificial de nutrientes, fonte de carbono e energia bem como um ambiente controlado - para uma condição autotrófica, onde tem de desenvolver autossuficiência fotossintética para a sua sobrevivência (Gonçalves, 1992; Ismaini et al., 2017a; Kadleček et al., 2001; Moura et al., 2014). Por outro lado, existem muitas perdas por conta da desidratação das plântulas originária das elevadas perdas de água sofridas nas condições *ex vitro*. Estas perdas ocorrem devido à fraca capacidade de regulação da transpiração pelas plântulas devido ao deficiente funcionamento dos estomas provocado pelas condições assépticas e controladas em que a plântula se desenvolve no sistema *in vitro* (Gonçalves, 1992; Valasevich et al., 2009).

De modo a promover uma adaptação das plântulas às condições *ex vitro* com sucesso, é necessária a alteração, de forma gradual, de diversos fatores físicos tais como a humidade relativa, a luminosidade, a temperatura e o fotoperíodo (Debergh & Read, 1991; Gonçalves, 1992; Ismaini et al., 2017a). Por outro lado, é essencial o controlo da nutrição mineral, dos possíveis ataques de agentes patogénicos e da frequência de rega bem como o uso de um substrato adequado e de qualidade (Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2017; Valasevich et al., 2009).

2.5.4.1. Meios de aclimatização

2.5.4.1.1. Meio de cultura

Segundo diversos autores, o meio de cultura mais utilizado e com uma maior taxa de sucesso, é o meio MS, por fornecer os nutrientes necessários nas quantidades mais indicadas para a multiplicação de plântulas (Moura et al., 2014; Pelizza et al., 2013; Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2017; Reis et al., 2008). Os reguladores de crescimento, citocininas e auxinas, são bastante importantes para a obtenção de uma boa taxa de multiplicação. Enquanto

as citocininas são o fator que mais influencia no desenvolvimento da plântula, as auxinas promovem a formação de raízes (Pelizza et al., 2013; Reis et al., 2008).

Relativamente ao regulador de crescimento utilizado, os ensaios realizados por Erig et al. (2002) mostraram que o BAP promove o aumento da taxa de multiplicação de *Rubus idaeus*. Por outro lado, os ensaios realizados por Reis et al. (2008), onde foi testada a multiplicação em meio MS com e sem suplementação da mesma hormona, obtiveram taxas de sobrevivência de zero por cento para o meio com BAP e de 70% para o meio sem a presença de BAP. Estes resultados são suportados pelas pesquisas de Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón (2017) que, na realização de um ensaio semelhante em dois tipos de *Rubus* diferentes, obtiveram melhores taxas de multiplicação no meio MS sem presença de BAP que no meio com presença desta hormona.

Tendo em consideração os efeitos positivos das hormonas de crescimento mencionados acima, é possível de admitir a testagem do meio MM e QL como meio de aclimatização, por estes apresentarem na sua formulação estes dois reguladores. Sendo as citocininas adicionadas ao meio MM e ao meio QL sob a forma de cinetina e BAP, respetivamente, enquanto as auxinas são adicionadas a estes meios sob a forma de IAA no meio MM e 2,4-D no meio QL.

2.5.4.1.2. Substrato

O substrato utilizado pode influenciar diretamente o sucesso ou insucesso da aclimatização, pelo que uma escolha correta do mesmo é essencial. Pode ser utilizado isoladamente ou utilizar diversos, compondo uma mistura de substratos (Pelizza et al., 2013).

Existem variados tipos de substrato, sendo os mais utilizados: a turfa, a perlite e a vermiculite. A turfa apresenta um valor de pH baixo, baixa densidade, baixo teor de nutrientes disponíveis e uma elevada capacidade de retenção de água (ocupa 75-80% da porosidade total), pelo que não é aconselhável a sua utilização como substrato isoladamente. Por outro lado, apresenta uma CTC muito elevada tendo assim a capacidade de retenção de um elevado número de nutrientes, o que a torna uma boa adição para uma mistura de substrato (Brito & Mourão, 2012).

A perlite possui uma capacidade de retenção de água média (ocupa 50% da porosidade total), pH neutro, uma CTC muito baixa e não contém nutrientes. Este substrato é utilizado, maioritariamente, para aumentar a drenagem e arejamento dos substratos devido à sua porosidade elevada (Brito & Mourão, 2012). Existem também diferenças na granulometria que influenciam o seu tipo de utilização, a perlite fina apresenta uma maior capacidade de retenção de água, não devendo por isso ser utilizada isoladamente, enquanto a perlite grossa contribui

para o arejamento, podendo ser utilizada isoladamente ou em mistura com materiais mais finos, como a turfa, proporcionando assim melhores taxas de sobrevivência das plântulas ao promover um equilíbrio entre estes dois fatores (Avanzato & Cherubini, 1993; Brito & Mourão, 2012).

Por fim, a vermiculite apresenta um pH neutro a básico, elevada porosidade e CTC e uma elevada capacidade de retenção de água (60-65% da sua porosidade total), podendo ter vários tipos de granulometria (Brito & Mourão, 2012). Pelizza et al. (2013) afirmam que o uso de vermiculite de granulometria média permite um maior desenvolvimento das raízes, enquanto Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón (2017) referem que o uso de vermiculite isoladamente permite taxas de sobrevivência de plântulas de *Rubus* na ordem dos 80%, bem como o uso de uma mistura de substrato de turfa, vermiculite e perlite, tendo este último melhores resultados.

É ainda de mencionar que, na utilização de substrato como meio de aclimatização, a utilização de meio de cultura líquido como fonte de nutrição aquando da rega das plântulas tem uma influência positiva no sucesso da aclimatização (Pelizza et al., 2013).

2.5.4.2. Condições de aclimatização

Como mencionado na secção 2.5.4, é essencial que exista uma adaptação das plântulas às condições *ex vitro*, pelo que os fatores físicos vão sendo gradualmente alterados de modo a promover uma transplantação de sucesso para o campo. Estas alterações consistem na redução da humidade relativa, aumento da exposição e intensidade luminosa, e regulação da temperatura até à mais adequada. Há que referir que, durante os primeiros dias de aclimatização, as plântulas devem ser protegidas da desidratação e elevada luminosidade até estabelecerem a sua autossuficiência fotossintética sendo assim, posteriormente, reduzidas as taxas de humidade e aumentada a intensidade luminosa, até serem atingidas as condições naturais (Debergh & Read, 1991; Gonçalves, 1992; Kadleček et al., 2001).

Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón (2017), mantiveram a humidade relativa nos 90% e a temperatura de 24°C tendo obtido taxas de sobrevivência na ordem dos 80%, sendo que a principal causa de morte das plântulas no seu ensaio foi a desidratação, o que salienta a importância da manutenção do humedecimento do substrato para evitar o stress hídrico e, consequentemente, as perdas de explantes.

É também importante referir que existem cuidados a ter ao transplantar as plântulas para a fase de aclimatização, sendo estes a lavagem das mesmas de modo a remover todos os vestígios de agar e o tratamento com fungicida, de modo a prevenir infeções por agentes patogénicos. (Gonçalves, 1992; Kadleček et al., 2001).

3. Material e métodos

Este estudo foi realizado, em grande parte, no Instituto Superior de Agronomia, na Tapada da Ajuda, sendo uma pequena parte das atividades realizada nas instalações da sede do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), I.P., na Quinta do Marquês, Oeiras.

3.1 Material vegetal em estudo

Encontram-se em estudo duas espécies de pequenos frutos, a framboesa e a camarinha, em dois estados de conservação diferentes.

Relativamente à framboesa, segundo o estado de conservação, foram testadas sementes conservadas e frescas (Figura 22a e Figura 23). As sementes conservadas foram cedidas pelo programa de melhoramento de framboesa do INIAV, autopolinizadas da variedade Polka, de frutos colhidos em outubro de 2020, sendo conservadas a frio após colheita, numa câmara frigorífica, a 4°C. No caso das sementes frescas, os ensaios foram realizados com duas variedades diferentes, tendo sido o 1º ensaio com a variedade 8F471 com frutos colhidos maduros no dia 7 e 11 de outubro de 2021 nas instalações do INIAV (Oeiras). No 2º ensaio foi testada a variedade Clarita com frutos colhidos maduros no dia 20 de outubro de 2021, na Herdade da Fataca (Odemira).

No que respeita à camarinha, foram testadas apenas as sementes conservadas (Figura 22b e Figura 23, tendo estas sido fornecidas pelo INIAV, da variedade AM3 com frutos colhidos maduros no dia 11 de agosto de 2015, de arbustos de *Corema album* na Aldeia do Meco, que foram, posteriormente secos e conservados a frio (4°C).

3.2 Meio de cultura

Um dos fatores em estudo é o meio de cultura apropriado ao protocolo a desenvolver. Deste modo, foram avaliados dois meios de germinação para determinar qual dos mesmos apresentava maior sucesso no objetivo pretendido. Assim, procedeu-se à preparação do meio Quoirin & Lepoivre (1977) e do meio Murashige & Miller (1976).

Em primeiro lugar, determinou-se, de acordo com a bibliografia, quais as concentrações necessárias de cada elemento para cada meio de cultura a ser testado (Quadro 14, Anexo 7.2.1), estabelecendo-se os macro e micronutrientes, as vitaminas, os reguladores de crescimento, a fonte de carbono e o agente solidificante a utilizar bem como as suas respetivas concentrações.

Estes aspetos foram também determinados para o meio MS, o meio mais comumente utilizado, para que exista um termo de comparação e, posteriormente, para preparação do meio

de aclimatização das sementes, caso ocorra germinação, por este ser o meio de maior sucesso para a fase de aclimatização das plântulas germinadas, segundo a bibliografia.

Deste modo, os meios de cultura a testar são os seguintes:

- Meio QL suplementado com GA₃ (0,1 mg/L), BAP (1 mg/L) e 2,4-D (0,02 mg/L)
- Meio MM suplementado com IAA (2 mg/L), cinetina (2 mg/L) e Ads (80 mg/L);
- Meio MS suplementado com BAP (0,5 mg/L).

O protocolo relativo à preparação dos meios de cultura encontra-se em detalhe no Anexo 7.2, juntamente com as concentrações necessárias de cada componente.

3.3 Preparação do material vegetal

Antes de ser colocado no meio de cultura para germinação, o material vegetal foi previamente preparado. Ambas as espécies em estudo foram submetidas ao mesmo procedimento, apenas diferindo os tratamentos, em alguns aspetos, no caso de as sementes a tratar serem conservadas ou frescas.

3.3.1. Pré-tratamento

No que respeita ao pré-tratamento das sementes, existem dois procedimentos: a hidratação/extração da semente, consoante o fator estado da semente, e o corte da semente.

No primeiro procedimento, caso a semente seja conservada, esta tem de ser previamente hidratada, durante um certo período de tempo. Neste estudo, existiram as seguintes variantes para este processo: hidratação em água por 24/48 horas e hidratação em fungicida por 1 hora. Por outro lado, nas sementes frescas, após colheita do fruto procedeu-se à extração da semente, esmagando os frutos manualmente, com recurso de um coador, enquanto incidia água corrente sobre os mesmos, com o objetivo de remover toda a polpa e resíduos para obtenção de sementes limpas e prontas a iniciar o processo seguinte, a desinfeção.

Quanto ao segundo procedimento do pré-tratamento, este foi feito após a desinfeção superficial das sementes, quer conservadas quer frescas, consistindo num corte transversal ao eixo embrionário, na extremidade cotiledonar da semente sem atingir os cotilédones (Figura 5), método testado com sucesso por Lim & Knight (2000), Mian et al. (1995) e Nesme (1985), como mencionado na secção 2.5.1.2. Este corte remove o tegumento, quebrando assim a barreira física da semente facilitando a sua imbibição e, conseqüentemente, a sua germinação. Este corte foi feito, com o auxílio de uma lupa binocular e com as sementes colocadas em filme líquido, tendo sido testados três tipos de filme, em água esterilizada, em ácido ascórbico e em fungicida (carbendazime a 10 mg/ml, sendo importante denotar que este fungicida se encontra

proibido na UE, pelo que apenas pode ser utilizado em investigação para fins experimentais e com condições controladas).

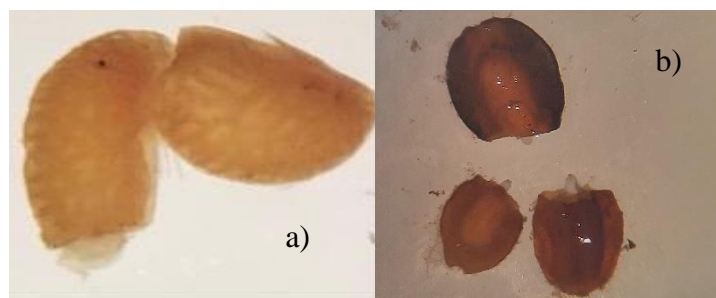


Figura 5 – Corte da semente, transversal ao eixo embrionário. Semente de framboesa (a) e semente de camarinha (b).

3.3.2. Desinfecção superficial

Finalizado o pré-tratamento das sementes, procede-se à desinfecção das mesmas. Este fator é um dos fatores a ser testado para a obtenção do melhor protocolo de germinação, pelo que foram desenvolvidos vários métodos de desinfecção, durante o ensaio 1, de modo a definir o ideal para ser utilizado nos restantes ensaios a desenvolver.

Assim, foram testados dois métodos de desinfecção adaptados da bibliografia e um terceiro, desenvolvido após testagem dos anteriores cujos resultados não foram os esperados, resultante da adaptação dos dois primeiros métodos. Em todos os métodos testados foi utilizada a mesma solução de desinfecção cuja constituição consiste em 20% de lixívia comercial, 80% de água esterilizada e 0,1% de Triton X-100, um surfactante que tem como função aumentar a adesividade. Os métodos de desinfecção testados foram os seguintes:

- Desinfecção segundo Mian et al. (1995), consiste em desinfetar as sementes em solução de desinfecção, agitando por 10 minutos e, de seguida, proceder à lavagem das sementes em água esterilizada, por 4 vezes, agitando durante 2 minutos cada.
- Desinfecção segundo Ismaini et al. (2017b), cujo procedimento consiste em lavar as sementes em água esterilizada, por 2 vezes, agitando durante 5 minutos cada. Passar as sementes por solução de etanol 70%, por um minuto agitando. Proceder à lavagem das mesmas com água esterilizada, agitando por 2 minutos. Colocar duas vezes as sementes em solução de desinfecção, a agitar, por 10 minutos cada. Por fim, efetuar a lavagem das sementes em água esterilizada por 3 vezes, agitando durante 5 minutos cada.
- Desinfecção combinada, desenvolvida com base nas anteriores, que consiste em fazer a lavagem das sementes, por 2 vezes, em água esterilizada, agitando durante

5 minutos cada. Passagem das mesmas 2 vezes, em solução de desinfecção, agitando por 10 minutos cada. Finalização da desinfecção com a lavagem das sementes em água esterilizada, 3 vezes, agitando por 5 minutos cada.

De maneira a complementar a desinfecção superficial, foi também testada a ação de um fungicida – carbendazime (10 mg/ml) - tanto no meio como na semente, e de um antibiótico – canamicina na concentração 10 µg/ml. Assim, foram desenvolvidos e testados sete tratamentos possíveis de desinfecção:

D0 – sem qualquer método de desinfecção e aplicação de antibiótico – colocação das sementes em antibiótico por 2 minutos, após corte das mesmas;

D1 – método de desinfecção de Mian et al. (1995) e aplicação de antibiótico;

D2 - método de desinfecção de Mian et al. (1995);

D3 - método de desinfecção de Ismaini et al. (2017b);

D4 - método de desinfecção de Ismaini et al. (2017b) e aplicação de fungicida no meio de cultura antes da colocação das sementes na placa – proceder ao espalhamento de 75 µl de fungicida na placa de Petri;

D5 – método de desinfecção combinada, aplicação de fungicida no meio de cultura antes da colocação das sementes no meio e adição de uma gota de fungicida em cima de cada semente quando colocada na placa;

D6 - método de desinfecção combinada e adição de uma gota de fungicida em cima de cada semente quando colocada no meio.

Através da testagem das diferentes possibilidades, definiu-se o método de desinfecção D5 e D6 como os métodos a utilizar nos restantes ensaios do estudo, por serem os mais eficazes (ver secção 4.1.1 sobre o método de desinfecção utilizado), quer a nível de contaminações quer a nível de sucesso na germinação. Optou-se pela escolha dos dois métodos de desinfecção com maior sucesso de modo a existir um meio de comparação para este fator em ensaios futuros.

3.4 Sementeira em placas de Petri

Concluída a preparação da semente, procedeu-se à colocação da mesma no meio de cultura para germinação. Este procedimento foi feito em câmara de fluxo laminar, com recurso a material esterilizado, onde as sementes foram dispostas na placa de Petri (9 cm de diâmetro), previamente preparada com o meio respetivo, com o auxílio de uma pinça, sendo colocadas 25-30 sementes por placa, consoante o espaço deixado entre as mesmas. Finalizada a colocação, selou-se a mesma com parafilme, identificando-a para o acompanhamento do ensaio.

Inicialmente, optou-se por testar os meios de cultura em estudo com sacarose, verificando-se que, mesmo com o melhor método de desinfecção, as contaminações nas placas de Petri persistiam, mesmo que em menores quantidades (ver secção 4.1.2 dos resultados e discussão). Assim, para mitigar ao máximo as contaminações, os restantes ensaios foram realizados em meio de cultura sem sacarose.

3.5 Aclimatização

Caso ocorra germinação – considera-se que a semente germinou quando a radícula emergida é ≥ 1 mm (Lisboa, 2017; Santos et al., 2014) – as sementes germinadas são repicadas do meio de cultura do ensaio respetivo para outro local passando assim para a fase de aclimatização da estrutura germinada, fase na qual se promove o desenvolvimento e crescimento do embrião de forma a obter uma plântula viável para o programa de melhoramento. A repicagem das sementes germinadas é feita para um meio de crescimento, que varia consoante a modalidade de aclimatização em estudo.

Numa primeira fase, no decorrer do ensaio 1, todas as sementes foram repicadas para o meio MS suplementado com BAP (0,5 mg/L), por este ser um meio de sucesso para a espécie em ensaio. No entanto, não tendo sido obtidos bons resultados, optou-se por fazer as repicagens para o meio de cultura utilizado na germinação, com a diferença de que nesta fase, o meio contém sacarose.

Posteriormente, de modo a avaliar a viabilidade das culturas *in vivo* foram testados meios alternativos, os substratos para desenvolvimento das plântulas. Recorreu-se a diferentes tipos de substratos, tais como a turfa, a perlite e a vermiculite bem como misturas dos mesmos, tendo estes sido humedecidos com meio de cultura ou água esterilizada. Os substratos utilizados foram previamente esterilizados em autoclave nas condições mencionadas anteriormente.

As modalidades de aclimatização testadas para todos os ensaios de germinação encontram-se na secção 3.6.1, respeitante à organização dos mesmos.

3.6 Ensaios realizados

3.6.1. Germinação das sementes

Relativamente à organização dos ensaios de germinação das sementes, estes resultam na testagem de diferentes combinações possíveis entre diversos fatores, sendo eles o pré-tratamento, o tipo de desinfecção superficial da semente, o filme líquido onde é efetuado o corte da semente e o meio de cultura utilizado.

O ensaio 1, correspondente à framboesa conservada, teve início em abril, tendo como prioridade, em primeiro lugar, a definição do melhor método de desinfecção, isto é, o método com o qual se obteriam maiores taxas de germinação com o menor número de contaminações possível, pelo que foram testados 6 métodos de desinfecção diferentes. Simultaneamente, avaliou-se também o fator meio de cultura, pré-tratamento e filme líquido utilizado para o corte da semente, de modo a analisar estes fatores para a espécie e estado de conservação relativa a este ensaio.

A testagem dos diferentes tratamentos foi realizada para o meio de cultura QL, com sacarose (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8) e sem sacarose (T9 e T10) e, meio de cultura MM sem sacarose (T11 e T12). As modalidades testadas, bem como o número de sementes submetidas ao ensaio 1, encontram-se apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Tratamentos realizados no ensaio 1, com sementes de framboesa conservada, em meio de cultura QL, com e sem sacarose, e em meio de cultura MM sem sacarose.

Modalidades	Pré-tratamento	Desinfecção	Filme líquido	Meio de cultura	Nº sementes
T1	Hidratação - 24h água	D0	Água	QL	18
T2	Hidratação - 24h água	D1	Água	QL	89
T3	Hidratação - 24h água	D2	Água	QL	49
T4	Hidratação - 24h água	D3	Água	QL	50
T5	Hidratação - 24h água	D4	Fungicida	QL	113
T6	Hidratação - 1h fungicida	D4	AA	QL	24
T7	Hidratação - 24h água	D4	AA	QL	49
T8	Hidratação - 24h água	D5	Fungicida	QL	356
T9	Hidratação - 24h água	D6	Fungicida	QL _S	374
T10	Hidratação - 24h água	D6	Fungicida	QL _{SA}	23
T11	Hidratação - 24h água	D6	Fungicida	MM _S	442
T12	Hidratação - 24h água	D5	Fungicida	MM _S	240

Definido o método de desinfecção a utilizar para os restantes ensaios, iniciou-se em outubro, o ensaio 2, relativo à framboesa fresca. Neste, foram testadas duas variedades de framboesa, a 8F471 e a Clarita, estando este ensaio dividido segundo as variedades em estudo da seguinte forma:

Ensaio 2.1 – Tratamentos realizados a sementes de framboesa fresca, da variedade 8F471, com a testagem de duas datas de colheita dos frutos, de modo a avaliar o estado de maturação dos mesmos, e a testagem dos dois meios de cultura a avaliar. As modalidades relativas a este ensaio são as seguintes: F1, F2, F3 e F4.

Ensaio 2.2 - Tratamentos realizados a sementes de framboesa fresca, da variedade Clarita, com a testagem de dois métodos distintos na escarificação mecânica, bem como a testagem dos dois meios de cultura em estudo. As modalidades presentes neste ensaio são: F5, F6, F7 e F8.

Relativamente à avaliação dos métodos efetuados na escarificação, as modalidades F5 e F7, correspondem à colocação das sementes em água esterilizada, após o corte das mesmas, durante 24 horas, de modo a permitir o alongamento e exposição da radícula antes de as colocar em meio de cultura, enquanto a modalidade F6 e F8, são referentes à testagem da extração do embrião da semente, após as 24 horas em água, com a colocação do mesmo no meio.

As modalidades de tratamentos testadas no ensaio 2, encontram-se apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Tratamentos efetuados no ensaio 2, para sementes de framboesa fresca, de duas variedades distintas, a 8F471 (ensaio 2.1) e a Clarita (ensaio 2.2), em meio de cultura QL_S e meio de cultura MM_S.

Modalidades	Variedade	Data Colheita	Pré-tratamento	Desinfecção	Filme líquido	Meio de cultura	Nº sementes
F1	8F471	07/10/2021	Extração semente	D6	Fungicida	QL _S	243
F2	8F471	11/10/2021	Extração semente	D6	Fungicida	QL _S	318
F3	8F471	07/10/2021	Extração semente	D6	Fungicida	MM _S	299
F4	8F471	11/10/2021	Extração semente	D6	Fungicida	MM _S	243
F5	Clarita	20/10/2021	Extração semente	D6	Fungicida	MM _S	202
F6	Clarita	20/10/2021	Extração embrião	D6	Fungicida	MM _S	36
F7	Clarita	20/10/2021	Extração semente	D6	Fungicida	QL _S	217
F8	Clarita	20/10/2021	Extração embrião	D6	Fungicida	QL _S	33

O ensaio 3, iniciado em novembro, tratou da testagem dos diferentes tratamentos efetuados para as sementes da outra espécie em estudo, a camarinha. Estas sementes encontravam-se conservadas a frio (4°C). As modalidades referentes a este ensaio encontram-se apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3 – Tratamentos efetuados no ensaio 3, com sementes de camarinha conservada, em meio de cultura MM_S (ensaio 3.1) e em meio de cultura QL_S (ensaio 3.2).

Modalidade	Pré-tratamento	Desinfecção	Filme líquido	Meio de cultura	Nº sementes
C1	Hidratação - 24h água	D6	Fungicida	MM _S	93
C2	Hidratação - 48h água	D6	Fungicida	MM _S	152
C3	Hidratação - 24h água	D5	Fungicida	QL _S	107
C4	Hidratação - 48h água	D6	Fungicida	QL _S	149

Por último, foi efetuado em novembro, o ensaio 4, tendo este sido realizado com as sementes e o tratamento de maior sucesso até à data de modo a proceder à testagem de diversas modalidades de aclimatização por forma a determinar qual o melhor método a utilizar nesta fase. As modalidades testadas neste ensaio encontram-se no Quadro 4.

Quadro 4 – Tratamentos efetuados no ensaio 4, com sementes de framboesa conservadas, em meio de cultura MM_S (ensaio 4.1) e em meio de cultura QL_S (ensaio 4.2).

Modalidade	Pré-tratamento	Desinfecção	Filme líquido	Meio de cultura	Nº sementes
A1	Hidratação - 1h água	D6	Fungicida	MM _S	195
A2	Hidratação - 1h água	D6	Fungicida	QL _S	146

3.6.2. Aclimatização

O ensaio 5, correspondente à fase de aclimatização das estruturas germinadas e subsequente desenvolvimento das plântulas resultantes das sementes, decorreu durante todo o tempo de ensaios, de abril a dezembro. Este ensaio encontra-se dividido da seguinte forma:

Ensaio 5.1 – Aclimatização com transferência sequencial para diferentes meios de cultura *in vitro* até à passagem final para meio *ex vitro*. Este ensaio encontra-se dividido em duas fases: uma primeira, onde se efetuou a passagem das sementes germinadas para meio de cultura, com sacarose, de modo a promover o seu desenvolvimento em plântulas; uma segunda fase, onde após o desenvolvimento de folhas cotiledonares, as plântulas foram transferidas para outro meio de cultura para completar o seu desenvolvimento, através da formação de um maior número de raízes e do desenvolvimento de folhas verdadeiras. Este ensaio, descrito no ponto 3.6.2.1, foi realizado simultaneamente com todos os ensaios para a germinação pelo que se encontra organizado de acordo com a espécie e o estado de conservação das sementes em estudo.

Ensaio 5.2 – Aclimatização com transferência direta de meio de cultura *in vitro* para meio *ex vitro*. Este ensaio decorreu em dezembro por se verificar que o ensaio 5.1 não estava a obter os resultados pretendidos, consistindo na testagem da transição direta da semente germinada para um substrato, previamente esterilizado, em frasco. Estes frascos são submetidos condições ambiente minimamente controladas para promover uma rápida e eficaz adaptação ao meio *ex vitro*. Para este ensaio foram testadas diversas modalidades, com variações no substrato utilizado e no meio de cultura para humedecimento deste, estando as mesmas descritas no ponto 3.6.2.2.

É ainda de referir que o número de sementes testadas em cada modalidade do ensaio 5.1 não é mencionado pelo facto de as sementes passarem por diferentes modalidades ao longo do tempo, conforme o seu desenvolvimento. No entanto, refere-se a totalidade de sementes germinadas submetidas ao mesmo.

3.6.2.1. Transferência sequencial de meio *in vitro* para *ex vitro* (ensaio 5.1)**Framboesa conservada**

No que respeita à aclimatização das sementes de framboesa conservada germinadas no ensaio 1, foram testados como meio de aclimatização na primeira fase:

- o meio MS suplementado com BAP (0,5 mg/L);
- o meio de cultura MM com sacarose para as sementes germinadas em meio de cultura MM_S;
- o meio de cultura QL, para as sementes germinadas do meio de cultura QL_S;
- substrato (turfa), onde se iniciou a testagem da viabilidade de plântulas (com folhas cotiledonares desenvolvidas) para a sobrevivência em meio *ex vitro*, sendo este humedecido com meio de cultura líquido.

Na segunda fase foi testado o meio de cultura MS suplementado com BAP (0,5 mg/L), em frasco ou tubo de ensaio, consoante o número de plântulas a transferir para esta fase.

No total, foram testadas, nas diferentes modalidades, 705 sementes germinadas em meio de cultura QL (com e sem sacarose) e 540 em meio de cultura MM (sem sacarose), encontrando-se no Quadro 5 as modalidades relativas à primeira fase e no Quadro 6, as modalidades para a segunda fase.

Quadro 5 – Modalidades testadas na primeira fase da aclimatização do ensaio 5.1 para a framboesa conservada.

Modalidades	Meio de origem	Meio de aclimatização
G1	QL	MS ₁
G2	QL	QL
G3	QL _S	MS ₁
G4	QL _S	QL
G5	MM _S	MM

Quadro 6 – Modalidades testadas na segunda fase da aclimatização do ensaio 5.1 para a framboesa conservada.

Modalidades	Meio de origem	Meio de aclimatização	
		Substrato	Meio de cultura
G6	QL	-	MS ₂
G7	MM _S	-	MS ₂
G8	MM _S	-	MS ₃
G9	MM _S	Turfa	QL _{SA}

Framboesa Fresca

As sementes de framboesa fresca germinadas foram submetidas à fase de aclimatização realizada no ensaio 5.1, encontrando-se, tal como nos ensaios relativos à germinação, divididas por variedade em estudo.

Variedade 8F471

Neste ensaio, foram testados como meio de aclimatização para a primeira fase:

- o meio de cultura semelhante ao meio de germinação respetivo, com a adição de sacarose;
- substrato humedecido com meio de cultura MM líquido, sendo testados a vermiculite e a perlite. Para as modalidades testadas com substrato há que mencionar as diferenças relativas às condições de cultura a que foram sujeitas, sendo que para as modalidades X2, X3, X7 e X8, o ensaio decorreu em placa de Petri fechada (sem selar com parafilme) enquanto para as modalidades X4 e X5, o ensaio foi realizado em cuvete plástica coberta com película aderente.

Na segunda fase foi testado o meio MS suplementado com BAP (0,5 mg/L), em frasco ou tubo de ensaio, tal como no ensaio descrito anteriormente. Assim, para esta variedade, foram testadas 253 germinadas em meio de cultura MM e 186 germinadas em meio de cultura QL, estando as modalidades testadas apresentadas no Quadro 7.

Quadro 7 – Modalidades testadas na primeira e segunda fase da aclimatização do ensaio 5.1 para a variedade 8F471 de framboesa fresca.

Fase de aclimatização	Modalidades	Meio de origem	Meio de aclimatização	
			Substrato	Meio de cultura
1	X1	MM _S	-	MM
	X2	MM _S	Vermiculite	MM _A
	X3	MM _S	Perlite	MM _A
	X4	MM _S	Vermiculite	MM _A
	X5	MM _S	Perlite	MM _A
	X6	QL _S	-	QL
	X7	QL _S	Vermiculite	MM _A
	X8	QL _S	Perlite	MM _A
2	X9	MM _S	-	MS ₂
	X10	MM _S	-	MS ₃
	X11	QL _S	-	MS ₃

Variedade Clarita

Para esta variedade de framboesa fresca, o ensaio de aclimatização foi realizado com 75 sementes germinadas em meio de cultura MM_S e 116 sementes germinadas em meio de cultura QL_S. Os meios de aclimatização testados foram os mesmos que para a variedade anterior, sendo que nenhum dos explantes seguiu para a segunda fase. Nas modalidades Z2, Z3, Z5 e Z6, o substrato foi colocado em placa de Petri fechada (sem selar com parafilme). As modalidades testadas encontram-se no Quadro 8.

Quadro 8 – Modalidades testadas na primeira fase da aclimatização do ensaio 5.1 para a variedade Clarita de framboesa fresca.

Modalidades	Meio de origem	Meio de aclimatização	
		Substrato	Meio de cultura
Z1	MM _S	-	MM
Z2	MM _S	Perlite	MM _A
Z3	MM _S	Vermiculite	MM _A
Z4	QL _S	-	QL
Z5	QL _S	Perlite	MM _A
Z6	QL _S	Vermiculite	MM _A

Camarinha conservada

As sementes de camarinha germinadas no ensaio 3, foram submetidas à primeira fase de aclimatização cujo meio utilizado foi o mesmo da germinação, sendo as sementes germinadas no meio de cultura QL_S aclimatizadas no meio de cultura QL e, as sementes germinadas no meio de cultura MM_S aclimatizadas em meio de cultura MM. Não existiu segunda fase de aclimatização por nenhum explante ter sobrevivido à primeira.

Na totalidade, foram testadas 82 sementes germinadas em meio QL e 26 em meio MM, estando as modalidades representadas abaixo, no Quadro 9.

Quadro 9 – Modalidades testadas na primeira fase da aclimatização do ensaio 5.1 para a camarinha conservada.

Modalidades	Meio de origem	Meio de cultura
B1	MM _S	MM
B2	QL _S	QL

3.6.2.2. Transferência direta de meio *in vitro* para *ex vitro* (ensaio 5.2)

O ensaio 4 foi realizado de forma a testar diversas modalidades de aclimatização para obtenção do melhor protocolo de germinação das sementes de framboesa conservada – espécie e estado de conservação com melhores resultados (ver ponto 4.1.2 e 4.3) – com todas as fases da mesma, desde a germinação à passagem das plântulas viáveis resultantes para condições *ex vitro*, tendo sido desenvolvido o ensaio 5.2 para a testagem de uma abordagem diferente à aclimatização.

Neste ensaio foram testadas 111 sementes germinadas em meio de cultura QL_S e 146 sementes germinadas em meio de cultura MM_S. Quanto às modalidades de substrato, tendo em consideração a bibliografia estudada e as propriedades dos diferentes substratos analisados, escolheram-se 5 diferentes para este ensaio. Assim, foram testados 6 meios de aclimatização:

- Substrato de turfa;
- Substrato de perlite;
- Substrato de vermiculite;
- Mistura de substrato de turfa e perlite;
- Mistura de substrato de turfa e vermiculite;
- Meio de cultura MS suplementado com BAP (0,5 mg/L), de forma a ter uma modalidade semelhante ao ensaio 5.1, com a transição para meio de cultura sólido, para comparação dos ensaios.

Cada substrato foi humedecido com meio de cultura QL_{SA}, caso as sementes germinadas fossem oriundas de meio de cultura QL_S ou com meio de cultura MM_{SA}, se as sementes germinadas tivessem origem no meio de cultura MM_S, de modo a fornecer um maior aporte de nutrientes aos explantes para um maior sucesso da aclimatização.

Todos os meios de aclimatização foram colocados em frascos fechados, levemente, de forma a deixar entrar oxigénio para dentro dos mesmos. As modalidades testadas são apresentadas no Quadro 10.

Quadro 10 – Modalidades testadas na fase de aclimatização do ensaio 5.2 para a framboesa conservada.

Modalidades	Meio de origem	Meio de aclimatização	
		Substrato	Meio de cultura
M1	MM _S	-	MS ₃
M2	MM _S	Turfa	MM _{SA}
M3	MM _S	Turfa + Vermiculite	MM _{SA}
M4	MM _S	Turfa + Perlite	MM _{SA}
M5	MM _S	Vermiculite	MM _{SA}
M6	MM _S	Perlite	MM _{SA}
M7	QL _S	-	MS ₃
M8	QL _S	Turfa	QL _{SA}
M9	QL _S	Turfa + Vermiculite	QL _{SA}
M10	QL _S	Turfa + Perlite	QL _{SA}
M11	QL _S	Vermiculite	QL _{SA}
M12	QL _S	Perlite	QL _{SA}

3.7 Medições

No que respeita ao acompanhamento dos ensaios, tanto as placas de Petri em ensaio para avaliação da germinação como as placas de Petri em aclimatização, são sujeitas às seguintes condições de cultura: temperatura entre 20 e 22°C e luminosidade natural. As condições de cultura eram para ser avaliadas com a testagem de alterações nas mesmas, a nível de temperatura, luminosidade, fotoperíodo e humidade relativa de forma a determinar quais as condições ótimas para a maximização das taxas de germinação e, posteriormente, das taxas de viabilidade na aclimatização das duas espécies em estudo. No entanto, a câmara de crescimento encontrava-se avariada no decorrer dos ensaios, não tendo sido possível o seu arranjo devido a limitações impostas pelo covid 19, impedindo a testagem deste fator no estudo. Assim sendo, como os ensaios decorreram sujeitos às condições ambiente e suas oscilações, os resultados obtidos podem ter sido influenciados pela negativa visto que as condições de cultura são um fator de forte influência na germinação, principalmente a temperatura.

No que respeita aos substratos para desenvolvimento das plântulas utilizados na aclimatização, estes foram mantidos sob as mesmas condições das placas de Petri, com a diferença de que foram mantidos humedecidos com recurso a água esterilizada/ meio de cultura.

Cada placa de Petri foi monitorizada semanalmente, sendo efetuados os registos relativos às sementes germinadas bem como possíveis contaminações nas placas. Quando ocorreu germinação, as estruturas respetivas foram repicadas para placa de Petri ou substrato (consoante a modalidade de aclimatização a testar), passando para a fase de aclimatização. Nesta fase, os

explantes são, também, monitorizados semanalmente, procedendo-se aos registos relativos a contaminações, desenvolvimento da radícula e crescimento da plântula.

De modo a proceder à análise e quantificação relativa à germinação das sementes em estudo, os resultados são expressos em:

- Percentagem de sementes germinadas - calculada para cada placa em ensaio sendo posteriormente efetuada a média consoante os fatores a analisar

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ total de sementes germinadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de sementes}} \times 100$$

- Velocidade de germinação (em dias) – calculada para cada placa em ensaio sendo posteriormente efetuada a média consoante os fatores a analisar

$$(\text{Dia do início do ensaio} - \text{Dia da 1}^\text{a} \text{ germinação})$$

- Duração do ensaio (em dias) – calculada para cada placa em ensaio sendo posteriormente efetuada a média consoante os fatores a analisar

$$(\text{Dia do início do ensaio} - \text{Dia do fim do ensaio})$$

- Percentagem de sementes para aclimatização – calculada para cada placa em ensaio sendo posteriormente efetuada a média consoante os fatores a analisar

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ sementes transferidas para aclimatização}}{\text{N}^\circ \text{ de sementes inicial}} \times 100$$

Para proceder à análise e quantificação das variáveis em estudo para a aclimatização, os resultados são expressos em:

- Taxa de viabilidade das plântulas germinadas - calculada para cada placa em ensaio sendo posteriormente efetuada a média consoante os fatores a analisar

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de plântulas viáveis}}{\text{N}^\circ \text{ total de sementes germinadas}} \times 100$$

- Duração do ensaio (em dias) – calculada para cada placa em ensaio sendo posteriormente efetuada a média consoante os fatores a analisar

$$(\text{Dia do início do ensaio} - \text{Dia do fim do ensaio})$$

3.8 Tratamento estatístico

Para o tratamento estatístico dos resultados, efetuou-se uma análise através de testes não-paramétricos devido à heterogeneidade das amostras existentes em cada modalidade testada. As análises estatísticas dos dados foram efetuadas com o software R (<https://www.r-project.org/>), através do teste de Kruskal-Wallis, com um nível de significância para todas as análises de 0,05.

Para os ensaios relativos à germinação (ensaio 1, 2, 3 e 4), fez-se a análise das variáveis taxa de germinação, velocidade de germinação, duração do ensaio e percentagem de sementes transferidas para aclimatização. Estas variáveis foram analisadas estatisticamente para diversos fatores consoante o ensaio em estudo, assim:

Ensaio 1 - pré-tratamento, método de desinfecção, filme líquido para corte da semente e meio de cultura;

Ensaio 2 - meio de cultura, para ambas as variedades em estudo; data de colheita, para a variedade 8F471 e pré-tratamento (para analisar o método de escarificação mecânica), para a variedade Clarita;

Ensaio 3 - pré-tratamento, método de desinfecção e meio de cultura;

Ensaio 4 - meio de cultura.

Nos ensaios respeitantes à aclimatização (ensaio 5.1 e 5.2), foi efetuada a análise às variáveis taxa de viabilidade e duração do ensaio para os fatores meio de cultura e substrato.

Todas as variáveis testadas foram transformadas antes de ser efetuados os testes não-paramétricos para se trabalhar com variáveis contínuas. Assim, utilizou-se a função arcsen para as variáveis taxa de germinação, percentagem de sementes para aclimatização e taxa de viabilidade e a função raiz quadrada para as variáveis duração do ensaio e velocidade de germinação.

4. Resultados e discussão

4.1 Germinação das sementes de framboesas conservadas

Com o objetivo de obter o protocolo de germinação mais eficiente foram testados, em ensaios preliminares, a framboesa conservada e diferentes parâmetros para definir qual o procedimento a seguir nos restantes ensaios. Estes ensaios tiveram como principal foco os pré-tratamentos, sendo o meio de cultura utilizado o meio QL, com e sem sacarose, até estabelecimento do protocolo para avançar para a análise dos outros fatores. Ao implementar diferentes modalidades a cada caso, cada modalidade foi sendo eliminada à medida que se verificava a falha de algum dos fatores em análise, permitindo, deste modo, chegar a um protocolo mais consistente, quer em termos de pré-tratamentos, quer em termos de meio.

O tratamento estatístico reflete todo o ensaio referente à framboesa conservada (ensaio 1), sendo que, por nem sempre existir o mesmo número de sementes em cada uma das modalidades - pela disponibilidade do material vegetal e pela necessidade de se testar diferentes modalidades - foram realizados testes não-paramétricos, de modo a ultrapassar a limitação da heterogeneidade das amostras em cada modalidade.

Os resultados dos diferentes ensaios são analisados em conjunto de modo a determinar quais os pré-tratamentos para todos os ensaios bem como qual o meio de cultura mais eficaz para esta espécie e estado de conservação. Na fase final dos ensaios foi ainda efetuado o ensaio 4 (modalidades A1 e A2), com a framboesa conservada, para proceder à testagem de diferentes modalidades de aclimatização e, confirmar os resultados obtidos no ensaio 1.

É ainda de referir que, como mencionado na secção 3.7, o fator condições de cultura não pôde ser testado, evidenciando a possibilidade de terem ocorrido efeitos tanto positivos como negativos do mesmo nas taxas de germinação, que não puderam ser contabilizados. De acordo com diversos autores (Bewley et al., 2013; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Yan & Chen, 2020), a temperatura pode influenciar fortemente a taxa e o tempo de germinação, sendo que as temperaturas ótimas para a maior taxa de germinação no menor tempo rondam os 20-30°C, temperaturas que foram atingidas. Também, segundo Edwards (1932), as taxas de germinação são mais elevadas quando existem alterações nas temperaturas diárias, o que se verificou, pela oscilação nas temperaturas consequentes do facto de não se conseguir controlar as mesmas, podendo ter tido um efeito positivo na germinação.

4.1.1. Efeitos da preparação do material vegetal na germinação

Pré-tratamentos utilizados nos ensaios

Relativamente aos pré-tratamentos, foram analisados dois parâmetros: a solução de hidratação e a solução de corte.

Para a solução de hidratação, foram testadas duas opções – hidratação durante 24 horas em água esterilizada (T1, T2, T3, T4 e T5, T7, T8 e T9) e hidratação por 1 hora em fungicida (T6) – nas quais não se verificaram diferenças significativas nos resultados estatísticos obtidos para a taxa de germinação, velocidade de germinação, duração do ensaio e percentagem de sementes para aclimatização. A modalidade T6 obteve, tendencialmente, menores taxas de germinação (em média, 50% de germinação enquanto as restantes obtiveram uma média de 66,5%), tendo o ensaio uma duração superior às restantes para atingir taxas de germinação inferiores (duração média de 59 dias enquanto as outras modalidades duraram, em média, 41 dias). A velocidade de germinação foi substancialmente menor demorando 14 dias para a primeira germinação, fator que levou ao descarte desta opção como solução de hidratação.

Segundo Baskin & Baskin (2014), para que a imbibição da semente e, conseqüentemente, o início da germinação ocorra é essencial tanto um nível adequado de hidratação como a permeabilidade das sementes à água. Nos ensaios realizados, procedeu-se, nas sementes conservadas, ao processo de hidratação das sementes por 24 horas e, como se pôde observar, quando sujeitas à hidratação, as sementes aumentaram o seu volume indicando a sua permeabilidade e germinaram com sucesso, evidenciando a correta imbibição.

No que respeita a solução de corte, foram avaliadas como possibilidade três soluções diferentes – água (T1, T2, T3, T4), fungicida (T5, T8 e T9) e ácido ascórbico (T6 e T7). Tendo em conta os resultados obtidos (Quadro 16, Anexo 7.3), verificou-se que o fungicida será a melhor opção, sendo o que apresentou melhores resultados a nível de taxas de germinação e percentagem de sementes para aclimatização (em média, 70% para cada variável). O ácido ascórbico apresentou os piores resultados, com taxas de germinação e, conseqüentemente, percentagem de sementes para aclimatização, na ordem dos 40%.

Analisando a Figura 6 pode interpretar-se que, ao contrário do verificado nos resultados referentes ao tratamento de médias, a solução de corte mais favorável à germinação seria a água. Esta apresenta 50% das amostras entre os 80 e os 100% de germinação, enquanto o fungicida tem 50% das amostras entre 45 e 80% e o ácido ascórbico entre os 40 e 50%. No entanto, verifica-se também que a água tem amostras com germinações de 40% bem como outliers, que mostram a sua instabilidade como solução de corte. Tendo em conta que não se consegue garantir um nível de contaminações aceitável, a água torna-se uma opção inviável pelo facto

de, na existência de sementes (muito) contaminadas, não impedir a propagação dessas contaminações, ao contrário do fungicida, que consegue limitá-las sendo uma garantia maior para níveis mais altos de contaminação, como os obtidos. Isto é confirmado pelos resultados mais homogêneos do fungicida, bem como os dados do tratamento estatístico referente à comparação de médias.

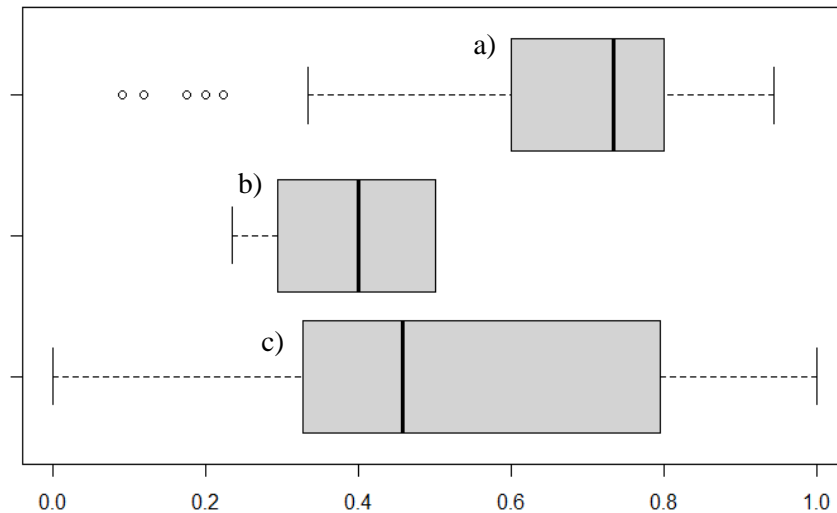


Figura 6 – Caixa de bigodes relativa às taxas de germinação das sementes de framboesa conservada em função da solução de corte utilizada: água (a), ácido ascórbico (b) e fungicida (c).

Método de desinfecção utilizado

De modo a estabelecer o método de desinfecção mais eficiente, foram analisadas as seguintes variáveis: taxa de germinação, velocidade de germinação, duração do ensaio e percentagem de sementes transferidas para a fase de aclimatização (variáveis quantitativas analisadas estatisticamente) (Quadro 11), bem como a variável qualitativa contaminações (Figura 7).

Pelo facto de todas as variáveis serem essenciais no sucesso do método de desinfecção, são deste modo analisadas em conjunto, sendo por isso, a decisão final do método de desinfecção a utilizar, o resultado do equilíbrio entre as mesmas.

É de referir que nos quadros das variáveis quantitativas, as letras não correspondem exatamente aos valores adjacentes, mas sim ao resultado do teste Kruskal-Wallis, i.e., os valores presentes são referentes às médias e as letras são relativas ao teste de comparações múltiplas associado ao teste não-paramétrico.

Quadro 11 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização de cada método de desinfecção testado no ensaio 1, com framboesa conservada.

Desinfecção	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
D0	0,0 C	0,0 C	8,0 C	0,0 C
D1	55,2 BC	5,6 C	36,0 ABC	52,2 BC
D2	86,1 A	9,3 A	59,7 A	86,1 A
D3	49,5 ABC	8,0 AB	29,0 BC	49,5 ABC
D4	42,8 C	9,4 BC	49,0 AB	39,2 C
D5	68,4 AB	6,6 C	36,4 BC	68,4 AB
D6	75,9 A	7,0 AB	44,2 ABC	75,9 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha = 0,05$. Alguns dos valores, relativos ao método D6, não foram considerados em virtude de terem sofrido uma anomalia pelo surgimento de dificuldades logísticas de acesso ao ISA (covid-19), num determinado período, não sendo assim representativos.

Como se pode verificar pelos resultados obtidos, a testagem do método de desinfecção D0, serviu apenas para confirmar que não seria viável para o objetivo pretendido não proceder à desinfecção superficial das sementes, facto evidenciado pela eliminação por contaminação ao fim de 8 dias em ensaios, bem como a percentagem nula de germinação.

No que respeita ao método D2, apesar de ter uma taxa de germinação média de 86,1%, pode constatar-se que é um dos métodos que apresenta maior número de contaminações (Figura 7), menor velocidade de germinação, demorando em média, 9,3 dias até ocorrer a primeira germinação e, maior durabilidade. Sendo os resultados destes três fatores muito distantes dos pretendidos, verificou-se que este método de desinfecção não seria viável para o objetivo pretendido.

Os métodos D1 e D3, apresentaram resultados que ficaram aquém dos pretendidos relativamente às taxas de germinação, tendo obtido, em média, 55,2% e 49,5%, respetivamente, além disso, a nível de contaminações, o método D1 foi o que apresentou mais contaminações (Figura 7), seguido pelo método D3. Com base nos resultados obtidos, estes dois métodos foram retirados do ensaio.

O método D4, apresentou melhores resultados a nível de contaminações, tendo cerca de 67% de placas em ensaio com contaminações, mas tendo sido eliminadas por essa razão cerca de 42% (Figura 24, Anexo 7.3). Por outro lado, foi o método que apresentou, em termos de valores médios, menores taxas de germinação (42,8%), isto pode ser explicado pelo facto de este processo de desinfecção ter uma passagem por etanol a 70%, que poderá levar à secagem da semente e, conseqüente, inibição da sua germinação. Tendo em consideração as baixas taxas de germinação e o facto de ser o método, quando analisados os valores médios, que mais tempo demora até à 1ª germinação, o método D4 foi retirado dos ensaios.

Por fim, os métodos D5 e D6, foram métodos derivados de uma combinação dos processos de desinfecção testados previamente que falharam, mas mostraram potencial para o sucesso do protocolo. Por um lado, o método de Mian et al. (1995) (D1 e D2) provou ter um efeito positivo na taxa de germinação mas um número de contaminações elevado, enquanto o método de Ismaini et al. (2017b) mostrou uma diminuição nas contaminações mas uma redução nas taxas de germinação devido ao uso de etanol. Deste modo, procedeu-se à elaboração de um método de desinfecção combinado, que obtivesse os resultados pretendidos. O método D6 obteve, em média, 75,9% de germinação enquanto o D5 obteve 68,4%, tendo este último uma maior velocidade de germinação, 6,6 dias, em comparação com o D6, que demorou 7 dias a apresentar a 1ª germinação. A nível de contaminações, o D6 foi o que apresentou menor número (47,6%), com 42,8% das placas eliminadas por contaminação (Figura 24, Anexo 7.3), seguido do D5 que apresentou 55,6% de contaminações com 50% das placas eliminadas por essa razão. É ainda de referir que foram os métodos que apresentaram uma maior percentagem de sementes transferidas para a fase de aclimatização, tendo o D6 obtido, em média, 75,9% de sementes para aclimatização e o D5, 68,4%, replicando os valores obtidos para a germinação.

Com os resultados obtidos e, tendo em conta que, em alguns casos, como as camarinhas, havia a necessidade de comparar duas possibilidades de desinfecção diferentes, foi decidido que seriam utilizados o método D5 e D6 para o protocolo de germinação em elaboração. É também de referir que estes dois métodos de desinfecção foram testados em conjunto com o meio de cultura sem sacarose, pela possibilidade do meio rico em açúcares estar a potenciar contaminações, como estas diminuíram, optou-se por manter o uso deste meio nos restantes ensaios.

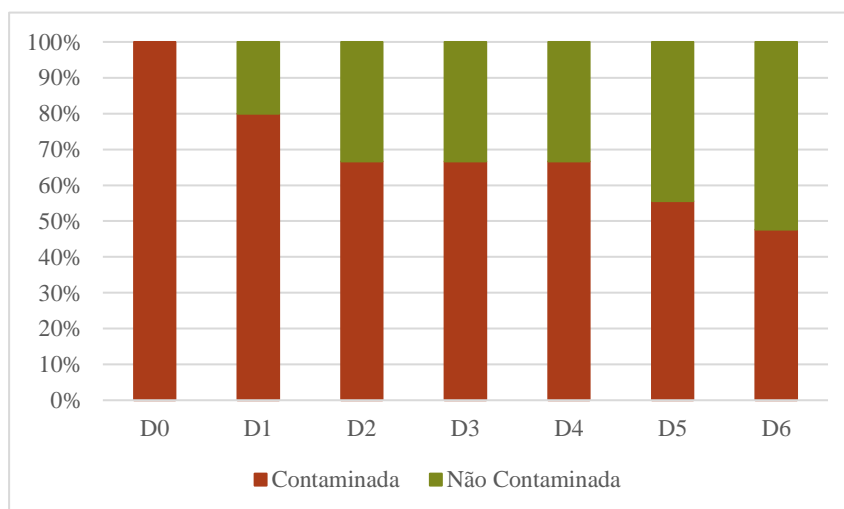


Figura 7 – Percentagem de placas em ensaio com sementes contaminadas, em função do método de desinfecção utilizado em sementes de framboesa conservada.

4.1.2. Efeito do meio de cultura na germinação

No que respeita ao fator meio de cultura, a decisão sobre o mesmo tem em conta as mesmas variáveis que o método de desinfeção, tendo a relação taxa de germinação/velocidade de germinação/duração do ensaio maior peso, pelo facto de se pretender obter elevadas taxas de germinação no mínimo tempo possível e, quanto mais rapidamente ocorre a primeira germinação menos tempo levará o ensaio a decorrer. Os resultados obtidos no ensaio 1 para o meio de cultura, encontram-se apresentados no Quadro 12.

Quadro 12 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada meio de cultura testado no ensaio 1, com framboesa conservada.

Meio	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
QL	56,7 B	7,5 B	41,3 B	55,3 B
QL _S	73,3 AB	7,3 A	52,0 A	73,4 AB
QL _{SA}	56,5 B	5,0 B	17,0 B	56,5 B
MM _S	78,9 A	6,6 B	33,5 B	78,9 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

Pode constatar-se que o meio de cultura com maiores taxas de germinação é, em termos de valores médios, o MM_S (78,9%), tendo uma diferença de 5% para o meio QL_S, o que demonstra que será o meio mais eficiente para o objetivo pretendido.

Quanto à velocidade de germinação verifica-se que o meio MM_S apresenta maior velocidade de germinação que o QL e QL_S, embora o tratamento estatístico sugira que os meios QL, QL_{SA} e MM_S tenham valores equivalentes nesta variável. Assim, pode observar-se que o meio MM_S demora em média 6,6 dias para a primeira germinação, enquanto os meios QL e QL_S rondam os 7/8 dias. Outra constatação relevante é o facto de o ensaio com recurso ao meio de cultura MM_S ter uma duração menor em termos médios que o QL_S e QL, possivelmente pela maior velocidade de germinação, embora em termos estatísticos globais não haja diferenças significativas entre QL, QL_{SA} e MM_S.

O meio QL_{SA}, no qual foi testada uma pequena amostra, foi o meio que obteve a maior velocidade de germinação, no que respeita aos valores médios, tendo a primeira germinação ocorrido aos 5 dias. No entanto, não avançou como possibilidade nos ensaios pelas baixas taxas de germinação (56,5%) e, pela maior dificuldade no manuseamento e monitorização das sementes no mesmo.

Estas observações mostram que, embora não existam diferenças significativas, o meio MMs poderá ser a melhor opção para a germinação de sementes de framboesa conservada, permitindo obter maiores taxas de germinação no menor tempo possível. Isto pode ser confirmado através da observação da evolução das taxas de germinação no decorrer dos ensaios para cada meio (Figura 8), onde se verifica que não só o meio MMs tem a maior taxa de germinação como, no primeiro registo, tem logo uma % média de sementes germinadas muito mais elevada que os restantes meios de cultura (69,4%).

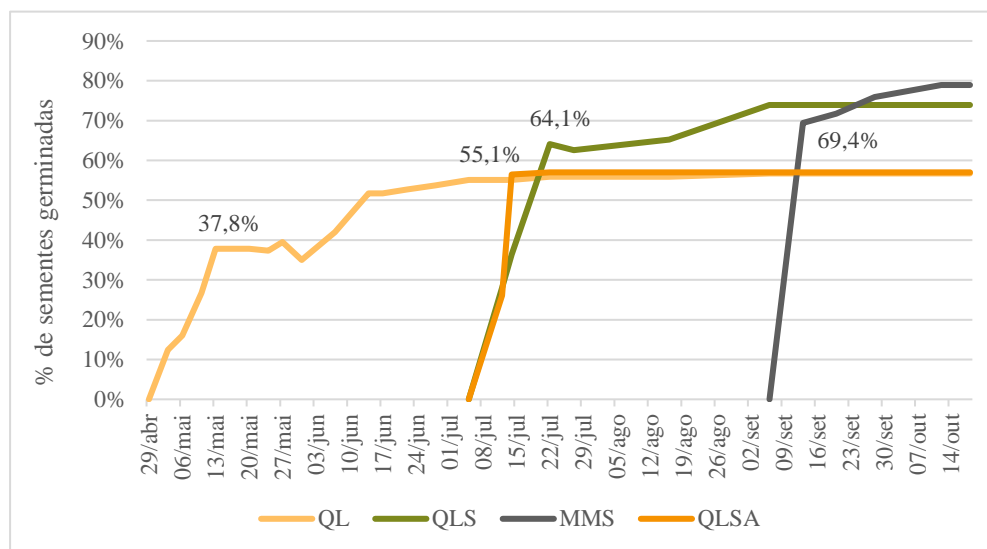


Figura 8 – Taxa de germinação média (em %) ao longo do ensaio 1, em função do meio de cultura. Os registos para o ensaio com o meio QL iniciaram-se no dia 29/4, com o meio QLS e QLSA no dia 12/7 e com o meio MMs no dia 13/9.

No que respeita às contaminações, verificou-se que 49 de 85 placas em ensaio sofreram contaminação (Figura 25a, Anexo 7.3), sendo que 40 das contaminadas foram eliminadas por esta razão (Figura 25b, Anexo 7.3). O meio QL foi o que apresentou o maior número de contaminações (27 placas), isto deve-se provavelmente ao facto de ter sido o meio onde foram testados os diferentes métodos de desinfeção e, por este ter sacarose na sua constituição, promovendo um meio propício à maior propagação de agentes patogénicos. O meio MMs apresentou 12 placas com contaminações enquanto o QLS apresentou o menor número de contaminações (10 placas). Ao realizar-se a análise relativa às contaminações constatou-se que os meios sem a presença de sacarose apresentam menos contaminações pelo que se optou pela utilização do mesmo nos restantes ensaios.

Posteriormente, já com o protocolo de germinação estabelecido, procedeu-se à realização de um último ensaio (ensaio 4), de forma a testar modalidades de aclimatização. Deste modo,

os resultados obtidos neste ensaio foram analisados para confirmar as decisões tomadas no primeiro ensaio relativo à framboesa conservada.

Pode observar-se que as taxas de germinação apresentaram valores superiores aos obtidos no primeiro ensaio (Quadro 17, Anexo 7.3), tendo o meio QL_S (com taxa de germinação média de 97,6%) sido superior ao meio MM_S (89%). Estes resultados evidenciam o facto de o meio de cultura poder não ter tido muita influência no sucesso da germinação, neste caso. Isto pode ser explicado pela inexistência de diferenças significativas entre os valores em ambos os ensaios realizados e, pela alteração do meio com maiores taxas de germinação de um ensaio para o outro, pelo que esta alteração pode ser originária de outro fator. É ainda de referir que, no ensaio 4, a percentagem de sementes transferidas para a fase de aclimatização foi superior ao ensaio 1, tendo uma diferença de, aproximadamente, 23% para o meio QL_S e 11% para o meio MM_S. Quanto às contaminações, estas diminuíram consideravelmente em relação ao ensaio 1, tendo apenas sido eliminada uma placa de cada meio por essa razão. O meio MM_S continua a apresentar um maior número de contaminações relativamente ao meio QL_S, tendo o primeiro contaminações em 4 placas e o QL_S em 1 placa apenas, a que foi eliminada.

O aumento das taxas de germinação e da percentagem de sementes por placa para aclimatização bem como a diminuição das contaminações, mostram a estabilização do protocolo para esta espécie e estado de conservação.

4.2 Germinação das sementes de framboesas frescas

Depois da estabilização do protocolo de preparação do material vegetal, seguiu-se para os ensaios com as framboesas frescas onde se testaram duas variedades diferentes, cujos resultados estatísticos foram analisados individualmente, estando apresentados em cada fator estudado com essa diferenciação.

Na primeira variedade (8F471), avaliou-se a influência da data de colheita e do meio de cultura na germinação – modalidades F1, F2, F3 e F4 - enquanto na segunda variedade (Clarita), foram analisados os fatores escarificação mecânica e o meio de cultura – modalidades F5, F6, F7 e F8.

De modo a definir que variedade apresenta melhores resultados para o objetivo, foi também efetuada uma comparação entre as mesmas, onde a preparação do material vegetal foi igual para ambas, avaliando apenas o fator variedade para os diferentes meios de cultura.

Nestes ensaios verificou-se, com a utilização do mesmo protocolo, um número muito superior de contaminações relativamente ao ensaio 1, isto pode ser explicado pela presença de agentes patogénicos, endógenos ou exógenos, nas sementes extraídas do fruto fresco, agentes

esses que se propagam quando as sementes são colocadas em meio de cultura rico em nutrientes, propício ao seu desenvolvimento.

4.2.1. Efeitos da preparação do material vegetal na germinação

Influência da data de colheita na germinação da variedade 8F471

No que respeita à data de colheita, as sementes foram extraídas de frutos colhidos dia 7/10 (F1 e F3) e dia 11/10 (F2 e F4). Os valores obtidos estatisticamente não apresentaram diferenças significativas para as variáveis em estudo mostrando que a data de colheita não influenciou as taxas de germinação. Os frutos colhidos no dia 7/10 obtiveram, no entanto, valores médios mais elevados para as taxas de germinação (em média, 46,2% de germinação, cerca de mais 10% que os frutos colhidos a 11/10), uma maior velocidade de germinação (6,25 dias) e uma maior percentagem de sementes transferidas para a fase aclimatização, com uma diferença de, aproximadamente, 11% para a outra data de colheita.

Ao avaliar as contaminações (Figura 26, Anexo 7.4), pode verificar-se que existiu um maior número de contaminações em sementes da primeira colheita, este aspeto pode ser explicado pelo tempo de armazenamento dos frutos, tendo em conta que os frutos da primeira colheita permaneceram mais uns dias em câmara frigorífica, o que pode ter levado ao desenvolvimento de agentes patogénicos invisíveis a olho nu que, posteriormente à colocação em ensaio, se propagaram.

Efeito de diferentes métodos de escarificação mecânica na variedade Clarita

Para a variedade Clarita, optou-se por analisar a diferença entre o corte da semente e a colocação da semente cortada em meio de cultura (F5 e F7) com a extração do embrião e colocação deste em meio de cultura (F6 e F8).

Pelos resultados obtidos (Quadro 18, Anexo 7.4), verificou-se que não existem diferenças significativas entre os dois métodos para as variáveis em estudo, não mostrando influência sobre o sucesso da germinação. No entanto, pode observar-se que a extração do embrião apresenta, tendencialmente, uma maior taxa de germinação relativamente ao corte da semente, com o primeiro método de escarificação a obter, em média, 50,9% de germinação enquanto o segundo obteve 45,9% de sementes germinadas, em média. Por outro lado, verificou-se que nos ensaios com a extração do embrião não existiram contaminações e, embora tenha demorado mais tempo até à primeira germinação (12 dias) relativamente ao corte da semente (5 dias), obteve-se um maior número de germinações neste método, este aspeto pode dever-se à ocorrência de muitas

contaminações na testagem do outro método que levaram à eliminação das placas em ensaio mais cedo.

De acordo com Nesme (1985), tanto a remoção do revestimento da semente como a extração do embrião efetuadas nos seus ensaios permitiram a obtenção de taxas na ordem dos 100% de germinação, isto não se verificou para as sementes de framboesa fresca em estudo, mas como mencionado não será por influência do método de escarificação, e sim pela imaturidade dos embriões.

Galletta et al. (1986) também avaliaram a extração do embrião tendo obtido taxas de desenvolvimento completo do embrião (“germinação”) na ordem dos 70%, com cerca de 90% desses embriões a concluírem a fase de aclimatização com sucesso. Neste caso, as taxas de germinação foram cerca de 20% inferiores e não foram obtidas plântulas viáveis no fim dos ensaios, isto pode estar relacionado com imaturidade dos embriões e com o facto de a amostra em estudo ser muito pequena. No entanto, pode concluir-se que os ensaios com este método de escarificação mecânica se apresentam promissores, evidenciando a importância de se proceder a um estudo sobre o mesmo, com um maior nº de amostras, uma variedade de framboesa com boas taxas de germinação e um protocolo de aclimatização adaptado a embriões de modo a avaliar a possibilidade deste método para o programa de melhoramento.

4.2.2. Efeito do meio de cultura na germinação

Variedade 8F471

Para as framboesas frescas desta variedade foram testados o meio de cultura QL_S e MM_S para as variáveis de interesse. Pode observar-se (Quadro 19, Anexo 7.4) que não existem diferenças significativas entre os dois meios em estudo, no entanto o meio MM_S destaca-se pelo facto de apresentar, tendencialmente, uma taxa de germinação e uma percentagem de sementes para aclimatização superiores à do meio QL_S, em 14,1% e 12,7%, respetivamente. Verificou-se que, neste estado de conservação, as taxas de germinação apresentadas são inferiores ao pretendido e, inferiores às taxas obtidas no primeiro ensaio, isto poderá estar relacionado com a possível má qualidade das sementes desta variedade, que impediu a germinação de um elevado número de sementes.

Outro aspeto que interessa realçar é o facto de os dois meios em estudo terem a mesma velocidade germinação (6,5 dias) e, no primeiro registo para cada um deles, apresentarem a mesma taxa de germinação semelhante (cerca de 20%), no entanto, no decorrer do ensaio, o meio de cultura MM_S, a nível de valores médios, potencia um maior número de sementes

germinadas, como se pode visualizar na Figura 27 do Anexo 7.4. Deste modo, verifica-se que o meio MM_s será mais adequado às sementes desta variedade.

Em relação às contaminações, existem também alguns pontos que interessa realçar: a) a ocorrência de contaminação na placa em ensaio não implica necessariamente a eliminação da mesma, apesar de 16 das 22 placas contaminadas terem sido eliminadas; b) o fator meio de cultura pode ter afetado esta variável, tendo em conta que existiram 14 placas contaminadas no meio MM_s e 8 no meio QL_s (Figura 9).

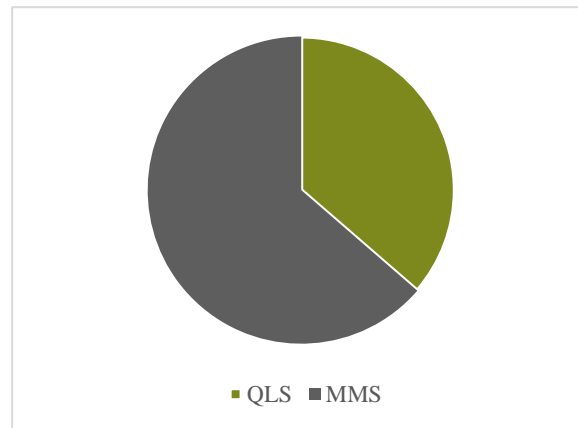


Figura 9 – Percentagem de placas em ensaio com contaminação de sementes, para cada meio de cultura em estudo, em framboesa fresca da variedade 8F471.

Variedade Clarita

Na variedade Clarita, foram analisados os resultados obtidos do fator meio de cultura para as mesmas variáveis da variedade anterior, mantendo-se estes, mesmo assim, aquém dos objetivos pretendidos. Ao observar os resultados obtidos (Quadro 20, Anexo 7.4), verifica-se que as taxas de germinação obtidas são superiores à variedade 8F471. Podemos constatar que, ao contrário da primeira variedade, o meio com taxas de germinação mais elevadas, é o QL_s (55,5%), tendo uma diferença de cerca de 15% para o meio MM_s. No que respeita às restantes variáveis, a velocidade de germinação é igual para os dois, mas a duração do ensaio é, em termos de valores médios, superior no QL_s assim como a percentagem de sementes transferidas para aclimatização, com uma diferença de 14%, fator decisivo para a escolha.

Pode ainda observar-se (Figura 10) que, no primeiro registo das sementes germinadas, efetuado no dia 8 de novembro, o meio MM_s teve uma taxa de germinação de 25,7% enquanto o meio QL_s obteve uma taxa de germinação de 37% sendo que, em registos posteriores, o primeiro meio apresentou diferenças mais elevadas entre as taxas obtidas, mantendo-se, no entanto, abaixo do meio QL_s.

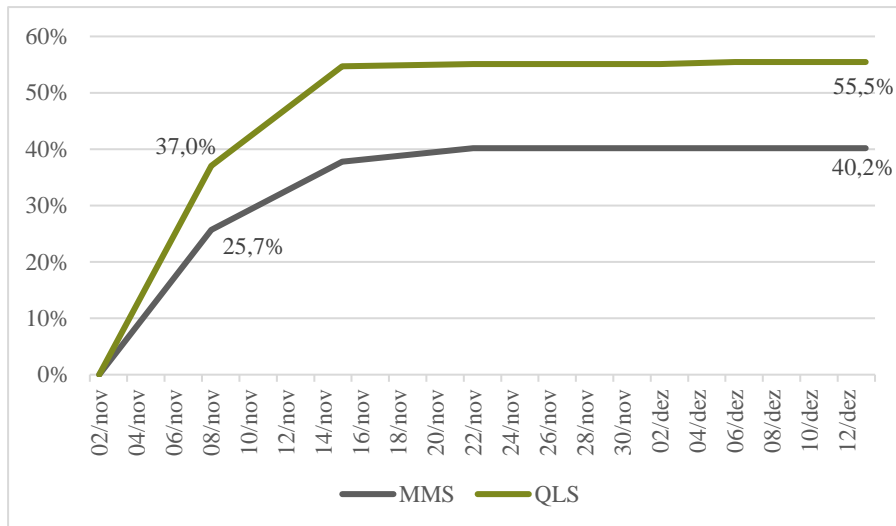


Figura 10 – Taxa de germinação média (em %) ao longo do ensaio 2 para framboesa fresca da variedade Clarita, em função do meio de cultura. Os registos para o ensaio com o meio QLS e MMS iniciaram-se no dia 8/11.

É de referir que o meio de cultura não teve influência nas contaminações existentes neste ensaio e que, quando ocorreram, a placa teve de ser eliminada, o que sugere que os agentes patogénicos seriam de rápida propagação.

O facto de o meio QLS ter obtido melhores resultados relativamente ao MMS pode estar relacionado com presença de GA₃ (0,1 mg/L) na sua constituição. Como mencionado na secção 2.5.2.4, este regulador de crescimento tem um papel fundamental na quebra da dormência e, consequentemente, na germinação. Assim, ao verificar que os melhores resultados foram obtidos no meio QLS, pode afirmar-se que o efeito do GA₃ contribuiu para as taxas mais elevadas no mesmo. Por outro lado, considerando as baixas taxas de germinação comparativamente com a framboesa conservada, pode presumir-se que os embriões destas sementes se encontravam imaturos, fator inibidor da sua germinação. Isto pode, também, ser relacionado com a influência do GA₃ sobre este aspeto - potencia a germinação destes embriões imaturos - originando as taxas obtidas no meio QLS.

4.2.3. Efeito da variedade utilizada nos ensaios

Tendo sido testadas duas variedades diferentes nos ensaios relativos à framboesa fresca, foi realizada, no tratamento dos resultados, uma comparação entre estas, de modo a determinar qual seria a variedade mais viável de utilizar em ensaios futuros.

Para o meio QL_S (Quadro 21, Anexo 7.5) verificou-se que não existem diferenças significativas relativamente à taxa de germinação, no entanto existe uma tendência que indica que a variedade Clarita será mais adequada ao objetivo pretendido, com uma taxa de 55,6%. Por outro lado, no meio MM_S (Quadro 22, Anexo 7.5), não existindo também diferenças significativas, vemos a tendência contrária onde a variedade 8F471 apresenta uma taxa de germinação de 48,7%. Estes resultados podem estar relacionados com a fisiologia da semente, o facto de a Clarita apresentar menor taxa de germinação no MM_S e no QL_S ser superior à da outra variedade, demonstra que os embriões poderiam estar ainda imaturos sendo favorecidos pela presença de GA₃ no meio, como mencionado na secção anterior.

No que respeita à velocidade de germinação, esta é superior para a variedade Clarita, sendo também a duração do ensaio mais curta, o que a evidencia como mais promissora para o objetivo. Quanto à percentagem de sementes transferidas para a fase de aclimatização, enquanto no meio QL_S estas foram superiores para a Clarita, no meio MM_S aconteceu o contrário, replicando o efeito da taxa de germinação.

Como se pode observar (Figura 11a), para o meio QL_S, existe diferença entre as duas variedades relativa à percentagem de sementes germinadas, tendo a variedade Clarita, a nível de valores médios, não só uma maior taxa de germinação no fim do ensaio como, no primeiro registo, mais do dobro de germinações da variedade 8F471. Para o meio MM_S (Figura 11b), confirma-se que a 8F471 tem, tendencialmente, melhores resultados a nível da taxa de germinação no fim do ensaio, no entanto a diferença entre as duas é inferior à do meio QL_S. Por outro lado, é interessante mencionar que, no primeiro registo, a variedade Clarita apresenta uma percentagem de sementes germinadas (29,9%) superior à 8F471 (23%).

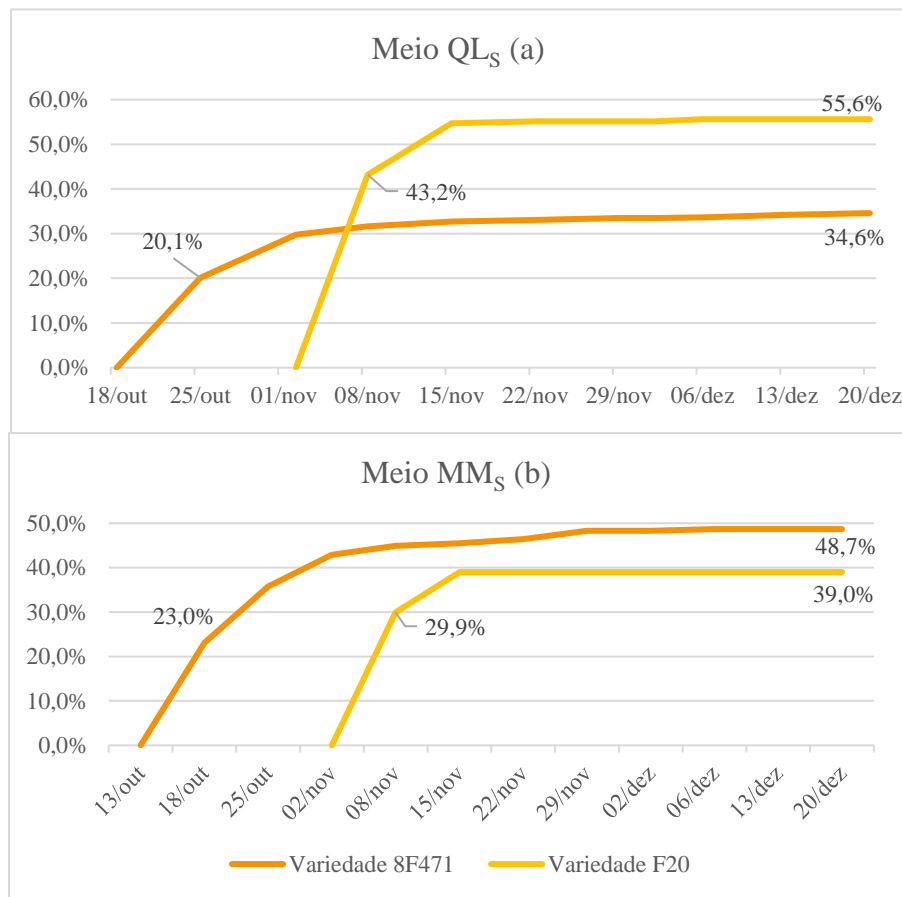


Figura 11 – Taxa de germinação média (em %) ao longo do ensaio 2 para framboesa fresca em função das variedades, para o meio QL_S (a) e para o meio MM_S (b).

Segundo Staszak et al. (2019) e Yan & Chen (2020), as sementes adquirem dormência (fisiológica) durante a fase de maturação, atingindo o seu máximo no fim desta fase; este aumento do nível de dormência ocorre através do aumento dos níveis de ABA. Quando ocorre a imbibição da semente e, conseqüente, redução dos níveis de ABA bem como a iniciação da síntese de GA, esta dormência vai sendo reduzida e a germinação promovida. De acordo com Ismaini et al. (2017b), a adição de GA₃ ao meio de cultura revela-se bastante eficiente para a promoção da germinação e aumento do potencial germinativo, o que é confirmado pelos resultados obtidos acima; consegue visualizar-se esta tendência através da variedade Clarita, que demonstra um aumento da sua taxa de germinação no meio QL_S de 16,6% em relação ao meio MM_S. Nos ensaios destes autores a concentração de GA₃ utilizada foi de 10 mg/L, tendo sido obtidas taxas de germinação na ordem dos 95%; esta concentração da hormona foi 100 vezes superior à utilizada nos presentes ensaios, isto sugere que ao aumentar a quantidade de GA₃ adicionada podem existir incrementos significativos nas taxas de germinação.

Quanto às contaminações, como mencionado na análise individual, ambas as variedades apresentam bastantes, possivelmente exógenas, que não tenham sido removidas com o processo

de desinfecção realizado, tendo a diferença para as conservadas de ter permanecido em armazenamento algum tempo podendo levar ao desenvolvimento de agentes patogénicos e pelo facto de a remoção da semente do fruto ser um processo manual que pode originar a obtenção de sementes com alguns resíduos que, posteriormente, contaminam o meio de cultura; ou endógenas da semente. No entanto quando comparadas entre si, verifica-se que a variedade 8F471 tem um maior número de contaminações no meio MM_S , enquanto no meio QL_S isto recai sobre a variedade Clarita (Figura 12).

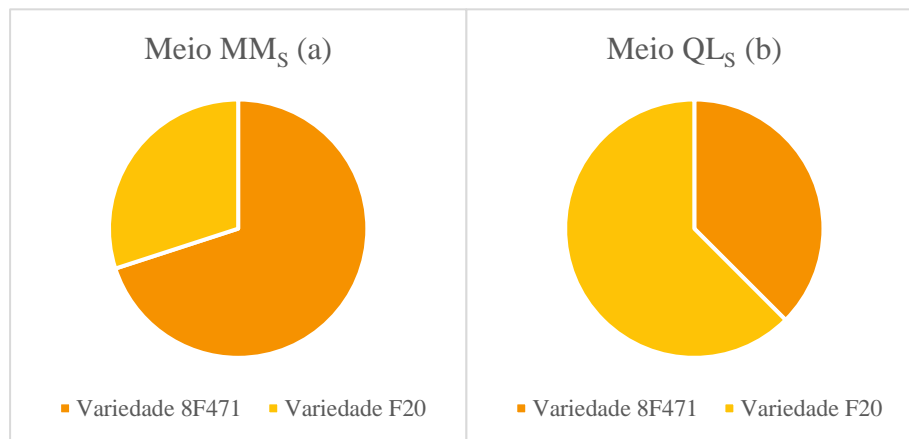


Figura 12 – Percentagem de placas contaminadas para cada variedade em estudo no ensaio 2 no meio de cultura MM_S (a) e o meio de cultura QL_S (b).

Tendo em conta os resultados obtidos, verificou-se que a variedade com um maior potencial germinativo é a Clarita tendo obtido, em termos de valores médios, valores mais elevados no meio QL_S , possivelmente pelo efeito do GA_3 que evidencia, ao potenciar a germinação, a imaturidade dos embriões desta variedade. Por outro lado, é neste meio que existem as maiores contaminações, que provêm das sementes e, por isso, devem ser mitigadas. Quanto à variedade 8F471, esta apresenta taxas de germinação baixas e um elevado número de contaminações o que se poderá justificar por uma má qualidade da semente, pois, de acordo com a informação fornecida pelo obtentor dos frutos, houve problemas na autopolinização das plantas, que podem ter originado estes resultados.

Da comparação destas variedades pode evidenciar-se a necessidade de se realizarem mais ensaios para a variedade que maior potencial apresentou, a Clarita. Estes ensaios devem ser efetuados com: uma extração do fruto mais precisa de modo a que nenhum resíduo seja transferido para o meio de cultura, isto pode ser conseguido através do aumento do número de passagens por água corrente e a utilização de um pincel para auxiliar na remoção da polpa; a adaptação do método de desinfecção, através da passagem das semente por água corrente 1/2 h seguida da passagem por detergente e, posteriormente, a realização do método de desinfecção

que pode ter mais passagens pela solução de desinfecção assim como a adição de fungicida à composição do meio de cultura, de modo a eliminar o fator contaminações da decisão. Por outro lado, deve-se potencializar o poder germinativo da variedade através do incremento do GA₃ no meio de cultura para, por exemplo, 0,1 mg/L ou utilizar-se outra variedade, que tenha um maior potencial germinativo, nos ensaios com a framboesa fresca.

4.3 Efeito do estado de conservação do material vegetal na germinação

Finalizados os ensaios relativos à espécie *Rubus idaeus*, e antes de avançar para a outra espécie em estudo, realizou-se uma comparação entre os dois estados de conservação testados, de forma a aferir qual dos dois o melhor para o protocolo de germinação em desenvolvimento.

No que respeita este fator, pode constatar-se que para o meio MM_s (Quadro 23, Anexo 7.6) existem diferenças significativas, sendo o estado conservado a frio (4°C), o que apresentou taxas de germinação mais elevadas (76,3%), com uma diferença do estado fresco na ordem dos 40%. Quanto à percentagem de sementes que transitam para a aclimatização, as sementes conservadas têm também melhores resultados, tendo uma média de 76,3% sementes transferidas para a fase seguinte, enquanto as frescas ficam muito aquém, com uma média de 37,6%.

O estado em fresco apresenta uma velocidade de germinação superior, traduzindo-se num menor número de dias para germinar, que pode estar relacionada com a dormência da semente. Ao conservar as sementes em frio, com a desidratação e as necessidades de frio para a dormência fornecidas, as sementes desenvolvem uma dormência induzida sendo depois necessária a quebra da mesma para que se inicie o processo de germinação, já as sementes frescas não entram neste estado por ser colhidas e colocadas logo em ensaio, apresentando apenas a dormência endógena que é facilmente quebrada pelos reguladores de crescimento e reservas nutritivas fornecidas no meio de cultura.

Para o meio QL_s (Quadro 24, Anexo 7.6), a taxa de germinação resultante das sementes de framboesa frescas é, em termos de valores médios, superior à obtida pelo meio MM_s (em 16,6%), ficando, mesmo assim, aquém da obtida pela framboesa conservada. A percentagem de sementes para a aclimatização é também, a nível de valores médios, superior para as framboesas frescas, transitando, em média, 53,3% de sementes para aclimatização, no entanto, as framboesas conservadas são responsáveis pela transferência de, em média, 77,3% de sementes para a fase seguinte, valor superior ao obtido para este estado de conservação no meio MM_s. Na velocidade de germinação, podemos verificar que as sementes de framboesa frescas

se mantêm nos 5 dias, enquanto nas sementes conservadas o período de germinação é, no que diz respeito aos valores médios, reduzido 0,5 dias.

Estes resultados demonstram que, em ambos os meios de cultura, as sementes conservadas, apesar de não terem diferenças significativas para os testes não paramétricos, apresentam melhores resultados no que respeita aos valores médios, tendo obtido as melhores taxas de germinação no meio QL_S , sendo este também o meio que apresentou taxas mais elevadas para as sementes frescas. É de notar que a curva de germinação para a framboesa conservada (Figura 13) é muito semelhante entre os dois meios, tendo no primeiro registo sido obtidas taxas de 63,3% para o meio MM_S e 66,8% para o QL_S , tal como a curva das sementes frescas, que apenas se distingue pelos valores mais elevados para o meio QL_S , tendo, no primeiro registo, uma taxa de 29,9% para o MM_S e de 43,2% para o QL_S .

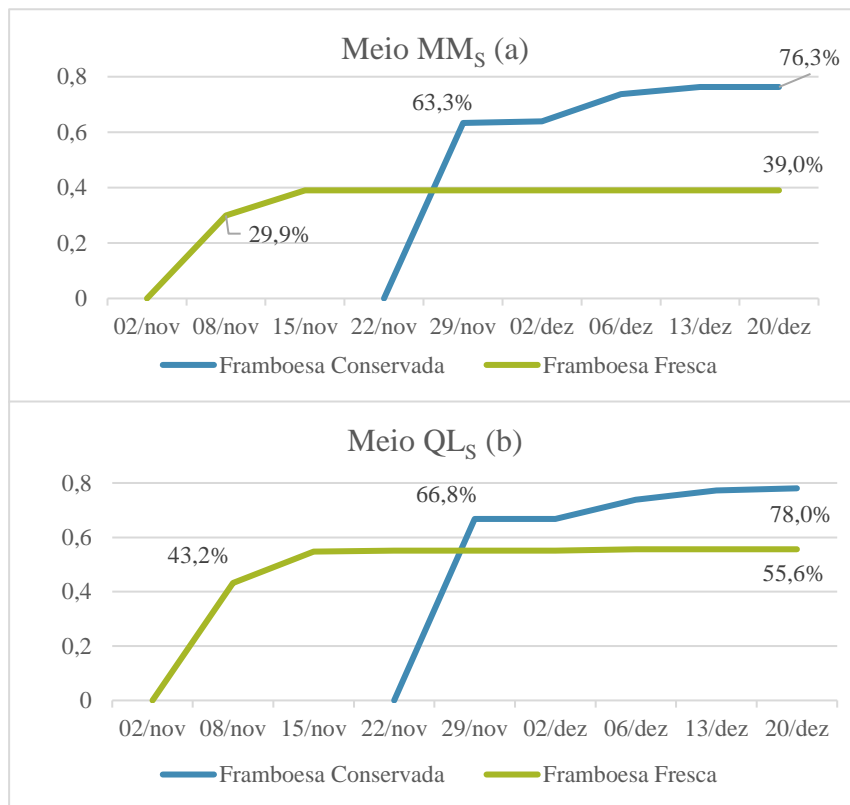


Figura 13 – Taxa de germinação média (em %) ao longo do ensaio para a variedade Clarita de framboesa fresca e do ensaio 4 para a framboesa conservada, para o meio MM_S (a) e para o meio QL_S (b).

Sendo a framboesa uma espécie com dormência física, optou-se por tentar quebrar esta dormência com a utilização de um método utilizado por diversos autores (Contreras et al., 2016; Lim & Knight, 2000; Martínez-Cruz et al., 2013; Mian et al., 1995; Nesme, 1985; Wada et al., 2011): a escarificação mecânica através do corte da semente, de forma a remover o revestimento e promover a entrada de água. Este método provou-se muito eficaz, em ambos os estados de conservação, ao permitir a correta imbibição da semente e, conseqüentemente, maiores taxas

de germinação, tal como os autores afirmaram, sendo a melhor opção como pré-tratamento para a dormência exógena desta espécie.

No que respeita a dormência fisiológica esta é, de acordo com Mian et al. (1995), responsável pelo facto de as sementes pertencerem ao grupo das sementes recalcitrantes sendo que podem perder a sua viabilidade quando desidratadas até níveis de humidade inferiores a 20% (Hartmann et al., 2018; Sujith, 2015). No caso das sementes frescas, verificou-se que esta dormência não será a causa das baixas taxas de germinação pelo facto de estas não terem sido submetidas a processos de desidratação, no entanto, ao contrário do que Mian et al. (1995) afirmaram, estas não obtiveram taxas de germinação superiores às sementes conservadas (desidratadas e conservadas a 4°C por mais de 1 ano). Isto pode dever-se ao facto de as sementes conservadas terem sido hidratadas por 24 horas antes de serem colocadas em ensaio, devolvendo às sementes os níveis de humidade necessários para quebrar esta dormência e incentivar a germinação, colocando estas sementes no mesmo patamar que as sementes frescas relativamente à dormência fisiológica.

Relativamente às contaminações, pode observar-se na Figura 14 que no meio MM_S todas as placas com sementes frescas em ensaio sofreram contaminações e, no meio QL_S apenas uma não sofreu contaminação. Por outro lado, nas sementes conservadas, houve um maior número de contaminações que não contaminações no meio MM_S, enquanto no meio QL_S, apenas uma placa foi contaminada.

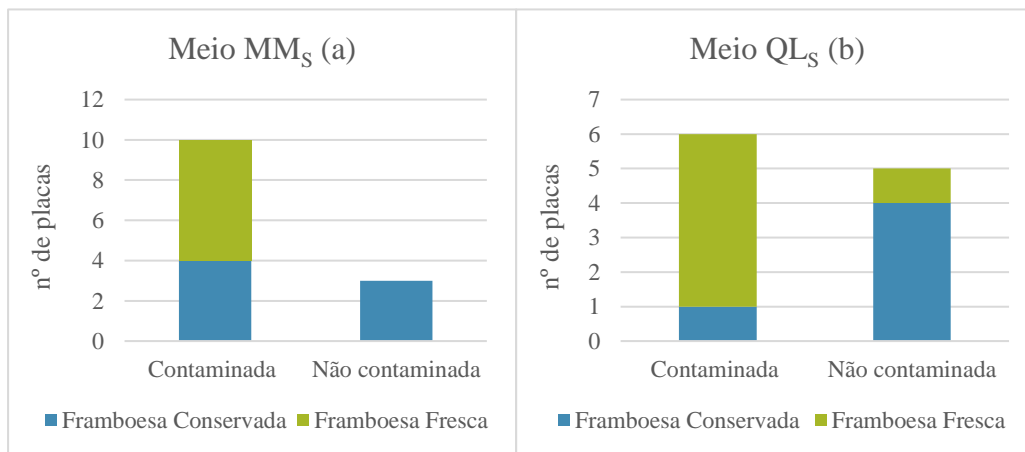


Figura 14 – Número de placas em ensaio com e sem contaminação de sementes, para a variedade Clarita de framboesa fresca e do ensaio 4 para framboesa conservada, para o meio de cultura MM_S (a) e o meio de cultura QL_S (b).

Com estes resultados, pode afirmar-se que a melhor opção será seguir o protocolo com sementes conservadas e, tendo em conta as taxas de germinação, a percentagem de sementes transferidas para a aclimatização e as contaminações, os ensaios deverão ser em meio QL_S.

4.4 Germinação das sementes de camarinha

Concluídos os ensaios para as framboesas, estando estas em desenvolvimento na fase de aclimatização, e definido um protocolo mais robusto, passou-se para testagem deste na *Corema album*, analisando para esta espécie: os dois métodos de desinfecção com maior sucesso; os dois meios de cultura em estudo bem como uma ligeira alteração no pré-tratamento.

Os resultados obtidos para a camarinha (ensaio 3) não foram os esperados: existiram muitas contaminações, possivelmente exógenas, devido a um processo de desinfecção deficiente tendo em conta a rugosidade da semente, ou endógenas da semente; as percentagens de sementes germinadas foram muito baixas; e não se obteve nenhuma plântula viável para transferência para o campo devido a contaminações precoces.

4.4.1. Efeitos da preparação do material vegetal na germinação

Efeito do tempo de hidratação na germinação

Em primeiro lugar, foi analisada a influência do tempo que as sementes ficavam em hidratação antes de se proceder à desinfecção, de modo a avaliar o seu efeito na germinação.

De acordo com os resultados obtidos (Quadro 25, Anexo 7.7), verifica-se que esta foi mais elevada quando as sementes eram colocadas durante 24 horas em água, tendo sido obtida uma taxa de germinação de 42,8% enquanto, para as 48 horas em água, se obteve uma taxa de 29,1%. Por outro lado, a velocidade de germinação das sementes com hidratação de 48 horas foi, em termos de valores médios, superior à hidratação por 24 horas, apresentando a primeira germinação aos 6 dias, tendo também o ensaio, tendencialmente, uma menor duração bem como uma maior percentagem de sementes transferidas para a fase seguinte (em média, 23,4% das sementes).

Além disso, o facto de as sementes permanecerem 48 horas em água em vez de 24 horas, permitiu um manuseamento mais fácil e, ao tornar as sementes mais macias, um corte mais rápido e preciso, tornando-a mais operativa.

Influência do método de desinfecção utilizado na germinação

Relativamente ao método de desinfecção utilizado, foram testados para esta espécie os dois métodos que obtiveram maior sucesso nos ensaios anteriores para existir um meio de comparação entre desinfecções para a camarinha.

Pode observa-se (Quadro 26, Anexo 7.7) que não existem diferenças significativas na taxa de germinação, tendo sido obtidos valores muito próximos entre si, que não ultrapassam

os 35% de germinação, valor muito inferior ao pretendido. Por outro lado, no que respeita à velocidade de germinação, o método D6 provou ser mais eficiente, em termos de valores médios, tendo a sua primeira germinação após 6,3 dias. Quanto à duração do ensaio, verificou-se que o método D6 tem tendência para apresentar menor duração, levando cerca de 14 dias a atingir o seu máximo de germinação. Por fim, no que respeita à percentagem de sementes que transitam para a fase de aclimatização, constata-se que o método de desinfeção D5 obteve melhores resultados, no que respeita às médias (34,8%), que poderá ser explicado pelo facto de nenhuma das placas sujeitas ao método D5 ter sido contaminada.

É de referir ainda que, 6 das 16 placas submetidas ao método de desinfeção D6 foram contaminadas e eliminadas do ensaio, enquanto as referentes ao método D5 não sofreram nenhuma contaminação, sugerindo que este método poderá ser o mais indicado para a camarinha. Isto pode ser explicado pelo facto de a camarinha possuir um revestimento diferente da framboesa, com uma maior rugosidade, propícia a uma maior retenção de resíduos e agentes contaminantes que não são facilmente removidos pelo processo de desinfeção superficial pelo que a existência de um procedimento extra no método D5 poderá ser vantajoso para mitigar as contaminações. Pode ainda utilizar-se um processo de desinfeção mais adaptado à espécie, adicionando uma passagem das sementes por água corrente durante 1/2 horas e a passagem por detergente antes da desinfeção testada bem como um maior número de passagens na solução de desinfeção e a integração de fungicida na composição do meio de cultura.

4.4.2. Efeito do meio de cultura na germinação

Tal como nos ensaios anteriores, o fator meio de cultura foi tido em conta, sendo analisadas as mesmas variáveis. Os valores obtidos para a camarinha encontram-se no Quadro 13, abaixo.

Quadro 13 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada meio de cultura testado no ensaio 3 relativo à camarinha.

Meio	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
QL _S	31,7 A	6,4 A	27,4 A	31,7 A
MM _S	37,4 A	6,4 A	6,4 B	10,3 B

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha = 0,05$.

As taxas de germinação obtidas neste ensaio não apresentam diferenças significativas, no entanto, existe uma tendência para o meio MM_S ser superior ao meio QL_S, apresentando uma

taxa de 37,4%. Estes resultados são muito inferiores aos pretendidos e, inferiores aos obtidos nos ensaios com a framboesa, sugerindo a necessidade de uma adaptação do protocolo para esta espécie em específico, visto que respondem de forma diferente a procedimentos iguais.

Para a duração dos ensaios, existe uma diferença substancial, sendo que o MM_s apresenta uma duração inferior a uma semana, isto pode estar relacionado com o facto de 6 das 10 placas colocadas em ensaio terem sido eliminadas por contaminação aquando do primeiro registo.

Para a percentagem de sementes transitadas para a fase seguinte, os valores são bastante inferiores aos obtidos em framboesa, sendo o melhor meio o QL_s com uma média 31,7%, valor inferior ao obtido no pior meio de cultura para a framboesa conservada. Este resultado decorre das menores taxas de germinação das sementes de camarinha, relativamente às de framboesa.

Como se pode observar na Figura 15, o meio de cultura que obteve melhores resultados, a nível de valores médios, foi o MM_s que apresentou uma taxa cerca de 5% superior à do QL_s, sendo que no primeiro registo obteve-se uma taxa de germinação de 36,2%, muito próxima da final, mantendo-se a curva de germinação praticamente constante até ao fim do ensaio. Para o meio QL_s, o primeiro registo também foi um valor muito próximo do final para o meio tendo, no entanto, entre eles uma descida para 29,4%.

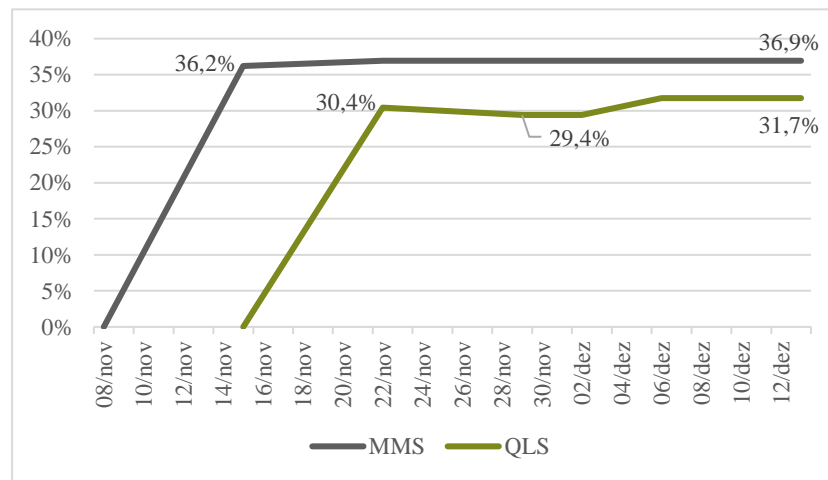


Figura 15 – Taxa de germinação média (em %) ao longo ensaio 3 relativo à camarinha, em função do meio de cultura. Os registos para o ensaio iniciaram-se para o meio MM_s dia 15/11 e para o meio QL_s dia 22/11.

É de mencionar também que, as contaminações registadas se verificaram apenas para o meio MM_s, tendo 6 placas eliminadas por contaminação, logo no primeiro registo, das 10 em ensaio, enquanto o meio QL_s não registou nenhuma contaminação.

Estes resultados mostram que, para a espécie camarinha, o meio de cultura mais eficiente para os objetivos pretendidos é o QL_s, apresentando uma percentagem de sementes transferidas para aclimatização mais elevada e nenhuma contaminação. No entanto, isto não invalida o facto

de existir a necessidade de prosseguir os ensaios com alterações no protocolo de modo a procurar maximizar as taxas de germinação para esta espécie.

Segundo Lisboa (2017) e Santos et al. (2014), a camarinha apresenta dormência fisiológica intermédia, tendo em conta as respostas obtidas aos tratamentos com GA₃ bem como aos tratamentos de estratificação quente e fria, nos ensaios realizados por estes autores. Seria de esperar que esta espécie iria ter uma maior taxa de germinação no meio QL_S pelo facto de este ter na sua constituição GA₃, no entanto os resultados obtidos foram tendencialmente melhores no meio MM_S, embora sem diferenças significativas, como já mencionado. No entanto, é de referir que as primeiras germinações ocorram após 6 dias em meio de cultura, período muito mais reduzido do que o obtido pelas autoras cujos ensaios apresentaram as primeiras germinações ao fim de cerca de 3 meses, evidenciando assim a possibilidade deste método como uma boa opção a explorar para o programa de melhoramento desta espécie. As rápidas germinações ocorridas nos ensaios realizados podem ter sido não só pela indução da germinação em meio de cultura com as condições assépticas e controladas, mas também pelo corte que foi efetuado como pré-tratamento. Este corte facilitou o processo de imbibição da semente, tornando-o mais rápido e, conseqüentemente, acelerando os restantes processos de germinação.

As baixas taxas de germinação obtidas nesta espécie podem estar relacionadas com o facto de as sementes utilizadas estarem conservadas a frio (4°C) desde 2015, tendo sido referido por Oliveira & Dale (2012), que a manutenção da hidratação das camarinhas impede a indução da dormência nas mesmas. Ao estarem muito tempo desidratadas em armazenamento, possivelmente, a hidratação efetuada antes da colocação em ensaio pode não ter sido suficiente para a quebra de dormência e, conseqüentemente, para a correta imbibição da semente e germinação.

4.5 Aclimatização

À medida que os ensaios relativos à germinação iam sendo concluídos, as sementes germinadas com sucesso eram transferidas para a próxima fase: a aclimatização.

Nesta fase, inicialmente, optou-se pela transição sequencial das sementes para diferentes meios de cultura *in vitro* até à passagem final para meio *ex vitro* (ensaio 5.1), para permitir que estas se desenvolvessem vegetativamente e radicalmente, de modo a quando fosse feita a transição, estas sobrevivessem melhor. Assim, após germinação das sementes no respetivo meio de germinação (Figura 16a), fez-se a passagem das mesmas para um meio de cultura para desenvolvimento da plântula, tendo para este efeito sido utilizado o meio MS bem como o QL

e MM, já com a sacarose. Posteriormente, após desenvolvimento das folhas cotiledonares (Figura 16b), as plântulas com estas características eram passadas para meio de cultura MS com suplementação de BAP, de modo a completar o seu desenvolvimento (Figura 16c e Figura 16d). Os resultados obtidos nesta fase vão ser apresentados na secção 4.5.1, divididos por estado de conservação da espécie.

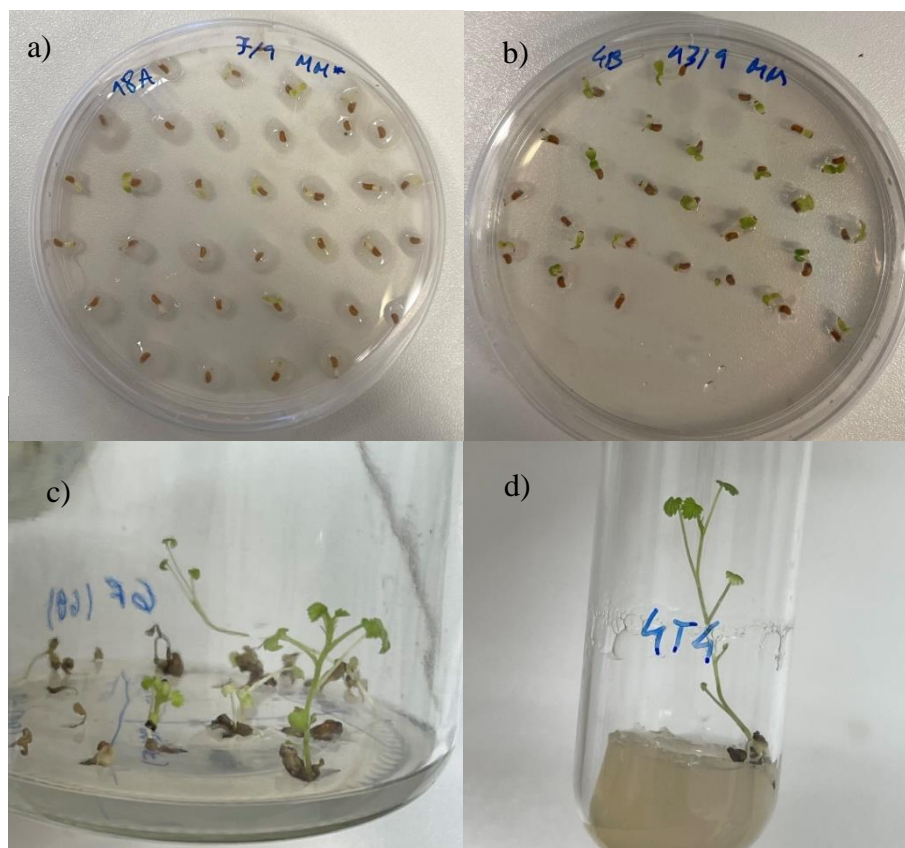


Figura 16 – Sementes germinadas no ensaio 1 (a), plântulas com folhas cotiledonares, no fim da fase 1 de aclimatização (b) e plântulas com folhas verdadeiras, no fim da fase 2 da aclimatização, em frasco (c) e em tubo individual (d), para framboesa conservada.

Tendo a maioria dos explantes em ensaio sido eliminados no decorrer destas duas fases, as plântulas obtidas no fim da segunda fase, que apresentavam maior robustez (exemplificado na Figura 16d), foram colocadas em condições mais semelhantes às *ex vitro*, em substrato, de modo a verificar se conseguiriam sobreviver neste ambiente, como era pretendido. Este último passo foi realizado em dezembro tendo sido acompanhado durante 2 semanas. Foi efetuada a transferência das plântulas para o meio de aclimatização que se encontrava com maior sucesso até à data no ensaio 5.2 – mistura turfa/perlite com humedecimento do mesmo com meio de cultura MM_{SA} – para uma caixa de plástico arejada (Figura 28, Anexo 7.8). Verificou-se que apesar de terem sofrido contaminações, como se pode verificar na Figura 17, as plântulas se desenvolveram evidenciando a sua capacidade de sobrevivência e crescimento em campo, caso

houvesse essa passagem. De modo a evitar as contaminações, as plântulas poderiam ter sido passadas por fungicida ou ter sido adicionado fungicida ao meio de humedecimento.

Na reta final dos ensaios, ao verificar-se que a transição sequencial não estava a obter os resultados pretendidos – não se estava a obter um número elevado de plântulas viáveis; as plântulas viáveis demoravam cerca de 5 meses para se desenvolver como pretendido e eram muito sensíveis a fatores exteriores – testou-se a possibilidade de fazer a transição diretamente do meio de cultura para um substrato (ensaio 5.2), estando os resultados obtidos para este ensaio, encontram-se na secção 4.5.2.



Figura 17 – Plântulas de framboesa conservada transferidas da segunda fase do ensaio 5.1, submetidas a condições ambientais mais próximas às *ex vitro*, ao fim das duas semanas de observação.

4.5.1. Transferência sequencial de meio *in vitro* para *ex vitro*

Framboesa conservada

Relativamente à framboesa conservada, os resultados obtidos são referentes às sementes germinadas no ensaio 1. Para estas sementes, foram testados três meios de culturas para o início desta fase: o meio MS suplementado com BAP (0,5 mg/L), o meio MM e o meio QL (ambos já com sacarose incluída). À medida que os ensaios foram avançando, verificou-se que as sementes germinadas quando colocadas em meio MS, não obtinham as taxas de viabilidade pretendidas (Quadro 27, anexo 7.8.1) pelo que este meio foi excluído das testagens, seguindo apenas os outros dois para os ensaios com as restantes sementes em estudo.

Na primeira parte da aclimatização (Quadro 27, Anexo 7.8.1), verificou-se que o meio com maior sucesso seria o MM com uma taxa de viabilidade de 14%, seguido do meio QL com uma taxa ligeiramente mais baixa de 13,4%, sendo os ensaios com o meio MM (em média, 28,6 dias) menos demorados que com o meio QL (em média, 41,4 dias). Estes resultados podem ser confirmados através da visualização da Figura 18a, onde se verifica que o meio MS originou o

menor número de plantas viáveis para a fase seguinte (43 plântulas) e o meio MM o maior número (102 plântulas).

Para a fase seguinte da aclimatização, para onde são transferidas as plântulas que apresentam folhas cotiledonares, encontrando-se em desenvolvimento mais avançado, recorreu-se à utilização de frascos e tubos, consoante a quantidade de plântulas a transferir de dada placa, com meio de cultura MS suplementado com BAP (0,5 mg/L) pelo seu potencial de crescimento mencionado na bibliografia. Nesta fase, os resultados obtidos (Quadro 28, Anexo 7.8.1) foram superiores para os frascos com meio MS (25%), possivelmente pela dificuldade de manuseamento das plântulas em tubo de ensaio, que origina uma maior perda de plântulas na transferência. No entanto, como se pode verificar pela Figura 18b, a diferença não é muito elevada, provavelmente por ser o mesmo meio de cultura nos dois. Quanto à duração, para atingir a viabilidade obtida nos frascos com meio MM, foram necessários cerca de 40 dias, em média.

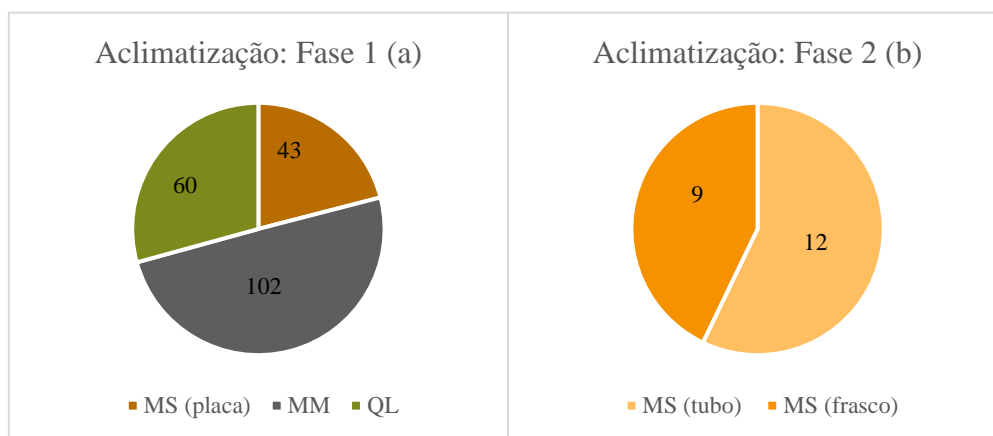


Figura 18 – Número de explantes viáveis na fase 1 (a) e na fase 2 (b) da aclimatização do ensaio 5.1 para a framboesa conservada.

Relativamente às contaminações, estas estão na origem de muitas das perdas dos explantes nas duas fases da aclimatização. Na primeira fase (Figura 19a), verifica-se que o meio QL foi o que sofreu um maior número de contaminações, com 27 placas contaminadas tendo sido 25 destas eliminadas, levando à perda de todas as sementes na mesma (Figura 29a no Anexo 7.8.1, exemplificativa). As placas de meio MS foram as que sofreram um menor número de contaminações, no entanto não obtiveram as taxas de viabilidade pretendidas, daí a exclusão deste meio para aclimatização. Na segunda fase (Figura 19b), verifica-se que as contaminações foram inferiores às obtidas na fase anterior, tendo os tubos individuais sido responsáveis pelo maior número (Figura 29b no Anexo 7.8.1, exemplificativa), com um total de 25 contaminados e eliminados, mas mantendo o saldo positivo, com 36 tubos sem qualquer contaminação, isto

pode dever-se ao facto de um tubo conter apenas uma plântula pelo que quando há contaminação no mesmo não ocorre disseminação da contaminação para outras plântulas, ao contrário do que acontece no frasco.

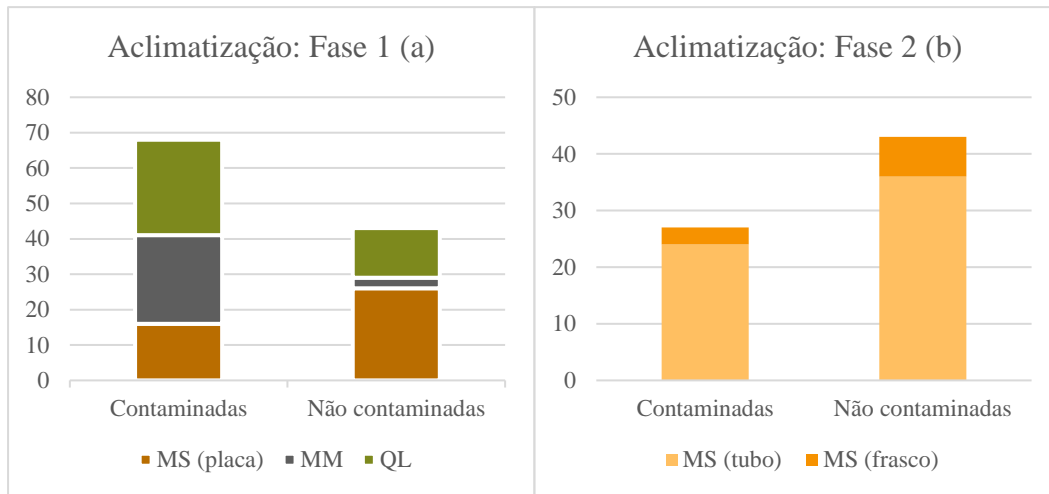


Figura 19 – Número de placas contaminadas para cada meio de cultura estudado no ensaio 5.1 para a framboesa conservada, na fase 1 (a) e na fase 2 (b) da aclimatização.

É de referir que, para as conservadas, foram testadas 5 placas abertas com substrato de turfa e humedecidas com meio de cultura QL_{SA} , com explantes da fase um da aclimatização de modo a verificar se estes já conseguiriam sobreviver, no entanto não se obteve nenhuma plântula viável, tendo todas elas sofrido desidratação e contaminação.

Assim, num total de 1245 sementes de framboesa conservada germinadas que passaram para a fase de aclimatização, obtiveram-se na primeira fase desta um total de 205 plântulas viáveis (102 em meio MM, 60 em meio QL e 43 em meio MS) e no final da segunda fase, para a transferência para condições ambientes semelhantes ao campo, um total de 21 plântulas viáveis, evidenciando a importância do sucesso desta etapa para um protocolo de germinação eficiente, sendo necessário um trabalho mais aprofundado no estudo desta fase para maximizar as taxas de viabilidade obtidas. No entanto, tendo em conta os resultados obtidos, para se atingir as maiores taxas de viabilidade possíveis devem ser utilizados, na primeira fase de aclimatização o meio MM e para a segunda fase, devem ser transferidos para o meio MS em frasco.

Framboesa fresca

Para as sementes germinadas de framboesa fresca, os resultados obtidos encontram-se apresentados com a distinção das variedades estudadas, estando também a aclimatização dividida em duas fases: 1ª fase com meio de cultura MM e QL e 2ª com meio de cultura MS em frasco ou tubo.

As duas variedades apresentaram resultados muito distintos dos obtidos na germinação, sendo que a 8F471 teve uma taxa de sucesso muito superior, com a obtenção de 100 explantes viáveis no fim da primeira fase e 31 explantes viáveis na segunda fase. Por outro lado, a variedade Clarita, que apresentou um maior potencial germinativo, não teve sucesso na aclimatização, tendo obtido 0 explantes viáveis logo na primeira fase.

Para a variedade Clarita transitaram da fase de germinação 191 sementes germinadas: 116 do meio QL_S e 75 do meio MM_S. Estas foram colocadas em meio de cultura QL e MM, consoante o meio de origem respetivo, tendo sido rapidamente contaminadas e, por isso, eliminadas do ensaio, isto pode dever-se a eventuais contaminações endógenas que, quando colocadas as sementes em meio com sacarose, se propagaram rapidamente. É de mencionar que, para esta variedade, foi testada a extração do embrião, tendo sido obtidos 35 embriões viáveis para a próxima fase, no entanto, quando colocados em meio de cultura com sacarose, sofreram contaminação, tendo sido eliminados.

Quanto à variedade 8F471, os resultados obtidos foram, ao contrário do expectável, superiores tanto à variedade Clarita como à framboesa conservada. Na primeira fase (Quadro 29, Anexo 7.8.2), foram obtidas taxas de viabilidade de 26% para o meio MM, mais do dobro das obtidas para o meio QL (em média, 10,7%), mostrando que o primeiro é o mais indicado como meio de aclimatização, sendo a duração desta fase cerca de 12 dias no meio MM. Para a segunda fase da aclimatização (Quadro 30, Anexo 7.8.2), temos uma média de 38,7% de viabilidade para o meio MS em frasco e de 10% em tubo, reforçando a possibilidade destas diferenças serem por conta da existência de uma só planta por tubo, sobrevivendo ou não. Estes resultados são reforçados pelo número de explantes viáveis obtidos em cada fase, tendo sido obtidos na fase 1 (Figura 20a), 77 explantes no meio MM e 19 no meio QL enquanto, na fase 2 (Figura 20b) se obtiveram 30 explantes em frasco e 1 em tubo com meio MS.

Para esta variedade foi iniciada a testagem da hipótese de se fazer a transferência das sementes germinadas diretamente para substrato humedecido com meio de cultura com diferentes condições de cultura – modalidade X2, X3, X7 e X8, com placa de Petri fechada (Figura 30a no Anexo 7.8.2) e modalidade X4 e X5, em cuvete plástica coberta (Figura 30b no Anexo 7.8.2) – tendo sido obtidas no fim da primeira fase, 4 explantes: 3 explantes de perlite e 1 explante de vermiculite (Figura 20a). Como estes explantes sofreram contaminação na segunda fase, tendo sido eliminados, verificou-se a necessidade da exploração desta opção tendo então sido delineado o ensaio 5.2 para estudar diferentes substratos como meio de aclimatização.

Quanto às contaminações desta variedade (Figura 31, Anexo 7.8.2), pode observar-se que todas as placas sofreram contaminações na primeira fase, sendo que apenas 6 das 29 placas em ensaio para o meio QL não foram contaminadas. Na segunda fase, também todos os explantes foram contaminados. Estas contaminações são uma das causas da perda de muito explantes na aclimatização das sementes frescas.

Assim, pode concluir-se que, para este estado de conservação, a melhor opção será, tal como na secção anterior, a utilização do meio MM para a primeira fase e do meio MS em frasco para a segunda, sendo de interesse a exploração mais aprofundada da aclimatização para estas sementes.

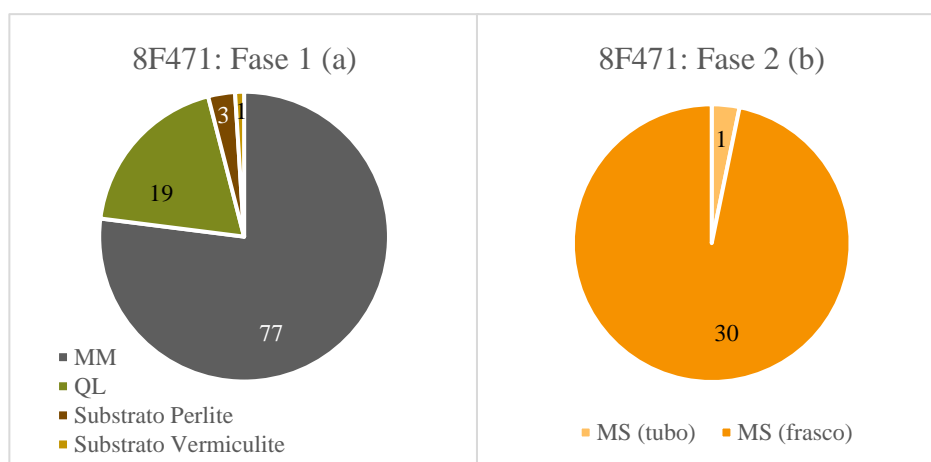


Figura 20 – Número de explantes viáveis na fase 1 (a) e na fase 2 (b) da aclimatização do ensaio 5.1 para a variedade 8F471 de framboesa fresca.

Camarinha conservada

As sementes de camarinha que germinaram com sucesso foram, consoante o meio de cultura de germinação, transferidas para o meio MM ou meio QL. Os resultados obtidos foram contrários aos pretendidos, não se tendo obtido nenhuma plântula viável na primeira fase. As sementes de camarinha que germinaram não conseguiram desenvolver para além da emergência da radícula, evidenciando a necessidade de mais estudos específicos relativos a esta espécie, com protocolos adaptados à mesma. As taxas de viabilidade foram nulas tendo os ensaios levado, em média 19 dias, com a eliminação das placas por contaminação. Além disto, praticamente todas as sementes germinadas, quando colocadas em meio de aclimatização, sofreram contaminação (Figura 32, Anexo 7.8.3).

4.5.2. Transferência direta de meio *in vitro* para *ex vitro*

Tendo em consideração os resultados obtidos com a testagem em substrato no ensaio 5.1 relativo à variedade 8F471 das sementes de framboesa fresca, optou-se por realizar um ensaio específico para a avaliação da transferência direta das sementes germinadas para substrato, submetendo as mesmas a condições ambiente mais próximas das *ex vitro*, sendo este descrito no ponto 3.6.2.2.

Assim, os dois fatores testados neste ensaio – meio de aclimatização e meio de humedecimento – foram analisados de modo a determinar qual a melhor combinação para esta opção de aclimatização, encontrando-se os resultados para cada nos quadros apresentados no Anexo 7.8.4 (Quadro 31 e Quadro 32).

Os valores obtidos para os meios de aclimatização testados (Quadro 31, Anexo 7.8.4) não apresentam nenhuma diferença significativa, no entanto existe uma clara tendência que mostra a mistura turfa/perlite como a mais adequada para a aclimatização, com uma taxa de viabilidade média de 22,9%, ficando estes valores aquém dos pretendidos mesmo assim. Além deste, a turfa com uma taxa de 14,4% pode ter potencial como substrato para aclimatização. A perlite e a vermiculite, quando utilizados individualmente, tiveram uma taxa de viabilidade de 0%, indicando que não se deve optar por estes substratos. Também o meio de cultura MS, apresentou uma viabilidade de 0%, não sendo uma opção a seguir, neste caso.

Estes resultados são sustentados pelo número de sementes viáveis resultantes do ensaio (Figura 21a), tendo a mistura turfa/perlite obtido 16 plântulas viáveis para a transição para as condições em campo, a turfa 5 plântulas e a mistura turfa/vermiculite 2 plântulas.

Quanto ao meio de cultura utilizado para humedecimento do substrato e nutrição das plantas, pode observar-se (Quadro 32, Anexo 7.8.4) que, embora não existam diferenças significativas, o meio QL_{SA} teve, tendencialmente, uma taxa de viabilidade bem superior ao meio MM_{SA} (19,4%), tendo, no entanto, uma duração superior ao mesmo. Como se pode verificar pela Figura 21b, o meio QL_{SA} apresenta um maior número de plântulas viáveis (18 plântulas).

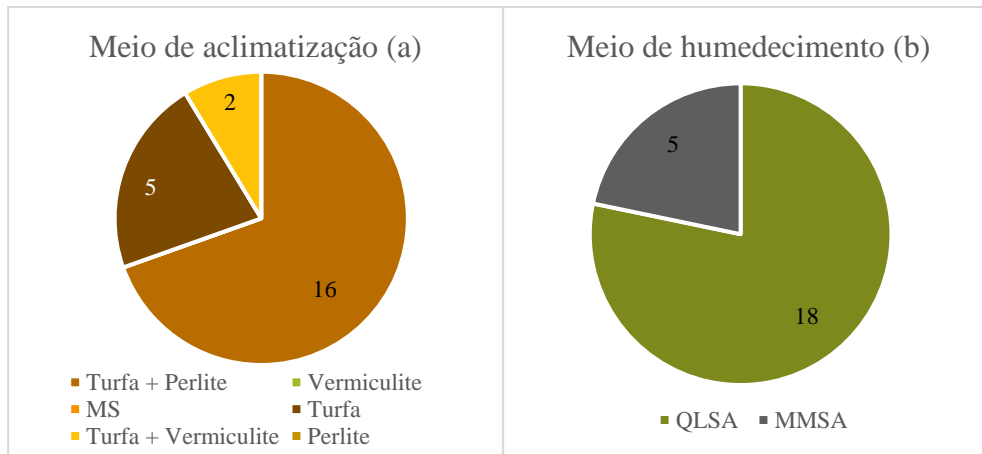


Figura 21 – Número de explantes viáveis para cada meio de aclimatização (a) e para cada meio de humedecimento (b) testados na aclimatização do ensaio 5.2 de framboesa conservada.

Quanto às contaminações, podemos verificar na Figura 33 (Anexo 7.8.4) que, relativamente ao meio de aclimatização, todas as modalidades testadas sofreram contaminações, sendo estas contaminações a razão de muitas perdas de explantes e, possivelmente, do insucesso de alguns dos meios testados. Isto também se verifica na observação das contaminações relativas ao meio de humedecimento, pelo que se sugere que, futuramente, sejam realizados ensaios para esta variante da aclimatização, com outros meios de aclimatização e humedecimento mas também com a utilização de um desinfetante na passagem das sementes do meio de germinação para o substrato, de modo a limpar qualquer resíduo de meio para evitar contaminação, bem como a utilização do meio de humedecimento com fungicida incorporado de modo a mitigar as contaminações e eliminar as perdas de explantes por esta razão.

Tendo em consideração os resultados obtidos, verifica-se que, neste caso, a melhor opção será a mistura turfa/perlite com humedecimento do substrato com meio QLSA, tendo sido esta combinação que obteve as maiores taxas de viabilidade, não invalidando a necessidade de realização de mais ensaios, com alterações, para uma melhor análise da hipótese de transferência direta da semente germinada para o substrato. Estas alterações consistem na testagem de diferentes abordagens a este método de aclimatização através de: testagem de diferentes substratos como, por exemplo, fibra de coco e serradura isoladamente mas também como substituição da turfa nas misturas; testagem da influência das condições de cultura de forma a encontrar as ideais ao objetivo pretendido, com o uso do fitoclima de forma a ter controlo manual e mais gradual das alterações de temperatura, humidade relativa e luminosidade; lavagem e passagem das estruturas germinadas por fungicida aquando da passagem para a aclimatização, de forma a evitar a passagem de resíduos de meio e agentes

patogénicos para o meio de aclimatização, reduzindo assim as contaminações; incorporação de fungicida no meio líquido de humedecimento para mitigar contaminações que não sejam eliminadas na lavagem.

De acordo com diversos autores (Gonçalves, 1992; Ismaini et al., 2017a; Kadleček et al., 2001; Moura et al., 2014), a fase de aclimatização é crucial para um protocolo de germinação de sucesso por ser a etapa onde existem maiores perdas de explantes. Nos presentes ensaios este facto confirmou-se ao obter-se um número de plântulas viáveis no fim da aclimatização muito inferior ao número que inicialmente entrou nesta fase.

No ensaio 5.1, para a framboesa conservada passaram para a fase de aclimatização 1245 sementes, sendo este número 60x superior ao número final obtido de 21 plântulas viáveis; para a framboesa fresca, na variedade Clarita não se obtiveram plântulas viáveis e na variedade 8F471, o número de plântulas viáveis obtido foi aproximadamente 6x inferior ao inicial; para a camarinha não se obteve nenhuma plântula no final da aclimatização. Por outro lado, para o ensaio 5.2 o número de plântulas obtidas no fim da fase de aclimatização é cerca de 12x inferior ao número que transitou para esta fase, tendo estes resultados evidenciando a importância desta etapa para o objetivo pretendido, pelo que mais estudos com foco na mesma são necessários de modo a consolidar o protocolo delineado, com a testagem das alterações mencionadas acima.

Tendo em conta o sucesso do meio MS como meio de aclimatização em ensaios de diversos autores (Moura et al., 2014; Pelizza et al., 2013; Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2017; Reis et al., 2008), testou-se este meio como opção para a primeira e segunda fase da aclimatização no ensaio 5.1 e com uma modalidade do ensaio 5.2. No entanto, nos presentes ensaios, apenas a sua utilização na segunda fase de aclimatização do ensaio 5.1 mostrou resultados semelhantes aos obtidos pelos autores, ficando mesmo assim aquém do pretendido. Em relação aos reguladores de crescimento, o meio MS era suplementado com BAP pelo facto de Erig et al. (2002) referirem o aumento da taxa de multiplicação com o mesmo, no entanto segundo Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón (2017) e Reis et al. (2008), o meio MS sem a presença de BAP apresenta melhores resultados. Nos ensaios realizados, verificou-se que a presença de BAP aparenta ter efeitos positivos na fase 2 da aclimatização (ensaio 5.2), não acontecendo o mesmo nas restantes etapas em estudo com este meio.

Segundo Pelizza et al. (2013) e Reis et al. (2008), as citocininas e auxinas são duas hormonas que apresentam uma forte influência sobre a multiplicação celular e desenvolvimento das plântulas. Como se pode observar nos resultados obtidos para a framboesa conservada e para a variedade 8F471 de framboesa fresca, os resultados obtidos com o meio de cultura MM são significativamente superiores aos restantes meios em estudo, isto pode estar relacionado

com o facto deste meio apresentar uma maior concentração de auxinas e citocininas, tendo uma concentração de 2 mg/L de IAA e cinetina, respetivamente.

No ensaio 5.2, analisou-se a possibilidade da transferência direta da fase de germinação para substrato, para isto avaliaram-se diferentes substratos de modo a determinar qual a melhor hipótese por este fator influenciar diretamente o sucesso desta fase de acordo com Pelizza et al. (2013). Como referido por Brito & Mourão (2012), a turfa não deve ser utilizada isoladamente, no entanto representa uma boa adição quando misturada com outro substrato, por outro lado a perlite grossa pode ser utilizada isoladamente com sucesso, sendo também uma excelente opção na mistura com a turfa, promovendo o equilíbrio entre o fator capacidade de retenção de água e arejamento. Os resultados obtidos provam isto mesmo através da obtenção das maiores taxas de viabilidade com a mistura de turfa e perlite (22,9%). No entanto é de referir que, embora reduzidas, o uso da turfa isolada permitiu a obtenção de plântulas viáveis no fim da aclimatização. Por outro lado, segundo Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón (2017), a vermiculite representa um bom substrato para a aclimatização de *Rubus*, no entanto os resultados obtidos nos presentes ensaios contrariam esta afirmação.

De modo a promover uma adaptação de sucesso às condições *ex vitro*, a alteração das condições de cultura para as plântulas deve ser feita de forma gradual, tendo em consideração diversos fatores a alterar (Debergh & Read, 1991; Gonçalves, 1992; Ismaini et al., 2017a; Pérez-Martínez & Castañeda-Garzón, 2017; Valasevich et al., 2009). Considerando os resultados obtidos no ensaio 5.1 ao ser realizada a testagem de substratos, onde as alterações efetuadas às condições de cultura não foram tão graduais – exposição ao ar (sem cobertura), luminosidade direta e natural, humedecimento do substrato com frequência irregular - e os resultados obtidos no ensaio 5.2 – substrato em frasco fechado, com manutenção do humedecimento através de rega regular, luminosidade indireta bem como a transição mais cuidada das sementes germinadas (remoção dos resíduos de meio) – verificou-se que foram obtidos resultados muito superiores quando as alterações às condições culturais são graduais, como no caso do ensaio 5.2, confirmando o que os autores referiram.

5. Conclusões e perspectivas

Nos ensaios preliminares, em framboesa conservada, definiu-se qual a melhor opção relativamente aos pré-tratamentos e método de desinfecção a utilizar nos ensaios futuros, sendo esta: hidratação durante 24 horas em água; fungicida como filme líquido de corte e o método de desinfecção D6 (descrito no ponto 3.3.2), tendo este último obtido uma taxa de germinação média de 75,9%. Estes ensaios foram já objeto de apresentação no VI Colóquio Nacional da Produção de Pequenos Frutos sob a forma de painel, originando uma publicação que se encontra no Anexo 7.9.

Relativamente aos ensaios para os restantes fatores em estudo: na framboesa conservada, obteve-se uma taxa média de germinação com um máximo de 97,6% em meio de cultura QLs, tendo sido obtidas ao longo dos ensaios placas com taxa de germinação de 100%, valores bastante superiores aos obtidos por outros autores. Para a framboesa fresca, as taxas de germinação obtidas foram inferiores, tendo um máximo de 55,5% para a variedade Clarita em meio QLs e de 48,7% para a variedade 8F471 em meio MM_s, estes resultados indicam que tanto as variedades testadas como o estado de conservação não permitem a maximização da germinação desta espécie. No que respeita o estado de conservação a utilizar para a framboesa, pode concluir-se que os melhores resultados foram obtidos para o estado conservado, com a germinação das sementes em meio QLs, que obteve não só as maiores taxas de germinação (78%), mas também a maior percentagem de sementes transferidas para a fase seguinte (77,3%) no menor período de tempo (23,4 dias). Assim, para atingir o objetivo pretendido pelo programa de melhoramento para esta espécie deverá optar-se pelo protocolo de germinação em *in vitro* de maior sucesso, com a utilização de meio de cultura suplementado com GA₃ (pelo seu efeito positivo na germinação) e sementes conservadas, podendo ser utilizada a variedade Polka ou outra com um maior potencial germinativo.

Para a aclimatização desta espécie, verificou-se que a framboesa fresca, da variedade 8F471, obteve um maior número de plântulas viáveis para o ambiente *ex vitro*, tendo um total de 31 plântulas no fim da segunda fase do ensaio 5.1, enquanto a framboesa conservada obteve um total de 21 plântulas prontas para campo. Estes valores são muito inferiores aos pretendidos no programa de melhoramento, pelo que é necessária uma nova abordagem à fase de aclimatização, com a testagem de outros métodos, de modo a maximizar o número de plântulas viáveis para ambiente *ex vitro*, providas da germinação *in vitro*.

Para a espécie *Corema album*, obtiveram-se taxas de germinação superiores às obtidas por Santos (2013), no entanto a taxa média de germinação de 37,4% no meio de cultura MM_s,

não ultrapassou os valores obtidos por Lisboa (2017) com o método de escarificação e estratificação. Estes resultados podem dever-se ao tempo de armazenamento das sementes que poderá induzir dormência bem como o facto de o protocolo utilizado não ser o mais adequado a esta espécie, pelo que será importante a realização de ensaios dedicados à mesma, com adaptação do protocolo às suas características e necessidades, visto que as sementes se comportaram de forma diferente da outra espécie em estudo, quando submetidas aos mesmos procedimentos. Estes ensaios também devem ser realizados com sementes de outra colheita e no estado de conservação em fresco, por este não ter sido testado neste estudo. Quanto à fase de aclimatização, não se obtiveram plântulas viáveis ao fim desta fase, reforçando a ideia de que mais estudos devem ser realizados para a camarinha.

Com os estudos efetuados para as diferentes espécies e estados de conservação, submetidos a vários procedimentos para a elaboração de um protocolo de germinação eficiente, pode concluir-se que o método de germinação *in vitro* apresenta taxas de germinação muito superiores aos métodos *in vivo* testados por outros autores, pelo que é uma boa opção para o programa de melhoramento. No entanto, a fase de aclimatização para este protocolo, uma das etapas mais importantes para o seu sucesso, não teve os resultados pretendidos, tendo sido obtida uma quantidade muito reduzida de plântulas viáveis, sendo as mesmas muito débeis e pouco adaptadas ao ambiente *ex vitro*. Na fase final dos ensaios, testou-se a hipótese da transição direta da semente germinada para um meio de aclimatização com condições semelhantes às *ex vitro* (substrato), tendo a mesma apresentado resultados promissores para o sucesso da fase de aclimatização mas ainda aquém dos pretendidos, pelo que são necessários mais ensaios relativos a esta etapa, com diversas modalidades bem como alterações no método, de modo a retirar mais conclusões sobre a mesma e, possivelmente, estabilizar o protocolo de germinação para estas espécies, com uma fase de germinação e aclimatização eficientes.

6. Referências bibliográficas

- Aguiar, C. (2012a). Morfologia e Função. In *Botânica para ciências agrárias e do ambiente. Vol I* (pp. 48). Bragança, Portugal: Instituto Politécnico de Bragança.
- Aguiar, C. (2012b). Reprodução e Evolução. In *Botânica para ciências agrárias e do ambiente. Vol II* (pp. 86). Bragança, Portugal: Instituto Politécnico de Bragança.
- Andrade, S., Gonçalves, F. & Pinho, R. (2015). *Physical-chemical properties of Corema album (white crowberry or camarinha)*. Paper presented at the International Conference of Engineering: Food Engineering and Properties of Universidade da Beira Interior, Portugal.
- Avanzato, D. & Cherubini, S. (1993). Influence of the substrates on the direct rooting of *ex vitro*, MM106 apple microcuttings. *Acta Horticulturae*, 342, 297–302. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.342.35>
- Barney, D. L., Bristow, P.R., Cogger, C.G., Fitzpatrick, S.M., Hart, J.M., Kaufman, D., ... Tanigoshi, L. K. (2007). Commercial red raspberry production in the Pacific Northwest. *Pacific Northwest Extension*, 598 (October), 1-110.
- Baskin, C. C. & Baskin, J. M. (2014). *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. (2th ed., pp. 1600). San Diego, CA: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2013-0-00597-X>
- Baskin, J. M. & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1079/ssr2003150>
- Bewley, D. J. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9(7), 1055–1066. <https://doi.org/https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>
- Bewley, D. J., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M. & Nonogaki, H. (2013). *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy* (3th ed., pp. 392). New York, NY: Springer Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>
- Brito, L. M. & Mourão, I. (2012). Características dos substratos para horticultura: Composição e características dos constituintes individuais dos substratos (Parte II / II). *Agrotec*, June, 64–69.
- Clark, J. R. & Moore, J. N. (1993). Longevity of *rubus* seeds after long-term cold storage. *Horticultural Science*, 28(9), 929–930. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.28.9.929>
- Contreras, E., Grez, J. & Gambardella, M. (2016). Scarification and stratification protocols for raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed germination. *Acta Horticulturae*, 1133, 153–157. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1133.23>
- Debergh, P. C. & Read, P. E. (1991). Micropropagation. In P. C. Debergh & R. H. Zimmerman,

- Micropropagation: Technology and application* (pp. 1–13). Dordrecht, Netherlands: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_1
- Diaz-Barradas, M. C., Correia, O., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Clavijo, A., Silva, P. & Ferreira, S. (2000). Distribuição de sexos na espécie dióica *Corema album* ao longo de um gradiente climático. *Revista de Biologia*, 18(1–4), 7–22.
- Dixon, R. A. & Gonzales, R. A. (1995). *Plant cell culture: A practical approach* (2th ed., pp. 256). Oxford, UK: IRL Press.
- Edwards, T. I. (1932). Temperature relations of seed germination. *The Quarterly Review of Biology*, 7(4), 428–441.
- Erig, A. C., De Rossi, A. & Fortes, G. R. de L. (2002). 6-Benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. *Ciência Rural*, 32(5), 765–770. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782002000500005>
- Finch-Savage, W. E. & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501–523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Funt, R. C. & Hall, H. K. (2013). *Raspberries* (pp. 282). Oxfordshire, UK: CABI Publishing. <https://doi.org/10.7202/1004734ar>
- Galletta, G. J., Draper, A. D. & Puryear, R. L. (1986). Characterization of *Rubus* progenies from embryo culture and from seed germination. *Acta Horticulturae*, 183, 83–90. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1986.183.10>
- Gonçalves, J. C. (1992). A propagação de plantas por sistemas *in vitro*. *Agroforum: Revista da Escola Superior Agrária de Castela Branco, Ano 2*(4), 17–22.
- GPP. (2006). Frutos frescos e secos: Caracterização da produção e da comercialização em Portugal - Pequenos frutos. In GPP, *Anuário vegetal 2006* (pp. 90-91). Lisboa, Portugal: Castel - Publicações e Edições, SA.
- Graham, J. & Brennan, R. (2018). Introduction to the *Rubus* genus. In J. Graham & R. Brennan, *Raspberry: Breeding, challenges and advances* (pp. 1–16). New York, NY: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99031-6>
- Graham, J. & Woodhead, M. (2011). *Rubus*. In C. Kole, *Wild crop relatives: Genomic and breeding resources - Temperate fruits* (pp. 179–196). Berlin, Alemanha: Springer -Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8>
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. & Geneve, R. L. (2018). *Hartmann & Kester's Plant Propagation Principles and Practices* (9th ed., pp. 1024). New York, NY: Pearson.
- Hudson, J. P. (1959). Effects of environment on *Rubus idaeus* L.: Morphology and

- development of the raspberry plant. *Journal of Horticultural Science*, 34(3), 163–169. <https://doi.org/10.1080/00221589.1959.11513955>
- Ismaini, L., Destri, D. & Surya, M. I. (2017a). Micropropagation of *Rubus chrysophyllus* Reinw. ex Miq. and *Rubus fraxinifolius* Poir. *Journal of Tropical Life Science*, 7(1), 72–76. <https://doi.org/10.11594/jtls.07.01.12>
- Ismaini, L., Surya, M. I. & Destri, D. (2017b). *In vitro* plant regeneration from hypocotyl of Arben (*Rubus fraxinifolius* Poir.). *Australian Journal of Crop Science*, 11(4), 474–478. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.04.359>
- Jennings, D. L. (1988). Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth. In *Fruit Breeding* (pp. 230). Londres, UK: Academic Press.
- Kadleček, P., Tichá, I., Haisel, D., Apková, V. & Schäfer, C. (2001). Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science*, 161(4), 695–701. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00456-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00456-3)
- Koornneef, M., Bentsink, L. & Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. *Plant Biology*, 5(1), 33–36.
- León-González, A. J., Truchado, P., Tomás-Barberán, F. A., López-Lázaro, M., Barradas, M. C. D. & Martín-Cordero, C. (2013). Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in *Corema album* (L.) D. Don berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(1), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.10.003>
- Lim, Y. K. & Knight, V. H. (2000). The successful transfer of primocane fruiting expression from raspberry to *rubus* hybrid berry. *Euphytica*, 116(3), 257–263. <https://doi.org/10.1023/A:1004052214370>
- Lisboa, A. C. O. (2017). *Germinação de sementes e desenvolvimento embrionário de Corema album: Efeito dos tratamentos físicos e químicos*. (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Agronomia. Lisboa: Portugal.
- Manzur, J. P., Calvache-Asensio, M. de las N. & Rodriguez-Burruezo, A. (2014). Growth regulators and darkness increase efficiency in *in vitro* culture of immature embryos from peppers. *Scientia Agricola*, 71(6), 488–493. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0230>
- Marques, E. M. M. S. (2007). *Caracterização das populações de Camarinha (Corema album L.) no Cabo Carvoeiro*. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa: Portugal. <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/1332>
- Martínez-Cruz, N., Arévalo Niño, K., Verde Star, M., Oranday Cárdenas, A., Rivas Morales, C., Treviño Neávez, J. & Morales Rubio, M. (2013). Germinación *in vitro* e inducción de

- callo en *Rubus adenotrichus* Schlttdl. *Polibotánica*, 0(35), 99–107.
- Mian, M. A., Skirvin, R. M., Norton, M. A. & Otterbacher, A. G. (1995). Drying interferes with germination of blackberry (*Rubus* sp.) seeds *in vitro*. *HortScience*, 30(1), 124–126. <https://doi.org/10.21273/hortsci.30.1.124>
- Moura, L. C., Titon, M., Fernandes, J. S. C. & Santana, R. C. (2014). Germinação *in vitro* e aclimatação de plântulas de sucupira-preta (*Bowdichiavirgilioides Kunth.*). *Bioscience Journal*, 30(5), 678–687.
- Murashige, T. & Miller, L. R. (1976). Tissue culture propagation of tropical foliage plants. *In Vitro*, 12(12), 797–813.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Nesme, X. (1985). Respective effects of endocarp, testa and endosperm, and embryo on the germination of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seeds. *Can. J. Plant Sci*, 65, 125–130.
- Oliveira, P. B. & Dale, A. (2012). *Corema album* (L.) D. Don, the white crowberry-a new crop. *Journal of Berry Research*, 2(3), 123–133. <https://doi.org/10.3233/JBR-2012-033>
- Oliveira, P. B. & Fonseca, L. L. (2007). Framboesa: Tecnologias de Produção. *Divulgação Agro 556 n°3* (pp. 40).
- Oliveira, P. B., Lopes-Da-Fonseca, L. & Monteiro, A. A. (2002). Combining different growing techniques for all year round red raspberry production in Portugal. *Acta Horticulturae*, 585, 545–555. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2002.585.88>
- Oliveira, P. B., Valdiviesso, T., Esteves, A., Mota, M. & Fonseca, L. L. (2007). A planta de framboesa: Morfologia e fisiologia. *Divulgação Agro 556 n°1* (pp. 32).
- Peacock, D. N. & Hummer, K. E. (1996). Pregermination studies with liquid nitrogen and sulfuric acid on several *Rubus* species. *HortScience*, 31(2), 238–239. <https://doi.org/10.21273/hortsci.31.2.238>
- Pelizza, T. R., Muniz, J., Camargo, P., Kretschmar, A. A. & Rufato, L. (2013). *Ex vitro* rooting and acclimatization micropropagated seedlings of blackberry “Xavante.” *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(1), 329–332. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000100039>
- Pérez-Martínez, B. A. & Castañeda-Garzón, S. L. (2017). *In vitro* propagation of *Rubus macrocarpus* Benth. and *Rubus bogotensis* Kunth, as an *ex situ* conservation strategy. *Acta Agronómica*, 66(1), 102–108. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n1.54182>
- Popinigis, F. (1985). *Fisiologia da semente* (2ª ed., pp. 87). Brasília - DF, Brasil.
- Quoirin, M. & Lepoivre, P. (1977). Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* Sp. *Acta*

- Horticulturae*, 78, 437–442. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1977.78.54>
- Reis, S., Pinto, B. P., Eduardo, J., Rosado, S., Domiciano, L. & Corrêa, M. (2008). Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. *Revista Ceres*, 55(3), 160–167.
- Santos, M. S. (2013). *Efeito de pré-tratamentos na germinação de sementes da espécie Corema album* L. (subsp. *album*). (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Agronomia. Lisboa: Portugal.
- Santos, M. S., De Oliveira, C. M., Valdivieso, T. & Oliveira, P. B. (2014). Effects of pretreatments on *Corema album* (L.) D. Don (subsp. *album*) seeds' germination. *Journal of Berry Research*, 4(4), 183–192. <https://doi.org/10.3233/JBR-140079>
- Staszak, A. M., Pers-Kameczyc, E., Klupczyńska, E. A. & Pawłowski, T. A. (2019). Expression of abscisic and gibberellic acid signalling factors in *Fagus Sylvatica* L. seeds during dormancy breaking and germination. *Dendrobiology*, 81, 22–30. <https://doi.org/10.12657/denbio.081.003>
- Sujith, S. S. (2015). *In vitro* techniques for conservation of recalcitrant species. (Seminar Report). Kerala Agricultural University, India.
- Thompson, K. & Grime, J. P. (1979). Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *The Journal of Ecology*, 67(3), 893. <https://doi.org/10.2307/2259220>
- Toole, E. H., Toole, V. K., Borthwick, H. A. & Hendricks, S. B. (1955). Interaction of temperature and light in the germination of seeds. *Plant Physiology*, 473–478.
- Valasevich, N., Kukharchyk, N. & Krasinskaya, T. (2009). Influence of adaptation substrates on morphological development of raspberry plantlets during acclimatization *ex vitro*. *Acta Horticulturae*, 812, 409–414. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.812.57>
- Wada, S., Kennedy, J. A. & Reed, B. M. (2011). Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. *Scientia Horticulturae*, 130(4), 762–768. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.034>
- Wada, S. & Reed, B. M. (2011). Standardizing germination protocols for diverse raspberry and blackberry species. *Scientia Horticulturae*, 132, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.10.002>
- Yan, A. & Chen, Z. (2020). The control of seed dormancy and germination by temperature, light and nitrate. *Botanical Review*, 86(1), 39–75. <https://doi.org/10.1007/s12229-020-09220-4>

7. Anexos

7.1 Dimensões do material vegetal



Figura 22 – Dimensões da semente de camarinha (a) e da semente de framboesa (b).



Figura 23 – Comparação entre a semente de camarinha e framboesa, a nível de dimensões.

7.2 Elaboração dos meios de cultura para os ensaios realizados

7.2.1. Protocolo para preparação das soluções stock

Determinados os elementos a adicionar a cada meio de cultura (Quadro 14), procedeu-se à preparação das soluções stock de cada um de forma a tê-los disponíveis para a preparação do meio. Foi efetuada uma só solução stock, para cada elemento, a utilizar para todos os meios pelo que se utilizou a menor concentração do elemento e, posteriormente, ajustou-se a quantidade de solução necessária adicionar ao meio em questão para que seja fornecida a concentração correta de cada elemento.

Quadro 14 – Concentrações necessárias à preparação dos meios de cultura em estudo, segundo bibliografia consultada.

	Componentes	Meio MS	Meio MM	Meio QL
		mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Macronutrientes				
	NH ₄ NO ₃	1650	1650	400
	KNO ₃	1900	1900	1800
	KH ₂ PO ₄	170	170	270
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	1200
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	-
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	-	360
	MgSO ₄	-	180,69	-
	NaH ₂ PO ₄	-	147,81	-
Micronutrientes				
	Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
	Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3
	H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3	1
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
	KI	0,83	0,83	0,08
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Vitaminas				
	Mio-inositol	100	100	100
	Tiamina.HCl	0,1	0,4	0,4
	Piridoxina.HCl	0,5	-	-
	Ácido nicotínico	0,5	-	-
	Glicina	2	-	-
Reguladores de crescimento				
Auxina	IAA	-	2	-
	2,4-D	-	-	0,02
Citocinina	Kinetina	-	2	-
	BAP	0,5	-	1
Adenina	Ads	-	80	-
Giberelina	GA ₃	-	-	0,1
Fonte de carbono				
	Sacarose	30000	30000	20000
Agente solidificante				
	Agar	10000	8000	8000

Foram efetuadas soluções stock de 10 ml/L para os macronutrientes e de 5 ml/L para os micronutrientes, colocadas no frigorífico para utilização posterior. Os macronutrientes foram preparados individualmente enquanto os micronutrientes, tirando o Fe₂SO₄.7H₂O e Na₂EDTA, foram preparados conjuntamente originando uma solução de mistura de micronutrientes.

No caso das vitaminas, efetuaram-se soluções stock de 10 ml/L, individuais para cada elemento, armazenadas em congelador para uso posterior. O mio-inositol não foi submetido ao

processo de preparação de solução stock pelo facto de ser diretamente adicionado, em pó, aquando da preparação do meio.

Como os reguladores de crescimento são adicionados ao meio em quantidades inferiores aos elementos acima mencionados, efetuaram-se soluções stock de 1 mg/ml de cada elemento, que após preparação foram acondicionadas em tubos de 2 ml e colocadas no congelador para uso posterior. No caso dos reguladores IAA e cinetina, na preparação da solução stock, para possibilitar a diluição dos mesmos em água, foram adicionadas duas gotas de solução de 0,1 M de NaOH. Relativamente à adenina a ser adicionada ao meio MM – o Ads – não se efetuou solução stock devido à dificuldade na diluição da mesma. Assim, este elemento foi feito aquando da preparação do meio, procedendo-se à diluição de 80 mg em 10 ml de água esterilizada, quantidades necessárias para 1 L de meio, sendo diluído a uma temperatura de cerca de 50°C.

7.2.2. Protocolo para preparação do meio de cultura

Finalizada a preparação das soluções stock dos sais, vitaminas e reguladores de crescimento, procedeu-se à preparação do meio de cultura pretendido. Este procedimento seguiu os mesmos passos, salvo algumas particularidades que serão mencionadas. Assim, o protocolo para a preparação de 1 L de meio, seguiu os seguintes passos:

1º Cálculo das quantidades necessárias (em ml) de cada elemento, consoante a sua concentração na solução stock, para a quantidade de meio requerida (Quadro 15);

2º Pesagem da quantidade necessária de mio-inositol, agar e sacarose, elementos adicionados no estado sólido, sendo o último utilizado apenas na preparação de meio com sacarose;

3º Colocação de mio-inositol e sacarose (se aplicável) num copo de precipitação com cerca de 100 ml de água esterilizada para auxiliar na diluição destes;

4º Adição dos macro e micronutrientes bem como das vitaminas ao copo de precipitação, individualmente, nas quantidades requeridas, com o recurso a pipetas e micropipetas, respetivamente;

5º Adição de água esterilizada até cerca de 900 ml e colocação no agitador eletromagnético com aquecimento, a cerca de 350 rpm e entre 150-200°C, para iniciar a mistura dos elementos;

6º Após uns minutos, adicionar o agar para iniciar a cozedura do mesmo. O meio está pronto para ajuste de pH quando se encontra translúcido;

7º Após arrefecimento parcial do meio, adicionam-se os reguladores de crescimento. No caso do meio QL, o 2,4-D e o BAP, sendo o GA₃ apenas adicionado após autoclavagem. Para o meio MM, adiciona-se o IAA e a cinetina bem como o Ads, preparado no momento. Por fim, para o meio MS, adiciona-se o BAP;

8º Antes de proceder à autoclavagem o pH do meio foi ajustado consoante o meio de cultura, com uma solução de 0,1N ou 10M de NaOH e/ou 1N de HCl. Assim, para o meio QL, foi ajustado para 5, para o meio MM, para 5,7 e para o meio MS, para 5,8;

9º Transferência do meio para uma proveta de modo a acertar o volume para 1000 ml e, posteriormente, colocação em frasco próprio para a autoclavagem, durante 20 minutos a 120 °C e 1,4 bar;

10º Retirado do autoclave, e após arrefecimento procedeu-se ao plaqueamento do mesmo em placas de Petri, na câmara de fluxo laminar. No caso do meio QL, o GA₃ deve ser filtrado, e posteriormente adicionada a quantidade necessária ao meio.

Quadro 15 – Concentrações relativas às soluções stock e à quantidade utilizada para 1 L de meio de cultura, de macro e micro nutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, para cada meio testado.

Componentes	Soluções stock			Quantidade necessária		
	Meio MS	Meio MM	Meio QL	Meio MS	Meio MM	Meio QL
	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹	ml L ⁻¹	ml L ⁻¹	ml L ⁻¹
Macronutrientes	10 ml					
NH ₄ NO ₃	40	40	40	41,25	41,25	10
KNO ₃	180	180	180	10,6	10,6	10
KH ₂ PO ₄	17	17	17	10	10	15,8
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	120	-	-	10
CaCl ₂ .2H ₂ O	40,4	40,4	-	10	10	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	36	-	-	10
MgSO ₄	36	36	-	10	10	-
NaH ₂ PO ₄	14,78	14,78	-	10	10	-
Micronutrientes	5 ml					
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	5,56	5,56	5,56	5	5	5
Na ₂ EDTA	7,46	7,46	7,46	5	5	5
H ₃ BO ₃	1,24	1,24	1,24	5	5	5
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,02	0,02	0,02			
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,72	1,72	1,72			
KI	0,166	0,166	0,166			
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05	0,05	0,05			
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005	0,005	0,005			
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005	0,005	0,005			
Vitaminas	10 ml					
Mio-inositol	Adiciona-se 0,1 g diretamente na preparação do meio (em pó)					
Tiamina.HCl	0,05	0,05	0,05	200 µl	800 µl	800 µl*
Piridoxina.HCl	0,05	-	-	1	-	-
Ácido nicotínico	0,05	-	-	1	-	-

Glicina	0,05	-	-	4	-	-
Reguladores de crescimento	1 ml					
IAA	-	0,025	-	-	-	-
2,4-D	-	-	0,025	-	2	20 µl
Cinetina	-	0,025	-	-	-	-
BAP	0,025	-	0,025	1	2	1
Ads	Dilui-se 80 mg em 10 ml de água esterilizada e adiciona-se diretamente ao meio. Apenas se utiliza no meio MM.					
GA ₃	-	-	0,025	-	-	100 µl

*quantidades em ml muito pequenas pelo que se converteu em µl/L.

7.3 Germinação de sementes de framboesa conservada

Quadro 16 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada solução de corte no ensaio 1 relativo à framboesa conservada.

Solução de corte	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
Água	56,9 AB	6,7 A	37,8 A	55,6 AB
Fungicida	69,9 A	9,0 A	42,6 A	69,3 A
AA	38,6 B	8,6 A	35,0 A	38,6 B

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

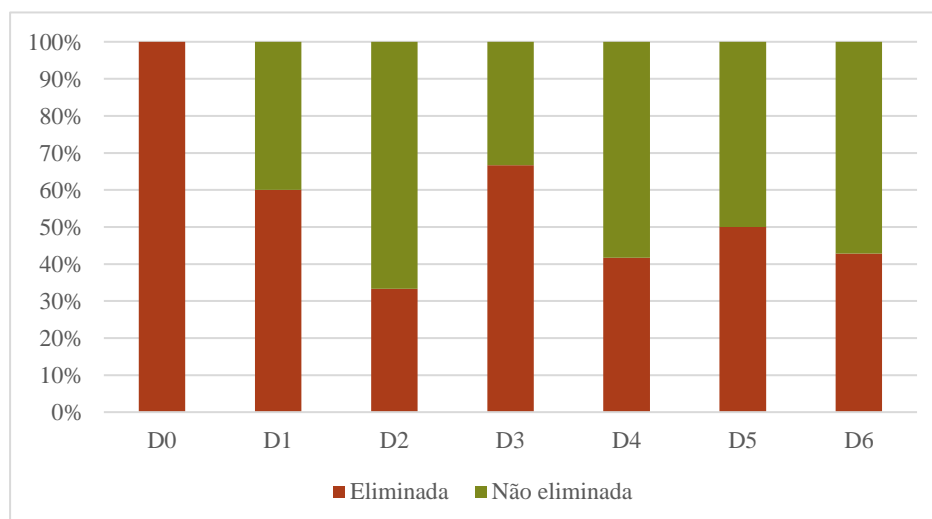


Figura 24 – Percentagem de placas em ensaio eliminadas por contaminação, em função do método de desinfecção utilizado em sementes de framboesa conservada.

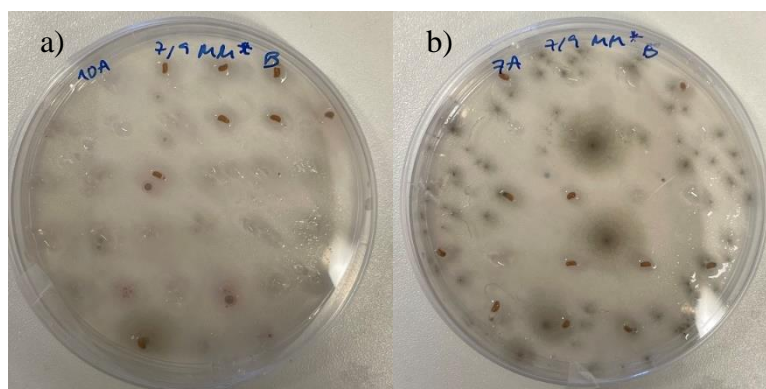


Figura 25 – Placa com sementes contaminadas (contaminações isoladas) (a) e placa contaminada (eliminada por essa razão) (b), respeitante ao ensaio 1 de framboesa conservada.

Quadro 17 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada meio de cultura testado no ensaio 4, com framboesa conservada.

Meio	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
QL _s	97,6 A	8,0 A	27,3 A	96,6 A
MM _s	89,0 A	8,0 A	24,3 A	89,0 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

7.4 Germinação de sementes de framboesa fresca

Quadro 18 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada método de escarificação mecânica testado no ensaio 2, com framboesa fresca da variedade Clarita.

Método de escarificação mecânica	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
Extração da semente	45,4 A	5,0 A	19,0 A	45,4 A
Extração do embrião	50,9 A	12,0 A	17,5 A	50,9 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

Quadro 19 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada meio de cultura testado no ensaio 2, com framboesa fresca da variedade 8F471.

Meio	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
QL _s	34,6 A	6,5 A	33,6 A	34,2 A
MM _s	48,7 A	6,5 A	39,1 A	46,9 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

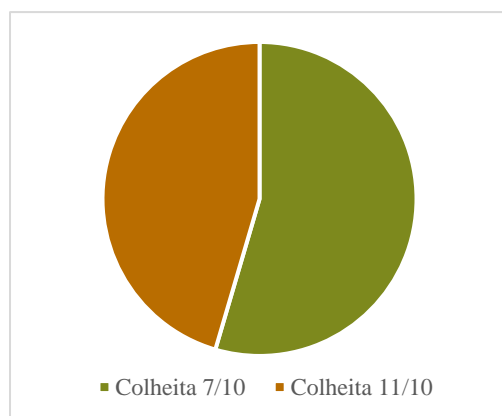


Figura 26 – Percentagem de placas em ensaio, da variedade 8F471, com sementes contaminadas.

Quadro 20 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada meio de cultura testado no ensaio 2, com framboesa fresca da variedade Clarita.

Meio	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
QL _S	55,5 A	6 A	22 A	53,3 A
MM _S	40,2 B	6 A	17,6 A	39 B

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha = 0,05$.

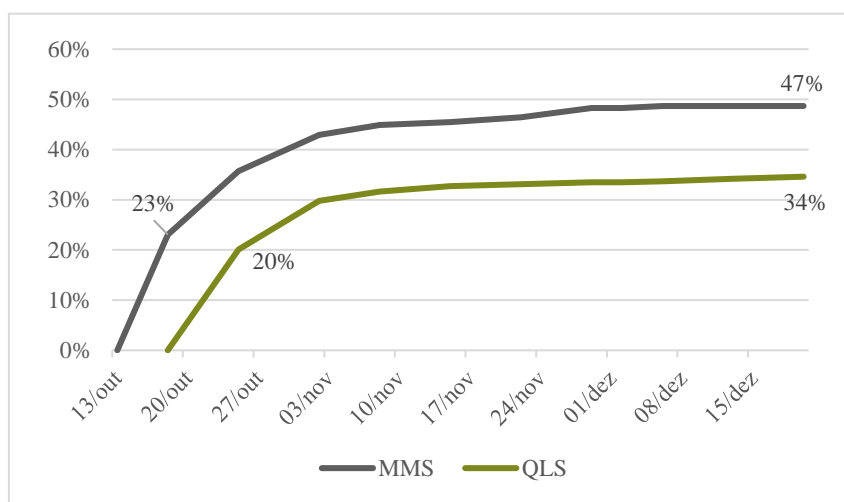


Figura 27 – Taxa de germinação média (em %) ao longo do ensaio 2 para framboesa fresca da variedade 8F471, em função do meio de cultura. Os registos para o ensaio com o meio QL_S iniciaram-se no dia 25/10 e com o meio MM_S no dia 18/10.

7.5 Efeito da variedade de framboesa fresca na germinação

Quadro 21 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada variedade de framboesa fresca testada no ensaio 2, para o meio de cultura QL_s.

Variedade	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
8F471	34,6 A	6,5 A	33,6 A	34,2 B
Clarita	55,6 A	5,0 B	21,3 A	53,3 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

Quadro 22 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada variedade de framboesa fresca testada no ensaio 2, para o meio de cultura MM_s.

Variedade	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
8F471	48,7 A	6,5 A	39,1 A	46,9 A
Clarita	39,0 A	5,0 B	16,7 B	37,6 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

7.6 Efeito do estado de conservação da framboesa na germinação

Quadro 23 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização respeitantes a cada estado de conservação estudado para a framboesa, no meio MM_s.

Estado de conservação	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
Conservado	76,3 A	6,9 A	22,0 A	76,3 A
Fresco	39,0 B	5,0 B	16,7 A	37,6 B

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

Quadro 24 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização respeitantes a cada estado de conservação estudado para a framboesa, no meio QL_s.

Estado de conservação	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
Conservado	78,0 A	6,4 A	23,4 A	77,3 A
Fresco	55,6 A	5,0 A	21,3 A	53,3 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

7.7 Germinação de sementes de camarinha

Quadro 25 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização respeitantes à solução de hidratação do pré-tratamento estudada para a camarinha.

Solução de hidratação	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
24h em água	42,8 A	7,0 A	17,5 A	17,4 A
48h em água	29,1 B	6,0 A	16,5 A	23,4 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramético), com $\alpha=0,05$.

Quadro 26 – Taxa de germinação média, velocidade de germinação média, duração média do ensaio e percentagem média de sementes transferidas para a fase de aclimatização relativas a cada método de desinfecção testado para a camarinha.

Desinfecção	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)	Duração do ensaio (dias)	Sementes para aclimatização (%)
D5	34,8 A	7,0 A	28,0 A	34,8 A
D6	34,5 A	6,3 B	14,1 B	17,6 B

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramético), com $\alpha=0,05$.

7.8 Aclimatização



Figura 28 – Condições de testagem para as plântulas providas da segunda fase do ensaio 5.1. As plântulas foram dispostas, numa caixa plástica fechada (com furos para entrada de oxigénio), em substrato turfa/perlite sendo, posteriormente, colocadas em suporte plástico onde se procedeu à colocação do meio de cultura para humedecimento.

7.8.1 Aclimatização framboesa conservada (ensaio 5.1)

Quadro 27 – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de cultura em estudo na fase 1 da aclimatização (ensaio 5.1) para a framboesa conservada.

Meio	Taxa de viabilidade (%)	Duração da aclimatização (dias)
MS (placa)	7,9 B	36,9 A
MM	14 A	28,6 B
QL	13,4 B	41,4 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramético), com $\alpha=0,05$.

Quadro 28 – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de cultura em estudo na fase 2 da aclimatização (ensaio 5.1) para a framboesa conservada.

Meio	Taxa de viabilidade (%)	Duração da aclimatização (dias)
MS (tubo)	21,0 B	30,1 A
MS (frasco)	25,0 A	38,5 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

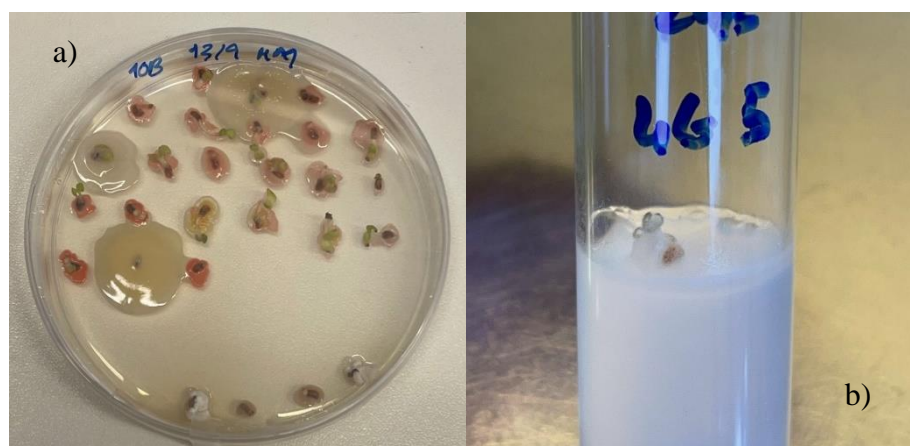


Figura 29 – Placa de Petri com estruturas germinadas de framboesa conservada contaminadas, na fase 1 do ensaio 5.1 (a) e plântula de framboesa conservada contaminada, em tubo de ensaio, na fase 2 do ensaio 5.1 (b).

7.8.2 Aclimatização framboesa fresca (ensaio 5.1)

Quadro 29 – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de cultura em estudo na fase 1 da aclimatização (ensaio 5.1) para a variedade 8F471 de framboesa fresca.

Meio	Taxa de viabilidade (%)	Duração da aclimatização (dias)
QL	10,7 B	16,8 A
MM	26,0 A	12,4 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

Quadro 30 – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de cultura em estudo na fase 2 da aclimatização (ensaio 5.1) para a variedade 8F471 de framboesa fresca.

Meio	Taxa de viabilidade (%)	Duração da aclimatização (dias)
MS (tubo)	10,0 B	16,0 B
MS (frasco)	38,7 A	26,8 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

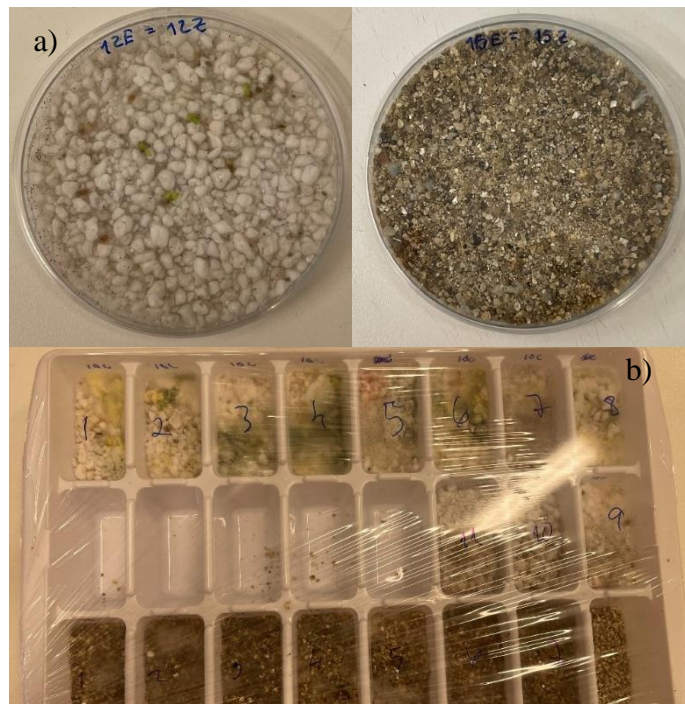


Figura 30 – Testagem da transferência de sementes germinadas diretamente para substrato (condição próxima à *ex vitro*) em placa de Petri fechada (a) e em cuvete plástica coberta (b).

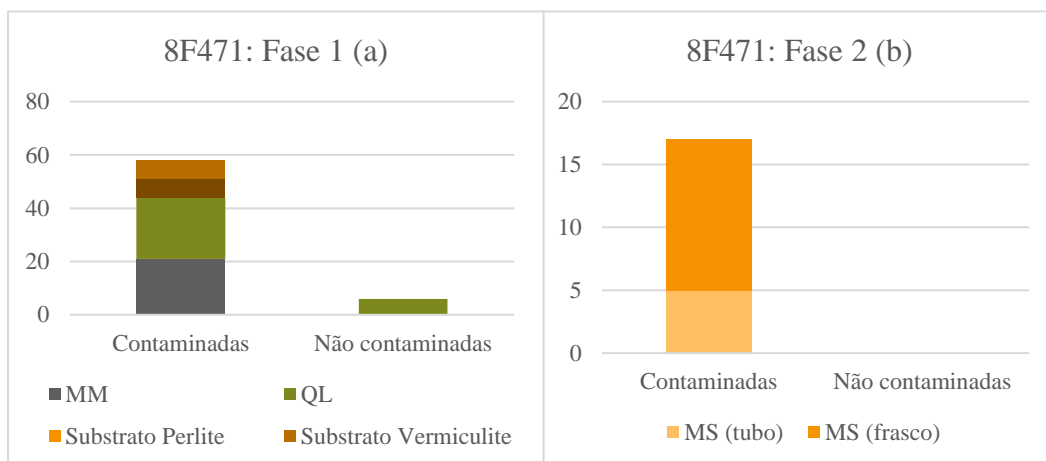


Figura 31 – Número de placas contaminadas para cada meio de cultura estudado no ensaio 5.1, para a variedade 8F471 de framboesa fresca, na fase 1 (a) e na fase 2 (b) da aclimatização.

7.8.3 Aclimatização camarinha conservada (ensaio 5.1)

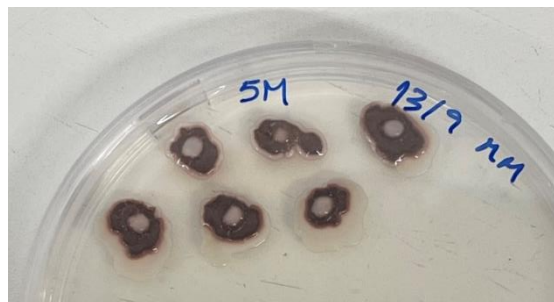


Figura 32 – Contaminação de sementes germinadas na fase 1 do ensaio 5.1, para a camarinha conservada.

7.8.4 Aclimatização framboesa conservada (ensaio 5.2)

Quadro 31 – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de aclimatização em estudo no ensaio 5.2 para a framboesa conservada.

Meio de aclimatização	Taxa de viabilidade (%)	Duração da aclimatização (dias)
Meio MS	0,0 A	18,0 A
Turfa	14,4 A	22,0 A
Perlite	0,0 A	18,0 A
Turfa + Perlite	22,9 A	17,8 A
Vermiculite	0,0 A	16,5 A
Turfa + Vermiculite	5,0 A	22,0 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

Quadro 32 – Taxa de viabilidade média e duração média da aclimatização relativa a cada meio de cultura para humedecimento em estudo no ensaio 5.2 para a framboesa conservada.

Meio de humedecimento	Taxa de viabilidade (%)	Duração da aclimatização (dias)
MM _{SA}	5,2 A	17,9 A
QL _{SA}	19,4 A	20,1 A

As letras diferentes em coluna correspondem a valores significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico), com $\alpha=0,05$.

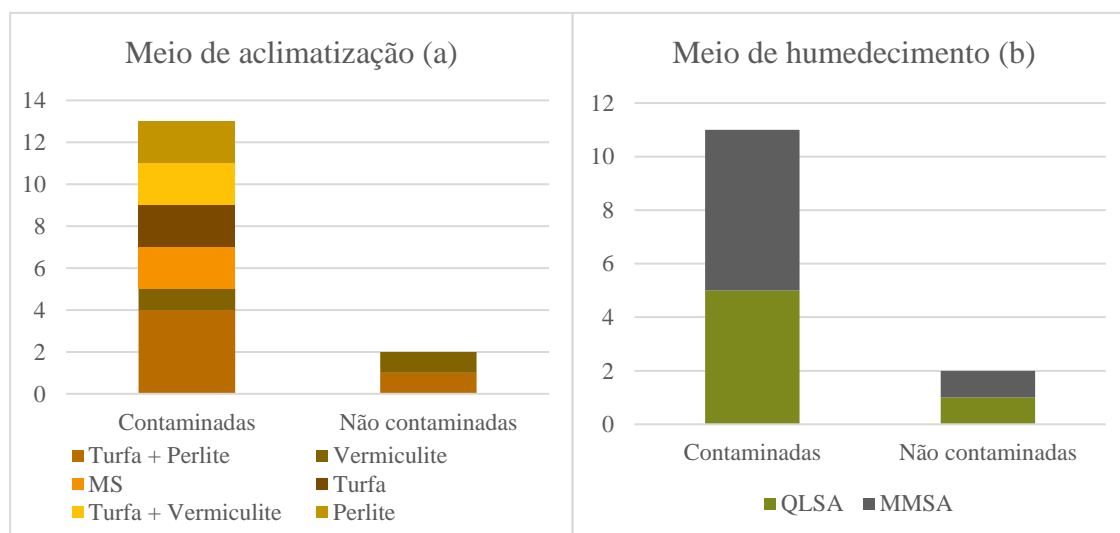


Figura 33 – Número de frascos contaminados para cada meio de aclimatização (a) e para cada meio de humedecimento (b) estudado no ensaio 5.2 para a framboesa conservada.

7.9 Artigo “Germinação *in vitro* de *Rubus idaeus* L.”

Germinação *in vitro* de *Rubus idaeus* L.

Carolina Mendes¹, Mariana Mota¹, Teresa Valdivieso²

¹LEAF, ISA, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa;

²INIAV, I.P., Av. da República, Nova-Oeiras, 2784-505 Oeiras.

Resumo

A Framboesa (*Rubus idaeus* L.) apresenta um elevado valor comercial no setor dos pequenos frutos. Com o objetivo de obter uma variedade portuguesa bem adaptada às nossas condições de cultura, está a decorrer no INIAV um programa de melhoramento nesta espécie. Este programa necessita do desenvolvimento de metodologias e técnicas eficazes que garantam elevadas taxas de germinação de sementes. As germinações realizadas neste programa têm recorrido à escarificação química e estratificação em sementes secas conservadas a 4°C. Contudo, o sucesso desta metodologia tem sido reduzido, com taxas de germinação médias de cerca de 15%. Na perspetiva de se obterem taxas mais elevadas de germinação decidiu-se explorar uma nova abordagem - a germinação *in vitro* com recurso a escarificação mecânica através de corte na semente. Este trabalho é, assim, uma primeira abordagem para determinar diferentes métodos de desinfeção, meios de cultura e condições culturais, de modo obter a melhor combinação de tratamentos para maximizar as taxas de germinação.

Nestes ensaios de germinação *in vitro*, utilizaram-se sementes de framboesa secas conservadas em frio (4°C), recorrendo a protocolos de desinfeção com e sem etanol, antibiótico ou fungicida. Após desinfeção as sementes foram colocadas num filme líquido onde foi realizado um corte com bisturi do endocarpo no polo cotiledonar da semente, para facilitar a imbibição e a germinação. Seguidamente, as sementes foram colocadas em meio QL suplementado com GA₃ (0,1 mg/L) e, quando germinaram, foram transferidas para MS suplementado com BAP (0,5 mg/L), permanecendo as placas a 20-22°C. As primeiras sementes germinaram após 4 dias no meio QL. Relativamente aos métodos de desinfeção, o método que envolve a passagem por etanol a 70% aumentou o tempo de germinação, i.e., as sementes germinaram apenas ao 7º dia e tem uma taxa menor (inferior a 30%), no entanto as contaminações diminuíram consideravelmente em relação à ausência de etanol; o método não envolvendo etanol permitiu taxas de germinação que oscilam entre os 40-60%.

Palavras-Chave: framboesa, semente, desinfeção, cultura de tecidos, plântula.

Abstract

In vitro germination of *Rubus idaeus* L.

The raspberry (*Rubus idaeus* L.) has a high commercial value in the small fruits market. In order to obtain a Portuguese variety that is well adapted to our growing conditions, a breeding program for this species is underway at INIAV. This program requires the development of efficient methodologies and techniques that guarantee high rates of seed germination. The germinations carried out in this program have used chemical scarification and stratification in

dry seeds kept at 4°C. However, the success of this methodology has been limited, with average germination rates of about 15%. In order to obtain higher germination rates it was decided to explore a new approach - *in vitro* germination using mechanical scarification by cutting the seed. Therefore, this work is the first approach to determine different disinfection methods, culture media and cultural conditions, in order to obtain the best combination of treatments to maximize germination rates.

In these *in vitro* germination trials, we used dry raspberry seeds preserved in cold (4°C), using disinfection protocols with and without ethanol, antibiotic or fungicide. After disinfection, the seeds were placed in a liquid film where the endocarp was cut with a scalpel at the cotyledonary pole of the seed to facilitate imbibition and germination. Next, the seeds were placed in QL medium supplemented with GA₃ (0.1 mg/L) and, when they germinated, they were transferred to MS supplemented with BAP (0.5 mg/L), and the plates were kept at 20-22°C. The first seeds germinated after 4 days on the QL medium. Regarding the disinfection methods, the method involving passage through 70% ethanol increased the germination time, i.e., the seeds germinated only at day 7 and has a lower rate (less than 30%), however the contaminations decreased considerably compared to the absence of ethanol; the method not involving ethanol allowed germination rates between 40-60%.

Keywords: raspberry, seed, disinfection, tissue culture, seedling.

Introdução

A espécie *Rubus idaeus* (L.), vulgarmente designada por framboesa vermelha, é uma espécie inserida na família *Rosaceae*, na ordem *Rosales*, no género *Rubus* e subgénero *Idaeobatus*, que engloba cerca de 200 espécies, sendo a mais comum, no continente europeu, a *Rubus idaeus* (L.) (Funt & Hall, 2013).

Esta espécie encontra-se dispersa um pouco por todo mundo, no entanto a sua distribuição está mais centrada na Europa, Ásia e América do Norte. Atualmente, Portugal é um dos países emergentes na produção deste pequeno fruto, sendo a sua produção destinada sobretudo para o mercado externo (Funt & Hall, 2013; J. Graham & Woodhead, 2011; Oliveira & Fonseca, 2007).

Ao longo das décadas, o grupo dos pequenos frutos tem vindo a despertar um elevado interesse agronómico resultante da sua expansão no mercado, isto deve-se a diversos fatores como o aumento da sua disponibilidade para o mercado em fresco por períodos mais extensos, o melhoramento da qualidade dos frutos, bem como a perceção por parte do consumidor dos benefícios que estes têm na saúde (Barney et al., 2007; J. Graham & Brennan, 2018). Sendo a framboesa a espécie mais cultivada entre os pequenos frutos e tendo um elevado valor comercial neste setor, têm vindo a ser desenvolvidos diversos estudos de melhoramento da mesma, selecionando populações com características desejáveis para o consumidor (Oliveira et al., 2007; Santos et al., 2014).

Em Portugal, estes estudos de melhoramento destas espécies têm sido dirigidos pelo INIAV, principalmente através do seu programa de melhoramento em framboesa, tendo a germinação de sementes de framboesa, resultantes de polinizações controladas, um papel fundamental. Este programa envolve o cruzamento de vários genótipos bem como a colheita e germinação das sementes resultantes, seguindo-se a análise e seleção dessas descendências, dependendo o seu sucesso de um bom protocolo de germinação de sementes (Oliveira et al., 2007).

A metodologia tradicional de escarificação e estratificação, baseada na germinação *in vivo*, não atinge as taxas de germinação pretendidas no programa, atingindo um máximo de 40% nos ensaios para a escarificação e um máximo de 50% nos de estratificação realizados por Contreras et al. (2016). Por outro lado, nos ensaios de escarificação realizados por Wada & Reed (2011) para diferentes variedades de *Rubus* foram obtidas taxas de germinação mais elevadas, na ordem dos 70%, enquanto os ensaios realizados por Clark & Moore (1993) obtiveram taxas

muito inferiores para a framboesa, com um máximo de 22% e certas variedades sem germinação. Também Peacock & Hummer (1996) testaram diferentes métodos de escarificação e estratificação em duas variedades de *Rubus*, tendo obtido, na generalidade, sementes sem germinação ou com taxas na ordem dos 20-50%. É por isso necessária uma nova abordagem na germinação de sementes de modo a obter uma metodologia cujos resultados apresentem taxas mais elevadas e, para isto, há que explorar diferentes métodos experimentais.

De acordo com Mian et al. (1995), Lim & Knight (2000), Martínez Cruz et al. (2013) e Ismaini et al. (2017), a metodologia de germinação *in vitro* apresentou já resultados positivos com sementes do género *Rubus*, pelo que se apresenta como uma metodologia interessante no contexto do problema apresentado.

Assim, neste estudo, a metodologia da germinação *in vitro* será avaliada de modo a determinar se será, ou não, o método experimental a realizar no programa de melhoramento no futuro. Com o objetivo de maximizar as taxas de germinação de sementes de framboesa, serão testadas diferentes abordagens desta metodologia, através da testagem da alteração de diversos fatores como os pré-tratamentos, o meio de cultura e as condições culturais, de modo a obter o melhor protocolo.

Material e Métodos

Neste ensaio são testadas 4 vertentes associadas ao processo de germinação de modo a determinar qual a combinação mais eficaz das mesmas:

1. Estado de conservação da semente, onde se testam sementes conservadas a frio e sementes frescas;
2. Método de desinfeção das sementes, existindo, inicialmente, três em estudo (D1, D2 e D3, descritos mais adiante);
3. Meio de cultura em estudo, serão testados dois meios de germinação diferentes – meio Murashige & Miller (1976) e meio Quoirin & Lepoivre (1977);
4. Condições culturais, onde serão testadas diferentes condições de temperatura e luz.

Tendo em conta os fatores a testar, iniciou-se o ensaio 1, onde são avaliadas as sementes conservadas, cedidas pelo programa de melhoramento de framboesa do INIAV, sendo estas autopolinizadas da variedade Polka de frutos colhidos em outubro de 2020 e, posteriormente, conservadas a frio, numa câmara frigorífica, a 4°C.

Sendo que estes ensaios irão decorrer durante alguns meses, apenas é abordada a parte inicial dos mesmos. Assim, apesar de um dos fatores em estudo ser o meio de cultura para germinação de modo a determinar qual dos mesmos apresenta maior sucesso no objetivo pretendido, será testado apenas o meio de cultura de Quoirin & Lepoivre (1977) suplementado com GA₃ (0,1 mg/L).

Antes de ser colocado no meio de cultura para germinação, o material vegetal foi previamente preparado. As sementes foram hidratadas durante 24 horas e posteriormente desinfetadas.

O objetivo inicial deste estudo foi determinar qual o melhor método de desinfeção para o protocolo de germinação. Com o intuito de mitigar as contaminações, quer das sementes quer do meio, para que estas não reduzam a viabilidade das plântulas, foram testados, inicialmente, dois métodos de desinfeção adaptados de bibliografia, descritos abaixo:

- Desinfeção segundo Mian et al. (1995), consiste em desinfetar as sementes em solução de desinfeção (composição detalhada adiante), agitando por 10 minutos e, de seguida, proceder à lavagem das sementes em água esterilizada, por 4 vezes, agitando durante 2 minutos cada.
- Desinfeção segundo Ismaini et al. (2017), cujo procedimento consiste em lavar as sementes em água esterilizada, por 2 vezes, agitando durante 5 minutos cada. Passar as sementes por solução de etanol 70%, por um minuto agitando. Proceder à lavagem das mesmas com água esterilizada, agitando por 2 minutos. Colocar duas vezes as sementes

em solução de desinfecção, a agitar, por 10 minutos cada. Por fim, efetuar a lavagem das sementes em água esterilizada por 3 vezes, agitando durante 5 minutos cada.

Primeiramente, efetuou-se a preparação da solução de desinfecção, que consiste em 20% de lixívia comercial, 80% água esterilizada e 0,1% de Triton X-100, um surfactante que tem como função aumentar a adesividade. Preparada a solução, seguiram-se os passos do método de desinfecção em utilização.

De maneira a complementar a desinfecção superficial, foi também testada a ação de um antibiótico – canamicina a 10 µg/ml – tendo sido desenvolvidos e testados três tratamentos possíveis de desinfecção:

D1 – método de desinfecção de Mian et.al e aplicação de antibiótico;

D2 - método de desinfecção de Mian et.al;

D3 - método de desinfecção de Ismaini et.al.

Após desinfecção superficial da semente conservada foi realizado um corte transversal ao eixo embrionário, na extremidade cotiledonar da semente sem atingir os cotilédones (Figura 1). Este corte removeu o endocarpo, quebrando assim a barreira física da semente facilitando a sua imbibição e, conseqüentemente, a sua germinação. O corte foi realizado na câmara de fluxo laminar, com o auxílio de uma lupa e com as sementes colocadas em filme líquido – água destilada esterilizada.

Concluída a preparação da semente, procede-se à colocação da mesma no meio de cultura para germinação. Este procedimento foi feito na câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram dispostas em placa de Petri, previamente preparada com o meio de cultura, com o auxílio de uma pinça, sendo colocadas 20-30 sementes por placa consoante o espaço deixado entre as mesmas. Finalizada a placa, selou-se com parafilme, identificando-a para monitorização do ensaio. As placas de Petri foram colocadas a temperatura entre 20 e 22°C e luminosidade natural. Cada placa foi monitorizada semanalmente, sendo efetuados os registos relativos às sementes germinadas bem como possíveis contaminações nas placas.

Nos casos em que ocorreu germinação, procedeu-se à repicagem das sementes germinadas, para meio Murashige & Skoog (1962) suplementado com BAP (0,5 mg/L), que passam assim para a fase de aclimatização. A utilização do meio de Murashige & Skoog (1962) com a suplementação de BAP tem como base os estudos realizados por Erig et al. (2002), que mostraram que este regulador de crescimento promove o aumento da taxa de multiplicação de *Rubus idaeus*.

Resultados e Discussão

Tendo em consideração o facto de estes serem ensaios preliminares direcionados para a obtenção do melhor método de desinfecção para o protocolo de germinação *in vitro* a utilizar nos restantes ensaios, não existem alterações nos fatores: meio de cultura testado e condições culturais. Deste modo, foram apenas avaliadas as taxas de germinação resultantes de diferentes métodos de desinfecção bem como as contaminações existentes nas sementes em ensaio.

Primeiramente, é de referir que os ensaios de germinação *in vitro* realizados foram iniciados dia 27 de abril de 2021, tendo sido preparadas placas nos dias 27 e 29 de abril e no dia 3 de maio, consoante o método de desinfecção. Todas as placas foram monitorizadas sob as mesmas condições culturais até ao dia 13 de maio, data da última observação. Na totalidade, foram testadas cerca de 200 sementes de framboesa conservada, tendo sido submetidas ao método de desinfecção D1 aproximadamente 90 sementes, ao método de desinfecção D2 aproximadamente 50 sementes e ao método de desinfecção D3, 50 sementes.

Relativamente às taxas de germinação obtidas, representadas na Figura 2 estas oscilam entre os 20% e os 60%, sendo que as taxas mais baixas correspondem ao método D3 enquanto as taxas mais elevadas são obtidas com o método D1.

Para os métodos D1 e D2, as primeiras germinações observadas nas placas de Petri, ocorreram ao 4º dia em ensaio, tendo o primeiro método um maior número de sementes germinadas. No entanto, no método D3 as primeiras germinações ocorreram ao 7º dia, tendo estas sido verificadas numa só placa em ensaio e apresentando um número reduzido de sementes germinadas; este resultado pode explicar-se pelo uso de etanol neste método de desinfeção que poderá atrasar o processo de germinação. Com os resultados obtidos até à data, podemos verificar que o método de desinfeção D3, que envolve a passagem por etanol a 70%, apresentou piores resultados a nível das taxas de germinação, sendo estas inferiores a 30%, e ocorreu um aumento do tempo de germinação relativamente aos restantes métodos. No entanto, as contaminações diminuíram consideravelmente com este método, sugerindo a oportunidade de o manter nos ensaios, alterando possíveis fatores no mesmo de modo a aumentar as taxas de germinação finais.

Os resultados obtidos são evidenciados no Quadro 1, onde se podem observar os valores médios obtidos para cada método de desinfeção, e se confirma que o método de desinfeção D1 (desinfeção sem etanol com adição de antibiótico) apresenta resultados mais próximos dos pretendidos para as taxas de germinação (em média, 47,3%) e com um menor tempo de germinação (em média, 6 dias até à 1ª germinação, seguido pelo método D2, com taxas médias de 46% mas uma velocidade de germinação de 9,3 dias. Por fim, o método D3 apresenta os piores resultados, com uma taxa de germinação média de 23,9%.

Quanto às contaminações, estas são bastante elevadas com o método D1 e D2 (Figura 3), sendo que no último dia de ensaio registado, três das quatro placas em ensaio para o meio de desinfeção D1 foram retiradas do mesmo por contaminação. O método D3 apresentou um número de contaminações inferior aos primeiros, sem qualquer eliminação de placas, sugerindo a oportunidade de o manter nos ensaios, alterando possíveis fatores no mesmo de modo a aumentar as taxas de germinação finais. Nos ensaios a decorrer já se encontram em estudo algumas alterações a este método para as quais se aguardam resultados, sendo estas: a utilização de uma solução de corte com um antioxidante; a utilização de fungicida, quer através do espalhamento no meio de cultura, quer através da colocação de uma gota em cima de cada semente aquando a colocação das mesmas no meio; a eliminação do etanol a 70% do processo de desinfeção bem como, caso se mantenha o mesmo, o aumento na lavagem das sementes em água esterilizada para remover todos os resíduos do mesmo; a variação das concentrações de reguladores de crescimento no meio, principalmente do GA₃, regulador que mais influencia a germinação; utilização do meio de cultura sem sacarose e, possivelmente, sem agar.

Conclusões

Nos ensaios a decorrer já são visíveis melhorias nos resultados no que respeita ao sucesso da germinação *in vitro* relativamente aos métodos anteriormente testados com a germinação *in vivo*. No entanto, as taxas de germinação ainda se encontram aquém do expectável pelo que no decorrer do estudo testar-se-ão as alterações ao método de D3, que mostrou um maior potencial a nível da mitigação das contaminações, bem como outros métodos de desinfeção. Assim que o fator “método de desinfeção” ficar definido para o protocolo a seguir nos restantes ensaios, iniciar-se-á a avaliação das alterações dos outros fatores em estudo, como os meios de cultura e as condições culturais, assim como a testagem das sementes em fresco, de modo a determinar qual a melhor forma de conservação das sementes e qual a melhor combinação de tratamentos para a maximização das taxas de germinação.

Referências

Barney, D. L., Bristow, P.R., Cogger, C.G., Fitzpatrick, S.M., Hart, J.M., Kaufman, D., ... Tanigoshi, L. K. (2007). Commercial red raspberry production in the Pacific Northwest. *Pacific Northwest Extension*, 598 (October), 1-110.

- Clark, J. R. & Moore, J. N. (1993). Longevity of *rubus* seeds after long-term cold storage. *Horticultural Science*, 28(9), 929–930. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.28.9.929>.
- Contreras, E., Grez, J., & Gambardella, M. (2016). Scarification and stratification protocols for raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed germination. *Acta Horticulturae*, 1133, 153–157. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1133.23>
- Erig, A. C., De Rossi, A., & Fortes, G. R. de L. (2002). 6-Benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.). *Ciência Rural*, 32(5), 765–770. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782002000500005>
- Funt, R. C., & Hall, H. K. (2013). *Raspberries* (pp. 282). Oxfordshire, UK: CABI Publishing. <https://doi.org/10.7202/1004734ar>
- Graham, J., & Brennan, R. (2018). Introduction to the *Rubus* genus. In J. Graham & R. Brennan, *Raspberry: Breeding, challenges and advances* (pp. 1–16). New York, NY: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99031-6>
- Graham, J., & Woodhead, M. (2011). *Rubus*. In C. Kole, *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources - Temperate Fruits* (pp. 179–196). Berlin, Alemanha: Springer - Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8>
- Ismaini, L., Surya, M. I., & Destri, D. (2017). *In vitro* plant regeneration from hypocotyl of Arben (*Rubus fraxinifolius* Poir.). *Australian Journal of Crop Science*, 11(4), 474–478. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.04.359>
- Lim, Y. K., & Knight, V. H. (2000). The successful transfer of primocane fruiting expression from raspberry to *Rubus* hybrid berry. *Euphytica*, 116(3), 257–263. <https://doi.org/10.1023/A:1004052214370>
- Martínez Cruz, N., Arévalo Niño, K., Verde Star, M., Oranday Cárdenas, A., Rivas Morales, C., Treviño Neávez, J., & Morales Rubio, M. (2013). Germinación *in vitro* e inducción de callo en *Rubus adenotrichus* Schltdl. *Polibotánica*, 0(35), 99–107.
- Mian, M. A., Skirvin, R. M., Norton, M. A., & Otterbacher, A. G. (1995). Drying interferes with germination of blackberry (*Rubus* sp.) seeds *in vitro*. *HortScience*, 30(1), 124–126. <https://doi.org/10.21273/hortsci.30.1.124>
- Murashige, T., & Miller, L. R. (1976). Tissue culture propagation of tropical foliage plants. *In Vitro*, 12(12), 797–813.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Oliveira, P. B., & Fonseca, L. L. (2007). Framboesa: Tecnologias de Produção. *Divulgação Agro 556 nº3* (pp. 40).
- Oliveira, P. B., Valdiviesso, T., Esteves, A., Mota, M., & Fonseca, L. L. (2007). A planta de framboesa: Morfologia e fisiologia. *Divulgação Agro 556 nº1* (pp. 32).
- Peacock, D. N., & Hummer, K. E. (1996). Pregermination studies with liquid nitrogen and sulfuric acid on several *Rubus* species. *HortScience*, 31(2), 238–239. <https://doi.org/10.21273/hortsci.31.2.238>
- Quoirin, M., & Lepoivre, P. (1977). Improved Media for *in Vitro* Culture of *Prunus* Sp. In *Acta Horticulturae*, 78, 437–442. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1977.78.54>
- Santos, M. S., De Oliveira, C. M., Valdiviesso, T., & Oliveira, P. B. (2014). Effects of pretreatments on *Corema album* (L.) D. Don (subsp. *album*) seeds' germination. *Journal of Berry Research*, 4(4), 183–192. <https://doi.org/10.3233/JBR-140079>
- Wada, S., & Reed, B. M. (2011). Standardizing germination protocols for diverse raspberry and blackberry species. *Scientia Horticulturae*, 132, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.10.002>



Figura 1 – Corte transversal ao eixo embrionário da semente de framboesa conservada.

Quadro 1 - Taxa de germinação média e velocidade de germinação média de cada método de desinfecção testado nos ensaios com framboesa conservada.

Método de desinfecção	Taxa de germinação (%)	Velocidade de germinação (dias)
D1	47,3	6
D2	46	9,3
D3	23,9	8

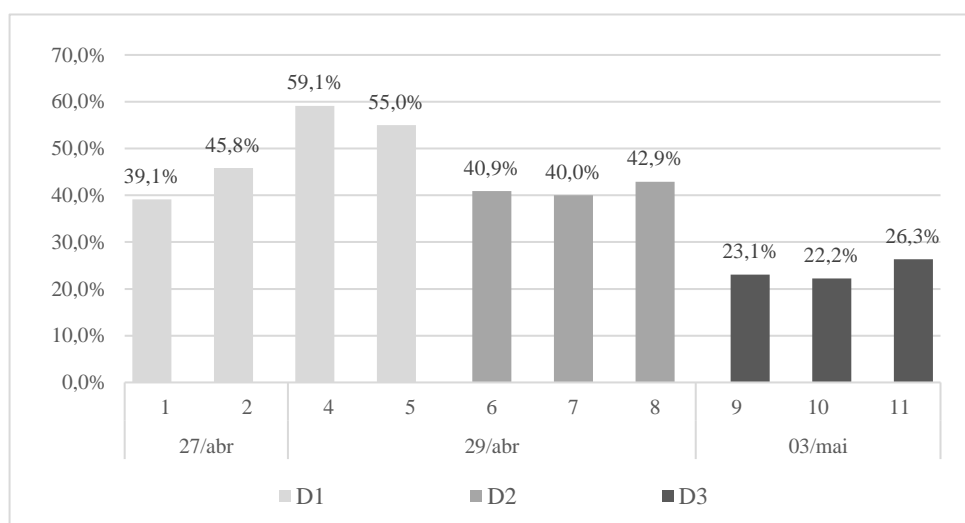


Figura 2 – Taxas de germinação para sementes, conservadas a frio, de *Rubus idaeus* sob os diferentes métodos de desinfecção em cada placa em ensaio. Os métodos de desinfecção testados incluem o método de Mian et al. Com aplicação de antibiótico (D1), o método de Mian et al. (D2) e o método de Ismaini et al. (D3).

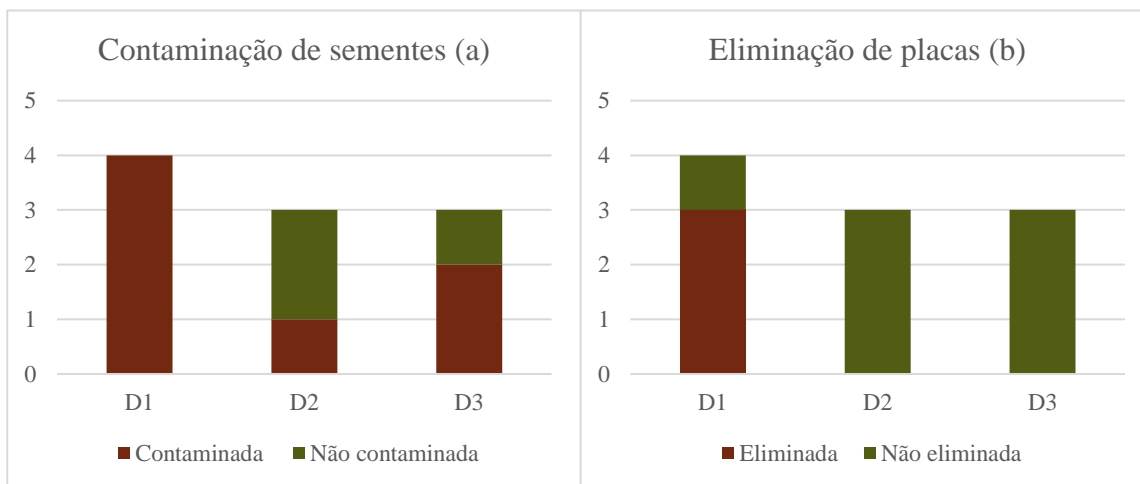


Figura 3 - Número de placas em ensaio com e sem contaminação de sementes (a) e eliminadas e não eliminadas (b) de framboesa conservada a frio.