

Bárbara Lúcia Oliveira Gomes

(Nº de aluno: 2019102062)

## Casos de estudo no Programa de Melhoramento do Medronheiro

A micorrização com *Tuber borchii* e o pomar produtor de semente



Orientador: Professora Dr.<sup>a</sup> Maria Filomena Figueiredo Nazaré Gomes (PhD em Biologia Vegetal).

Coimbra, 2022

Bárbara Lúcia Oliveira Gomes

(Nº de aluno: 2019102062)

## Casos de estudo no Programa de Melhoramento do Medronheiro

A micorrização com *Tuber borchii* e o pomar produtor de semente



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

Orientador: Professora Dr.<sup>a</sup> Maria Filomena Figueiredo Nazaré Gomes (PhD em Biologia Vegetal).

Coimbra, 2022

## Financiamento

A presente tese foi realizada no âmbito dos projetos:

- “Fitomicorrizas”, com o código de operação PDR2020-1.0.1-FEADER-031718, do Instituto Politécnico de Coimbra, cofinanciado pelo FEADER – Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural, através do Acordo de Parceria Portugal 2020, Programa PDR2020, Medida Inovação, Ação Inovação, Intervenção Grupos Operacionais;
- “RG- PCMG - Conservação e Melhoramento Genético Vegetal para o medronheiro (*Arbutus unedo* L.)”, com o código de operação PDR2020-784-042742 RG-PCMG.

A componente prática da tese foi integralmente desenvolvida no espaço do IPC – ESAC, no Centro de Estudos em Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade (CERNAS).

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional

## Resumo

Realizou-se um ensaio laboratorial no qual se avaliou a taxa de micorrização de plantulas micropropagadas de *Arbustus unedo* L. (medronheiro) com o fungo *Tuber borchii*. Testaram-se dois genótipos com o objetivo de avaliar a sua resposta face à metodologia de micorrização melhorada. Elaborou-se uma candidatura para inscrição do Pomar produtor de semente de medronheiro no Catálogo Nacional de Materiais de Base.

O objetivo do ensaio foi avaliar o efeito de 5 concentrações de dois flavonóides, quercitina e daidzeína, na micorrização de plântulas de medronheiro, em comparação com o controlo. Para tal prepararam-se recipientes de substrato para aclimatização e enraizamento *ex vitro* com as respetivas concentrações de cada flavonóide e inóculo seminal de *Tuber borchii*.

A avaliação do ensaio decorreu 3 meses após a sua instalação, onde se observaram diversas variáveis, como a taxa de sobrevivência, o enraizamento, a presença de novos rebentos, o número de raízes principais, desenvolvimento da parte aérea, presença de *callus* na base do rebento e a micorrização, bem como o seu desenvolvimento em função do clone e tratamento.

Os resultados mostraram que o desenvolvimento de micorrizas dependeu do flavonóide, apresentando valores médios superiores ao controlo quando testada a concentração de 0,25  $\mu\text{M}$ . Verificou-se que com a concentração mais elevada testada de 2,5  $\mu\text{M}$  se desenvolveram maior número de raízes principais, algumas delas muito finas e não funcionais.

As plantas micorrizadas apresentaram melhor desenvolvimento e maior comprimento do rebento e das raízes. Não foram observadas diferenças significativas em função do tipo de flavonóide testado. O estabelecimento do ensaio feito com recurso a turfa esterilizada e cobertura de perlite permitiu reduzir o tempo de estabelecimento de micorrizas e o aumento das taxas de sobrevivência e micorrização.

Palavras-chave: Daidzeína, ectomicorrizas, genótipo, micorrizas arbutóides, quercitina.

## Abstract

A laboratory test was conducted in which the rate of mycorrhization of micropropagated plants of *Arbustus unedo* L. with the fungus *Tuber borchii* was evaluated. Two genotypes were assessed to evaluate their response to the improved mycorrhization methodology. An application was prepared for the registration of the seed-producing Orchard in the National Catalog of Basic Materials.

The aim of this assay was to evaluate the effect of five concentrations of two flavonoids, quercetin and daidzein, on mycorrhization compared to the control. For this end, containers with substrate were prepared for acclimatization and *ex vitro* rooting with the respective concentrations of each flavonoid and seminal inoculum of *Tuber borchii*.

The evaluation of the test took place three months after its installation. Several variables were observed, such as survival rate, rooting, shoots growth, number of main roots, development of shoots, presence of *callus* at the base of the shoot and mycorrhization, as well as its development depending on the clone and treatment, to understand what effect the type of flavonoid and concentration had.

The results showed that the development of mycorrhizas was dependent on flavonoid, presenting mean values higher than the control when tested the concentration of 0.25  $\mu\text{M}$ . It was found that with the highest tested concentration of 2.5  $\mu\text{M}$ , a high number of main roots developed, some of them very thin and non-functional.

Mycorrhized plants showed better development and greater length of shoots and roots. No significant differences were observed depending on the type of flavonoid tested. The establishment of the test using sterilized peat and covered by the perlite layer allowed to reduce the time of establishment of mycorrhizas and increased survival and mycorrhization rates.

Key words: Arbutoid mycorrhizae, diazine ectomycorrhiza, genotype, quercetin.

# Índice

Financiamento .....	i
Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
Índice de Figuras .....	vi
Índice de Tabelas .....	vii
Índice de Anexos .....	viii
Introdução .....	1
Revisão Bibliográfica .....	2
<i>Arbutus unedo</i> L. ....	2
<i>Caracterização da espécie</i> .....	2
<i>Utilidade como espécie florestal e potencial como fruteira</i> .....	4
<i>O seu papel na conservação de ecossistemas florestais</i> .....	5
Fungos e Associações Micorrízicas .....	5
<i>Ectomicorrizas</i> .....	7
<i>Endomicorrizas</i> .....	8
<i>Ectoendomicorrizas</i> .....	8
<i>Tuber borchii</i> .....	9
Flavonóides .....	10
<i>Influência na micorrização</i> .....	11
Solos e substratos .....	11
Evolução da metodologia de micorrização de plantas micropropagadas de medronheiro .....	12
Melhoramento Florestal .....	13
Objectivos .....	15
Materiais e Métodos .....	16
Micorrização <i>ex vitro</i> .....	16
Material vegetal .....	16
Inóculo .....	16
Flavonóides .....	17
Enraizamento <i>ex vitro</i> e aclimatização .....	17

Delineamento experimental e análise de resultados.....	20
Candidatura ao CNMB.....	22
Resultados e Discussão.....	23
Taxa de sobrevivência .....	23
Avaliação da micorrização e parâmetros de crescimento vegetal.....	25
Pomar Produtor de semente.....	31
Conclusão .....	33
Bibliografia.....	34
Anexos .....	38

## Índice de Figuras

Figura 1: Medronheiro. Fonte: Flora Digital de Portugal - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2013.....	2
Figura 2: Panícula de flores de medronheiro. Fonte: Flora Digital de Portugal - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2013 .....	3
Figura 3: Medronhos em diferentes estados de maturação. Fonte: Flora Digital de Portugal - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2013 .....	3
Figura 4: Tipos de formações Micorrízicas - Endomicorrizas: a) Arbusculares, b) Ericóides, c) Micorriza das orquídeas; Ectomicorrizas: d) Desenvolvimento do manto, e) Arbutóide, f) Monotropóide Fonte: (Read, 2001) .....	6
Figura 5: Micorriza com um manto espesso de micélio na envolvente e a aparência cruciforme típica. As setas amarelas mostram os pelos curtos e uniformes (cistídios), formação de micélio típico do <i>Tuber borchii</i> . Fonte: Gomes et al., 2021 .....	9
Figura 6: Estrutura molecular geral dos flavonóides. Fonte: Simões et al., 2013 .....	10
Figura 7:Revisão esquemática da função dos flavonóides na rizosfera. Fonte: Hassan & Mathesius, 2012.....	11
Figura 8: Variação fenotípica entre árvores de povoamentos florestais. Fonte: White et al., 2007 .	13
Figura 9: Esquema de recipiente de aclimatização. a) Camada inferior composta por 100 mL de perlite; b) camada central composta por 250 mL de mistura na proporção de 1:1 de turfa esterilizada com perlite; c) camada superior com 150 mL de perlite. O volume total de substrato no recipiente é de 500 mL. ....	18
Figura 10:Medição do volume de inóculo a aplicar por tratamento aquando da preparação do substrato.....	18
Figura 11: Recipientes de aclimatização preparados e identificados.....	19
Figura 12: Clone 901 imediatamente após a instalação do ensaio com segundo as condições do tratamento Q 1,0 µM (quercitina na concentração 1 µM).....	19
Figura 13: Notação utilizada para avaliação de micorrizas. 1 – Presença de micélio; 2 – Baby branch; 3 – Micorriza, até 25 pontas e 4 – mais de 25 pontas micorrizadas. ....	21
Figura 14:Taxa de sobrevivência (%) em função da interação entre o clone (clones 101 e 901), flavonóide (C – controlo; D – Daidzeína; Q – Quercitina) e respetiva concentração testada (concentrações compreendidas entre 0,25 a 2,5 µM). ....	23
Figura 15: Contagem de raízes principais (NPR) do tratamento com daidzeína a 2,5 µM do clone 901. ....	28
Figura 16: Análise de componentes principais (PCA): análise da variância pelos fatores 1 (25,75%) e 3 (11,14%); as suas variáveis explicativas e a relação entre si. ....	31



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Registo da origem dos clones testados, bem como as respectivas designações utilizadas em laboratório e em campo. Fichas Morfológicas e Passaportes fitossanitários disponíveis no Anexo 1 .....	16
<b>Tabela 2:</b> Flavonóides utilizados no ensaio de micorrização, respetiva concentração testada e volume pipetado das soluções-mãe (10mg/10ml) para cada tratamento.....	17
<b>Tabela 3:</b> Valores médios da taxa de sobrevivência em função: do material vegetal testado, clones 101 e 901, (I); do tipo de flavonoide (II); da respetiva concentração (III) e da interação entre os fatores principais para o clone 901 (IV). São indicados os valores relativos à taxa de sobrevivência (média $\pm$ SE %). .....	23
<b>Tabela 4:</b> Valores médios do desenvolvimento de micorrizas, crescimento da parte aérea (SL), desenvolvimento radicular (Sistema radicular; LLR; NPR) e callus em função: do material vegetal testado, clones 101 e 901. São indicados os valores relativos a cada parâmetro avaliado (média $\pm$ SE ).....	27
<b>Tabela 5:</b> Valores médios do desenvolvimento de micorrizas, crescimento da parte aérea (SL), desenvolvimento radicular (Sistema radicular; LLR; NPR) e callus em função: do flavonóide testado, daidzeína (D) e quercitina (Q). São indicados os valores relativos a cada parâmetro avaliado (média $\pm$ SE). .....	27
<b>Tabela 6:</b> Valores médios do desenvolvimento de micorrizas, crescimento da parte aérea (SL), desenvolvimento radicular (Sistema radicular; LLR; NPR) e callus em função: das concentrações testadas de cada flavonóide.....	29

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1:</b> Ficha Morfológica e Passaporte fitossanitário dos clones .....	38
<b>Anexo 2:</b> Anova para a sobrevivência em função de clones. ....	39
<b>Anexo 3:</b> Avaliação do desenvolvimento de micorrizas (0-4) e outros parâmetros, comparação entre clones.....	39
<b>Anexo 4:</b> Avaliação do desenvolvimento de micorrizas (0-4) e outros parâmetros, comparação entre flavonóides. ....	40
<b>Anexo 5:</b> Avaliação do desenvolvimento de micorrizas (0-4) e outros parâmetros, comparação entre concentrações dos flavonóides. ....	41
<b>Anexo 6:</b> Valores médios do estabelecimento de micorrização, crescimento da parte aérea (SL), desenvolvimento radicular (Sistema radicular; LLR; NPR) e callus em função interação entre os diferentes fatores de teste. ....	42
<b>Anexo 7:</b> Interação entre todos os fatores: clone, flavonóide e concentração. ....	43
<b>Anexo 8:</b> <i>Análise de componentes principais.</i> ....	45
<b>Anexo 9:</b> Requerimento para inscrição no Registo Nacional de Materiais de Base .....	46
<b>Anexo 10:</b> C55_1.1_Ofício ICNF .....	47

## Introdução

O melhoramento do material vegetal é um instrumento de alto valor que pode ser executado de diversas formas. No âmbito do trabalho desenvolvido, pretendeu-se melhorar a metodologia adotada de inoculação de plantas micropropagadas de medronheiro com fungos micorrízicos, considerando os testes e os resultados anteriores, de forma a torná-la mais eficaz e eficiente

O trabalho consistiu no estabelecimento de micorrizas de plantas micropropagadas durante a fase de enraizamento *ex vitro* em simultâneo com o processo de aclimatização. Para tal, testaram-se plantas de clones de medronheiro de proveniências diferentes, enraizados nas mesmas condições e inoculados com inóculo seminal (esporos liofilizados) de *Tuber borchii*.

Foi também elaborada uma proposta para apresentação ao ICNF (Instituto da Conservação da Natureza e Florestas), da candidatura do pomar produtor de semente, instalado entre 2015 a 2021 na área da Escola Superior Agrária de Coimbra, ao Registo Nacional de Materiais de Base para a categoria de Material Florestal de Reprodução (MRF) certificado na categoria de Qualificado.

## Revisão Bibliográfica

### *Arbutus unedo* L.

O *Arbutus unedo* L., Medronheiro (Figura 1), é uma espécie nativa do mediterrâneo, na região da Europa Ocidental, Central e Meridional, nordeste da África, Ilhas Canárias e Ásia Ocidental. A sua distribuição é fortemente influenciada pelas suas características como espécie tolerante a períodos prolongados de secura e temperaturas elevadas, características do clima mediterrânico (Ribeiro et al., 2017).



Figura 1: Medronheiro. Fonte: Flora Digital de Portugal - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2013

Os fatores limitantes à sua distribuição são a maior probabilidade de ocorrência de geadas, limitante acima de 900 metros de altitude e reduzida precipitação, com um limite superior a 500 mm de precipitação anual (Bingre et al., 2007).

Pertencente à ordem *Ericales* e família *Ericaceae*, o género *Arbutus* conta com aproximadamente vinte espécies. Estas mostram tendência a ocorrer como sub-bosque dos povoamentos de espécies das famílias das fagáceas e pináceas, tais como os *Quercus* spp. e pinheiros (Gomes & Canhoto, 2009).

#### *Caracterização da espécie*

Relativamente à morfologia do medronheiro, este pode apresentar porte arbóreo ou arbustivo consoante as condições da estação, medindo de 1,5 a 3 metros em altura (macrofanerófito). Como espécie perene, não perde a folhagem no inverno, sendo esta composta por folhas simples, alternadas, geralmente serradas com tonalidades verdes claras quando jovens, escurecendo quando adultas (Elwes & Henry, 2014).

As flores típicas das ericáceas são hermafroditas em forma de campânulas, podendo a cor variar entre o branco e rosa (Figura 2).



**Figura 2: Panícula de flores de medronheiro. Fonte: Flora Digital de Portugal - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2013**

Estas estão dispostas em panículas pendentes até 30 flores, formando cachos bem preenchidos aquando da formação dos frutos (Elwes & Henry, 2014). A sua polinização é assegurada maioritariamente por espécies do género *Bombus*, tornando-se muitas das vezes a única fonte de alimento para polinizadores durante o inverno, época de floração (Rasmont et al., 2005).

O fruto (Figura 3) trata-se de uma baga, geralmente com cerca de 2 centímetros de diâmetro, cuja casca é formada por papilas cónicas que vão mudando de cor conforme o estado de maturação do fruto. Assim que este atinge uma tonalidade avermelhada no exterior e uma polpa amarela-alaranjada encontra-se no estado de maturação máxima (Elwes & Henry, 2014)



**Figura 3: Medronhos em diferentes estados de maturação. Fonte: Flora Digital de Portugal - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2013**

No que diz respeito às suas exigências edáficas, o medronheiro pode ser considerado uma espécie indiferente ou sem qualquer tipo de exigência específica, podendo vegetar

em quase todo o tipo de rocha-mãe e de solos. No entanto, tal como qualquer outra espécie têm melhor performance em solos siliciosos e frescos e de pH mais baixo (Correia et al., 2002).

Face às alterações climáticas, caracterizadas por períodos longos de seca, apresenta maior potencial de desenvolvimento em solos pouco espessos, tendo como rocha-mãe o xisto, com maior presença de argila, responsável pela maior retenção de água (Botelho da Costa, 2011).

#### *Utilidade como espécie florestal e potencial como fruteira*

A produção de aguardente a partir dos frutos fermentados tem sido a principal razão que motiva o interesse no medronheiro. O elevado valor de mercado deste tipo de destilados torna a sua produção rentável, mesmo com custos de produção elevados predominantemente associados à certificação do alambique, à colheita e/ou compra dos frutos frescos (Correia et al., 2002).

Os frutos do medronheiro podem ser também utilizados na confeção de outro tipo de produtos, tais como compotas, geleias, gomas, mel e confitados (Gomes et al., 2012). Embora haja as mais diversas aplicações para o fruto do medronheiro, estes são tendencialmente colhidos em zonas de crescimento espontâneo, em populações silvestres. Sendo «o medronheiro considerado como “Neglected or Underutilized Crop” pela Global Facilitation Unit for Underutilized» (Martins & Canhoto, 2014).

Sendo a exploração típica do medronheiro feita com recurso a indivíduos presentes em áreas naturais, pode-se afirmar que não existia, no passado, nenhum processo prévio de seleção das melhores plantas, bem como das características que as tornam boas produtoras, havendo desta forma uma grande variabilidade de plantas. Acresce que durante este período não havia capacidade de fornecer aos viveiros sementes provenientes de plantas selecionadas por região de proveniência, que pelo CENASEF quer pela DGAV, isto é, considerando a espécie como florestal ou agrícola. Assim, as plantas produzidas nos viveiros comerciais não garantem homogeneidade de produção nem a qualidade do fruto (Gomes et al., 2017).

Para fazer face à necessidade de frutos de qualidade, cresceu a tendência na instalação da cultura como fruteira, bem como o investimento no melhoramento da espécie. Passando a ser feita a seleção de plantas com as melhores características, valorizando também a sua proveniência e respetivas condições edafoclimáticas, para posterior propagação por via seminal e/ou vegetativa (Gomes et al., 2017).

Para além da versatilidade do fruto, existe também um crescente interesse pela espécie como planta ornamental em jardins, utilizando-se ainda a rama em verde para arranjos

florais. É ainda utilizada em pomares como espécie com potencial para abrigar insectos auxiliares das culturas (Correia et al., 2002).

### *O seu papel na conservação de ecossistemas florestais*

A floresta e as actividades nela desempenhadas comportam-se como um elemento estrutural do território português, bem como das actividades socioeconómicas. A sua grande influência deve-se ao facto de cerca de 70% do país ter uma ocupação com espaços florestais, do quais 36% são áreas arborizadas, enquanto o restante está ocupada por áreas de matos e pastagens (Louro, 2016).

Com uma fatia tão grande do território ocupada por espaços florestais, a preocupação com as ameaças à integridade destes espaços tem vindo a crescer. São dos mais comuns problemas na floresta portuguesa a ocorrência constante de fogos rurais, o surgimento de novas pragas e doenças associadas aos desequilíbrios nos ecossistemas provocados pela continuidade das monoculturas e fenómenos climáticos extremos, para além da proliferação de espécies invasoras (Torres et al., 2011; Bettinger et al., 2009).

Várias espécies autóctones estão a ser destacadas em campanhas de rearborização, sendo uma delas o medronheiro. As suas características tornam-no muito importante ao nível ecológico, tendo um papel fundamental na estabilização de solos, prevenindo a erosão dos mesmos, na capacidade de regeneração após incêndios e ainda no contributo para o aumento da biodiversidade dos ecossistemas florestais (Konstantinidis et al., 2006). É uma espécie que vegeta bem em solos degradados, produzindo uma camada de folhada com uma decomposição relativamente lenta, associada à inerente relação C/N (carbono/azoto) mais elevada, contribuindo para a acumulação de matéria orgânica e para a recuperação dos solos (Curado et al., 2015). Posto isto, o medronheiro consta da lista de espécies a privilegiar em processos de arborização nas várias regiões constantes dos planos de ordenamento florestal (Portaria n.º 54/2019 de 11 de fevereiro).

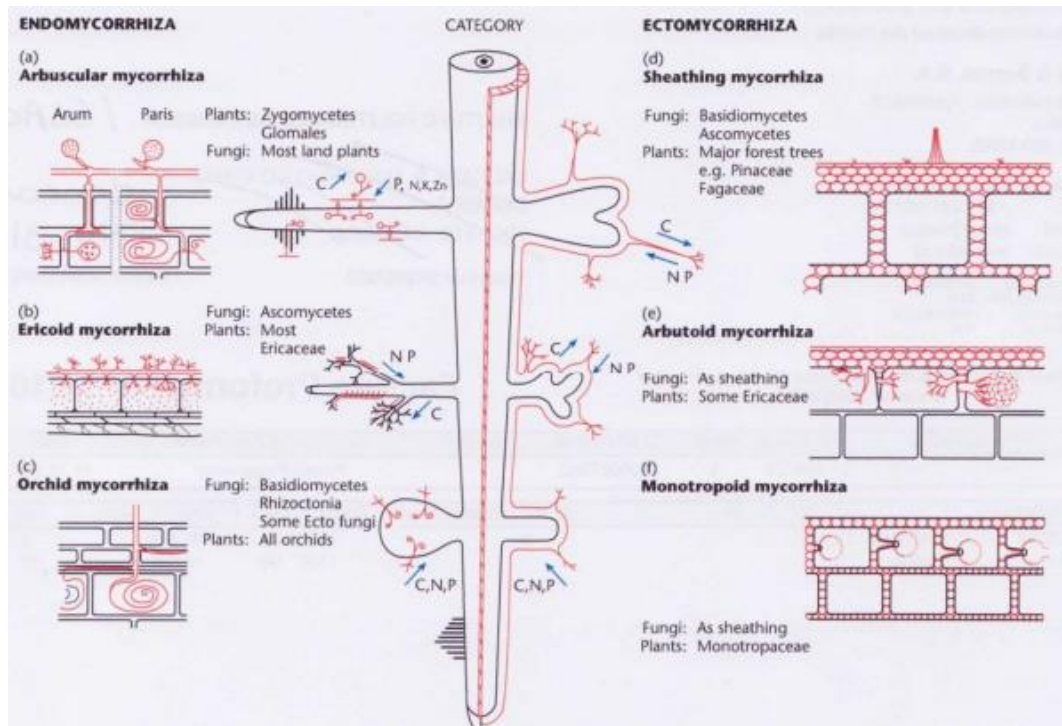
### **Fungos e Associações Micorrízicas**

A palavra “micorriza” – denominação proposta por Albert Frank em 1885 – pode ser dividida em duas outras palavras de origem grega – mico – referente aos fungos e riza referente às raízes. Atualmente o conceito de micorriza é considerada num sentido mais lato, para acomodar todas as associações entre fungos e plantas que não são estabelecidas em raízes, mas noutros órgãos de contacto especializado para a troca de nutrientes, tendo como exemplo as orquídeas e outras plantas sem raízes verdadeiras (Peris Gisbert et al., 1995).

Este tipo de associação consiste numa simbiose na qual ambas as partes contribuem para o favorecimento da outra, sendo que os fungos obtêm produtos orgânicos

originados na fotossíntese, enquanto a planta consegue uma fonte de nutrientes minerais e água, essenciais à sua atividade biológica (Nicolás et al., 2015).

A micorriza pode assumir diferente aspeto em termos morfológicos e estruturais dependentes do local da raiz onde se dá a associação (Figura 4), havendo a formação de ectomicorrizas (ecto remete para externo), endomicorrizas (endo remete para interno) e arbutóides (Martins, 1997).



**Figura 4: Tipos de formações Micorrízicas - Endomicorrizas: a) Arbusculares, b) Ericóides, c) Micorriza das orquídeas; Ectomicorrizas: d) Desenvolvimento do manto, e) Arbutóide, f) Monotropóide Fonte: (Read, 2001)**

O estabelecimento de micorrizas é uma forma de se proporcionar uma situação cujas condições sejam mais apelativas para o desenvolvimento de plantas, em particular, face às alterações climáticas globais, sendo que um dos maiores benefícios será o aumento da área de absorção de nutrientes e água. A presença de fungos micorrízicos associados ao sistema radicular pode ainda auxiliar na proteção do mesmo de infeções por parte de outros agentes patogénicos (Martins, 1997).

Os fungos micorrízicos representam uma componente importante relativamente aos sistemas agrícolas e florestais, uma vez que têm parte na promoção do crescimento das plantas e antecipação da idade de floração e frutificação, por via do aumento do volume do solo explorado pelo micélio e conseqüentemente pela assimilação de nutrientes e água. Aumentam também a disponibilidade de azoto para as plantas, através da



absorção de azoto na forma orgânica, em particular fungos ectomicorrízicos (Peterson & Massicotte, 2004).

Contribuem ainda para o aumento de tolerância a condições de stresse abiótico, como o stresse hídrico, solos degradados e presença de metais pesados no solo. Para além da tolerância a fatores abióticos, também contribuem para o aumento da tolerância a condições de stresse biótico, proporcionando um efeito competitivo com agentes patogénicos como pragas e doenças (Smith & Read, 1997).

Relativamente ao impacto que os fungos micorrízicos têm sobre os solos, estes permitem a melhor agregação dos solos com a produção da glomalina, contribuindo para a estabilidade dos agregados argilo-húmicos e consequentemente para a recuperação de solos degradados. Os fungos micorrízicos podem ainda induzir a formação de raízes ramificadas pela libertação de auxinas ou outros reguladores de crescimento, levando ao aumento do grau de colonização do solo (Wu et al., 2004).

#### *Ectomicorrizas*

As ectomicorrizas apresentam um micélio exterior (manto) que envolve as raízes (Figura 4, d) e hifas que se desenvolvem, normalmente nas zonas mais intersticiais entre as células corticais da raiz, formando uma rede de Hartig entre as células e estendendo-se pelo solo. As raízes infetadas, normalmente não apresentam pelos radiculares (Martins, 1997).

As plantas que são capazes de formar ectomicorrizas (maioria das espécies florestais, Figura 4, d), geralmente, possuem três tipos de raízes, as que irão estabelecer o potencial micorrízico do sistema radicular (raízes secundárias finas e curtas), as raízes finas compridas que têm a função de absorção de água e nutrientes e as lenhosas que terão uma função de suporte.

Quando se têm a presença de raízes com maior potencial de crescimento (raízes primárias lenhosas) e raízes de crescimento mais limitado (raízes secundárias finas), estamos perante um sistema radicular de ramificações laterais cujo crescimento é limitado, verificando-se a possibilidade de todos os ápices radiculares poderem estar infetados, havendo um potencial micorrízico elevado para todo o sistema radicular. Já para sistemas radiculares de raízes longas pode ser considerada a ocorrência de micorrizas algo excecional (Martins, 1997).

### *Endomicorrizas*

Relativamente às endomicorrizas, verifica-se que a sua ocorrência é um fenómeno mais comum (Figura 4, a) e sem haver grande especificidade em relação às espécies, podendo os fungos associarem-se a mais de 80% das espécies vegetais (Louredo, 2018).

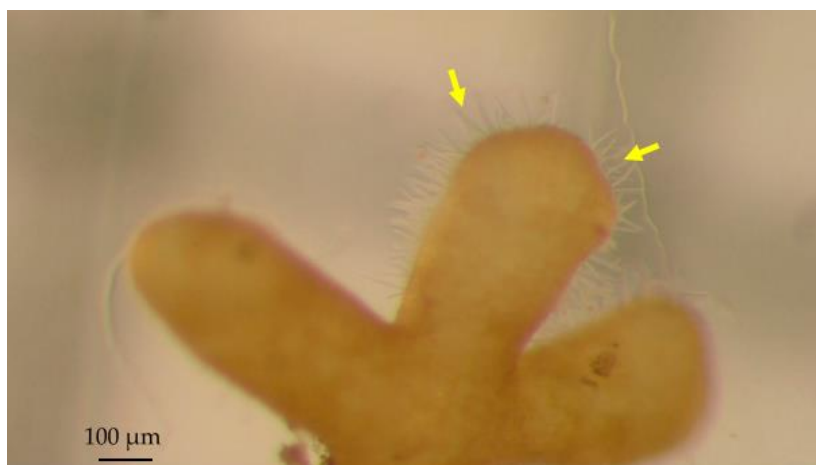
As micorrizas requerem desenvolvimento quase simultâneo das raízes e do micélio, uma vez que as hifas de fungos apenas colonizam raízes jovens, com excepção das orquídeas nas quais o fungo pode infetar as células estaminais. A planta controla o desenvolvimento da simbiose através do crescimento radicular (Peris Gisbert et al., 1995).

No que diz respeito às hifas formadas na presença de endomicorrizas, verifica-se que estas penetram as células corticais das raízes, apresentando penas estruturas extremamente ramificadas, as vesículas arbusculares (Figura 4, a), sendo que neste caso não se verifica a formação de um manto externo como nas ectomicorrizas (Louredo, 2018).

### *Ectoendomicorrizas*

As ectoendomicorrizas obtiveram este nome por partilharem características com os outros grupos de micorrizas. Neste caso há formação de um manto exterior como se vê nas ectomicorrizas, mas também ocorre a penetração das hifas na primeira camada de células da raiz da planta (Peterson & Massicotte, 2004). Um exemplo particular deste tipo de micorrizas é a arbutóide (Figura 4, e).

As arbutóides são caracterizadas pela formação de um manto e uma rede de Hartig bem desenvolvida (Figura 5) e um grande desenvolvimento das hifas ao nível intercelular (Figura 4, e). As micorrizas arbutóides caracterizam-se ainda pela penetração do fungo na primeira camada das células corticais da raiz, sem a formação de arbúsculos como se pode observar na Figura 4, e (Machado et al., 2017).



**Figura 5: Micorriza com um manto espesso de micélio na envolvente e a aparência cruciforme típica. As setas amarelas mostram os pelos curtos e uniformes (cistídios), formação de micélio típico do *Tuber borchii*. Fonte: Gomes et al., 2021**

Este tipo de micorriza ocorre naturalmente em espécies como o medronheiro, tendo como nome arbutóide. Tal como acontece para o género *Arbutus* também se regista ocorrência deste tipo de micorrizas noutras espécies da família das Ericáceas como no género *Rhododendron* e género *Vaccinium* (Lancellotti et al., 2014).

Grande parte dos fungos que formam micorrizas do tipo arbutóide são basidiomicetes, no entanto alguns fungos ascomicetes (por exemplo, *Tuber* sp.) demonstraram ser capazes de formar micorrizas (Lancellotti et al., 2014).

#### *Tuber borchii*

As trufas são os corpos frutíferos de um grupo díspar de fungos da ordem *Pezizales* que desenvolveram um hábito associativo, vivendo, em condições normais, no âmbito de uma relação micorrízica com as raízes de árvores e arbustos com potencial ectomicorrízico. Existe um pequeno grupo de espécies classificadas como trufas verdadeiras do ponto de vista comercial, sendo as mais valiosas o *Tuber magnatum* Pico, o *Tuber melanosporum* Vittad., o *Tuber aestivum* Vittad., e o *Tuber borchii* Vittad. (Iotti et al., 2016).

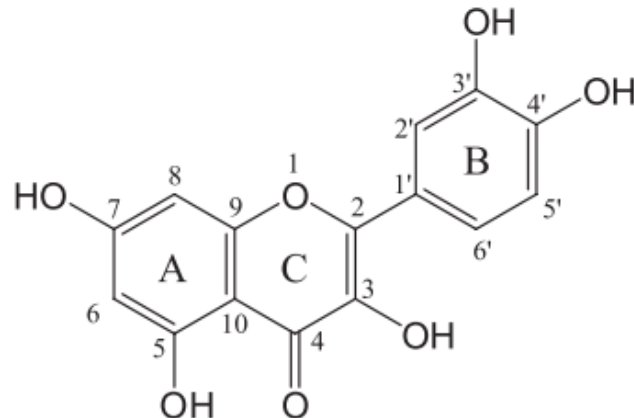
Estas espécies surgem naturalmente na Europa, tendo o seu cultivo sido inseridos noutros países fora do continente europeu, tais como na Argentina, Austrália, Chile, China, Nova Zelândia, América do Norte, África do Sul, bem como em países europeus onde não havia tradição de cultivo de trufas (Iotti et al., 2016).

O *Tuber borchii* Vittad., vulgarmente conhecido como trufa *Bianchetto*, tem uma ampla distribuição na Europa, sendo encontrado do sul da Finlândia para a Sicília e da Irlanda para a Hungria e Polónia. Dada a sua adaptabilidade a uma ampla gama de condições ambientais é considerada a espécie de *Tuber* com maior extensão a nível ecológico,

podendo ser alvo de estabelecimento de produções em áreas menos favoráveis ao desenvolvimento do género *Tuber* (Lancellotti et al., 2014).

### Flavonóides

Os flavonóides são compostos orgânicos de baixa massa molar, possuindo uma estrutura molecular base constituída por dois anéis aromáticos (A e B da Figura 6), cuja ligação é feita através de um anel pirano (C da Figura 6).



**Figura 6: Estrutura molecular geral dos flavonóides. Fonte: Simões et al., 2013**

Fazendo parte do grupo fenólico mais comum no mundo vegetal, os flavonóides apresentam uma ampla gama de reações bioquímicas, tais como o sequestro de radicais livres, neutralização de espécies reativas de oxigénio, bem como formação de elos de ligação para iões metálicos, entre outras (Simões et al., 2013).

Os flavonóides encontrados nas plantas (Figura 7) podem aparecer em quantidades variáveis em função das condições do solo e da respectivas atividades bioquímica e biológica. Geralmente, estes compostos podem ser encontrados em toda planta e acumulam-se nas regiões onde existe maior atividade, como por exemplo, nas folhas e raízes (Kaçar, 2008).

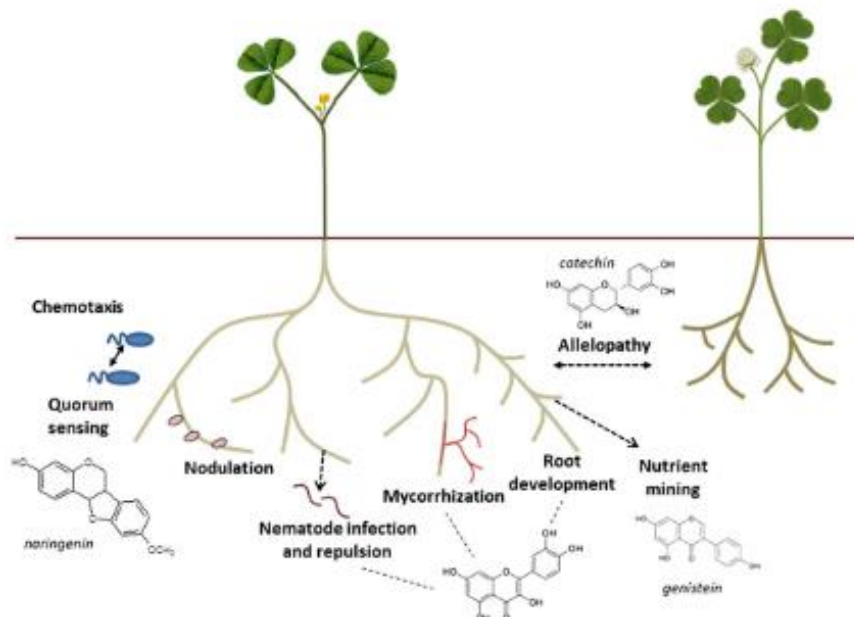


Figura 7: Revisão esquemática da função dos flavonóides na rizosfera. Fonte: Hassan & Mathesius, 2012

### Influência na micorrização

Diversos estudos sugerem a relevância dos flavonóides na micorrização, em particular no estabelecimento de micorrizas arbusculares (Hassan & Mathesius, 2012). Vários estudos levam a querer que apenas uma pequena parte dos flavonóides terá algum efeito no processo da instalação do fungo no hospedeiro (Antunes et al., 2006).

Estudos aplicados à soja e culturas semelhantes mostram que flavonóides como Coumestrol e Daidzeína têm demonstrado um comportamento estimulante quando da colonização das raízes por fungos micorrízicos. Para além do estímulo à colonização das raízes, a produção primária de flavonóides pela planta traduz-se num estímulo da germinação de esporos de fungos micorrízicos e do aumento na ramificação das hifas dos mesmos (Antunes et al., 2006).

Espécies como o medronheiro que apresentam elevadas quantidades de fenóis (possível avaliação através de uma análise à folhada), também possuem a capacidade de produção de flavonóides e outros constituintes fenólicos, incluindo quercitina, isoquercitina e rutina, cuja deteção pode ser feita por cromatografia TLC (*thin-layer chromatography*) (Kaçar, 2008).

### Solos e substratos

Existem numerosos fatores abióticos e bióticos que podem afetar estruturalmente o funcionamento das comunidades microbianas presentes no solo. Os grandes fatores de influência responsáveis por estes efeitos passam pela localização geográfica, nomeadamente a zona climática, o tipo de ecossistema inserido nessa determinada

zona climática, as propriedades físico-químicas do solo, bem como o tipo de espécies vegetais ali presentes (Rožek et al., 2020).

As variações na distribuição e abundância de espécies do estrato arbóreo irão afetar diretamente o ciclo de nutrientes, bem como a acidez dos solos. Consequentemente, as variações ao nível das propriedades do solo afetaram a complexidade do coberto florestal, podendo haver mais ou menos estratos (coberto, subcoberto, estrato florístico) no ecossistema florestal (Rožek et al., 2020).

Estudos sugerem que o pH do solo pode exercer uma forte influência no crescimento e reprodução de fungos micorrízicos. Embora este efeito seja bem conhecido pelas espécies de trufas produzidas comercialmente, a influência do pH também tem sido observada a nível comunitário no solo e nas raízes os fungos da ordem *Pezizales* muitas vezes se tornam mais frequentes, abundantes e diversos à medida que o pH do solo aumenta. Um efeito óbvio do aumento do pH do solo é o aumento acentuado da abundância relativa e frequência de espécies do género *Tuber* (Ge et al., 2017).

Embora haja a correlação entre o valor de pH mais elevado do solo e uma maior proliferação de espécies ectomicorrízicas, é de notar que outros nutrientes minerais, tais como o fósforo, potássio, cálcio, magnésio, entre outros também têm influência no processo, estando correlacionados com o valor de pH e com as comunidades de fungos (Ge et al., 2017).

### **Evolução da metodologia de micorrização de plantas micropropagadas de medronheiro**

Resultados dos ensaios anteriormente estabelecidos na ESAC (Escola Superior Agrária de Coimbra) mostraram diversas vezes que a taxa de estabelecimento e desenvolvimento de micorrizas dependia do genótipo. Para além disso também se verificou que a adição de flavonóides à suspensão de esporos permitiu melhorar a taxa de estabelecimento e desenvolvimento de micorrizas.

Ao longo do período do projecto “Fitomicorrizas” foram realizados inúmeros ensaios no âmbito de estágios curriculares, tendo todos os ensaios mostrado a ocorrência de um efeito tóxico para a planta quando aplicadas concentrações superiores a 7µM (Gomes et al., 2021).

A presença de matéria orgânica no substrato mostrou ser relevante para o desenvolvimento do fungo micorrízico e estabelecimento da micorriza, no entanto a sua utilização também mostrou ser favorável ao desenvolvimento de fungos patogénicos, observando-se reduzidas taxas de sobrevivência (Gomes et al., 2021).

O recurso à perlite como substrato foi eficaz para o controlo de fungos patogénicos, no entanto o período de desenvolvimento da micorriza era muito longo, até cerca de 6 meses. Assim sendo, a utilização de meio de cultura KNOP (Nétien & Gautheret, 1960), composto por diversos nutrientes, mostrou ser também favorável ao estabelecimento das micorrizas e ao desenvolvimento das plantas.

### Melhoramento Florestal

O melhoramento florestal tem como finalidade obter plantas de qualidade. Para a construção de um programa de melhoramento de plantas é necessário esquematizar quais os problemas que existem para a espécie alvo de melhoramento e quais os problemas que a afetam nas regiões em que se insere.

Posto isto a etapa seguinte é definir qual ou quais os objectivos do programa de melhoramento. Os objectivos do melhoramento passam por decidir quais as características que devem ser alvo de melhoramento em função do problema esquematizado. Estas podem incluir desde a produção de madeira/volume, a qualidade do fuste, se ocorre boa desramação, densidade da madeira desejável em função do produto final e tolerância a condições de stress ambiental (Figura 8).

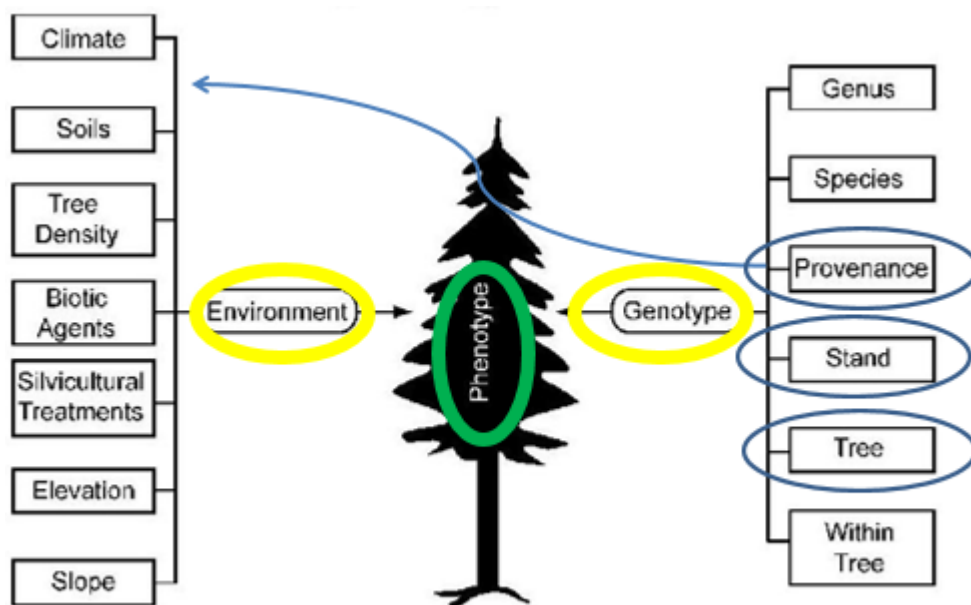


Figura 8: Variação fenotípica entre árvores de povoamentos florestais. Fonte: White et al., 2007

Algumas espécies florestais podem ter aplicações mais relacionadas com as atividades agroflorestais tais como o castanheiro, por exemplo. Assim sendo encontram-se outros tipos de objectivos mais comuns em plantas agrícolas, tais como, o aumento da produtividade, o desenvolvimento de culturas adaptadas a uma região geográfica, a resistência a doenças ou culturas com melhor qualidade e valor nutricional.

Assim, podem ser estabelecidas diferentes intensidades de melhoramento, sendo a menor intensidade caracterizada tipicamente pela identificação nas diferentes áreas naturais ou regiões de proveniência (caracterização edafoclimáticas), dos melhores povoamentos e seleção posterior das árvores superiores. A intensidade menor de melhoramento passa pela colheita de semente nessas árvores superiores para diferentes regiões de proveniência, destinando-se à produção de plantas e ao estabelecimento de uma população de produção (White et al., 2007).

No caso de intensidades superiores de melhoramento, este, a longo prazo, pode ser visto como ciclos que envolvem, processos de seleção, cruzamentos, estabelecimento de ensaios e posterior avaliação dos génotipos que vão constituir a população de melhoramento do ciclo seguinte. No ciclo de melhoramento seguinte os cruzamentos serão estabelecidos entre os indivíduos que constituem a população de melhoramento (White et al., 2007).

Existem três formas de propagação de plantas provenientes do ciclo de melhoramento através de propagação seminal com sementes provenientes de pomares produtores de semente e propagação vegetativa por macropropagação/estacaria e micropropagação, que no conjunto constituem a população de propagação. Esta por sua vez permite a instalação de povoamentos, que de acordo com um conjunto de práticas culturais permitem a produção bens e serviços, denominando estes povoamentos como a população de produção (White et al., 2007).

#### *Catálogo Nacional de Materiais de Base*

O Catálogo Nacional de Materiais de Base (CNMB) consiste na listagem ao nível nacional dos materiais de base florestal aprovados nos termos do Decreto-Lei n.º 205/2003, de 12 de setembro, posteriormente revogado pelo Decreto-Lei n.º 13/2019, de 21 de janeiro, os quais são destinados à produção de Materiais Florestais de Reprodução (MFR: sementes, plantas e propágulos).

Para as espécies florestais, ao nível europeu e em Portugal, há um conjunto de espécies de certificação obrigatória. Para esse conjunto de espécies é obrigatório identificar as diferentes regiões de proveniência de forma a garantir que as sementes e plantas produzidas estejam bem adaptadas ao local onde vão ser instaladas.

O CNMB é um instrumento criado com o objectivo de facultar informação acerca dos materiais de base florestal presentes no Registo Nacional de Materiais de Base, facilitando a sua procura por diferentes tipos de materiais de base. A informação constante em cada registo permite obter a sua localização recorrendo ao código do registo, ao nome científico e/ou ao nome vulgar da espécie ou à região administrativa do território (NUTS II).



Deste modo, o Catálogo Nacional de Materiais de Base identifica para as diferentes espécies de certificação obrigatória, as regiões de proveniência, os povoamentos selecionados e as árvores superiores para colheita de semente.

Ao nível nacional para a venda de plantas de registo obrigatório é mandatário a sua certificação, a identificação e o registo da compra da semente utilizada. O objectivo desta obrigatoriedade é garantir que as plantas por nível crescente de certificação, cumpram com os seguintes objectivos:

- 1) MFR de fonte identificada: adaptação à região de proveniência a que se destinam;
- 2) MFR selecionado: proveniente de árvores superiores selecionadas em povoamentos ou áreas naturais que cumprem as características mínimas para serem selecionadas (garantia de diversidade genética, ausência de progenitores com piores características; ausência de manifestação de doenças e afastamento de outros povoamentos a fim de evitar contaminação do pólen aquando dos cruzamentos);
- 3) MFR qualificado: material melhorado, importando maior custo;
- 4) MFR testado: material melhorado e testado em ensaios de campo em diferentes regiões de proveniência.

Quando as sementes e/ou plantas são identificadas unicamente pela região de proveniência, correspondem a MFR de fonte identificada, quando identificadas pela colheita em árvores *plus* inseridas em povoamentos selecionados, correspondem a MFR selecionado.

Em Portugal apenas existe material qualificado para o eucalipto, pinheiro-manso e pinheiro-bravo, sendo este correspondente a MFR proveniente de pomares produtores de semente com cruzamentos entre indivíduos selecionados. Para além disso, também apenas existe registo de material testado para eucalipto e pinheiro-bravo, onde existem ensaios de descendência que comprovem a superioridade do MFR testado, para as diferentes regiões de proveniência.

## **Objectivos**

O ensaio elaborado teve como objectivo a avaliação da influência que os flavonóides e o tipo de substrato apresentaram na micorrização de plantas de medronheiro com *Tuber borchii*.

Outro objectivo deste trabalho passou pela elaboração do dossier para a candidatura apresentada ao ICNF do pomar produtor de semente de medronheiro ao Catálogo Nacional de Materiais de Base na categoria de Qualificado.

## Materiais e Métodos

### Micorrização *ex vitro*

#### Material vegetal

Para o estabelecimento do ensaio proposto foram utilizados dois clones (Tabela 1) provenientes de plantas selecionadas, previamente estabelecidos *in vitro* a partir de ápices meristemáticos e posteriormente micropropagados em meio de cultura adaptado para as necessidades específicas da espécie (Anderson, 1984) para a obtenção de rebentos para o estabelecimento do enraizamento (Gomes et al., 2009).

Tabela 1: Registo da origem dos clones testados, bem como as respectivas designações utilizadas em laboratório e em campo. Fichas Morfológicas e Passaportes fitossanitários disponíveis no Anexo 1

Origem	Código numérico geral	Código alfanumérico	Código numérico
Algarve	900	LG1	901
Estreito	100	AL1	101
Oleiros			

Nota: Os códigos alfanuméricos foram contruídos com base nos nomes dos proprietários dos indivíduos selecionados (LG – Ludovina Galego; AL – Américo Lourenço).

Após a multiplicação do material vegetal até à obtenção do número necessário de plantulas, estas foram transferidas para o meio de cultura KNOP com Carbono ativo (Nétien & Gautheret, 1960) durante 15 dias de forma a produzir-se um efeito de desintoxicação das plantas em particular da citocinina BAP utilizada no meio de cultura para multiplicação. Este procedimento tem como objectivo reduzir o efeito negativo que as citocininas apresentam sobre a indução e desenvolvimento de raízes (Gomes et al., 2009).

#### Inóculo

Para a preparação do inóculo seminal utilizaram-se esporos liofilizados de *Tuber borchii*, os quais foram adquiridos à empresa florestal espanhola Micologia Florestal e Aplicada (Barcelona, Espanha). A preparação do inóculo consistiu na preparação de uma suspensão dos esporos liofilizados a 3 g.L<sup>-1</sup> com água da torneira esterilizada. A suspensão foi mantida no escuro em agitação durante a noite à temperatura ambiente para completar a hidratação. Esta suspensão foi utilizada num período inferior a 24 horas após a hidratação de forma a garantir a germinação dos esporos já em substrato.

## Flavonóides

No estabelecimento do presente ensaio e de acordo com os resultados apresentados por Gomes et al. (2021), foram testados dois flavonóides, a quercitina e a daidzeína em concentrações compreendidas entre os 0,25 e os 2,5  $\mu\text{M}$  e comparados com o tratamento de controlo. Os flavonóides foram adicionados ao inóculo em concentrações diferentes como expresso na Tabela 2.

**Tabela 2: Flavonóides utilizados no ensaio de micorrização, respetiva concentração testada e volume pipetado das soluções-mãe (10mg/10ml) para cada tratamento.**

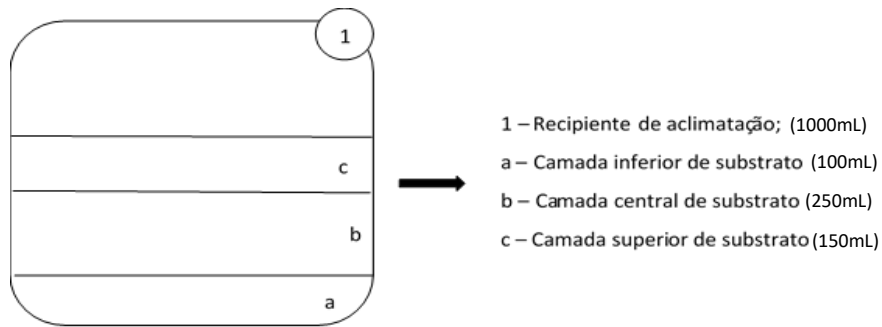
(μM)	μL /volume final de inóculo (60 ml)	
	Quercitina	Daidzeína
0,25	4,53	3,81
0,50	9,07	7,63
1,00	18,13	15,25
2,00	36,27	30,51
2,50	45,34	38,14

**Nota:** Para cada tratamento, quer com quercitina, quer com daidzeína, foram pipetados os volumes correspondentes à concentração do flavonóide que se pretendeu testar para o recipiente que continha o inóculo (Peso molecular da quercitina e daidzeína são respectivamente: 302,24 g/mol e 254,24 g/mol).

## Enraizamento *ex vitro* e aclimatização

De acordo com Figueiredo et al. (2013), procedeu-se ao enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a aclimatização. No processo da aclimatização foram usados recipientes de plástico desinfetados, perfurados no fundo e posteriormente revestidos com folha de alumínio para prevenir a passagem da luz para o substrato. Foi usado um recipiente por tratamento (concentração e tipo de flavonóide) e por clone, excetuando o tratamento de controlo onde foram aclimatados ambos os clones no mesmo recipiente. No total foram usados 21 [(2 clones x 2 flavonóides x 5 concentrações) + controlo] recipientes com 30 rebentos por condição.

De acordo com os resultados apresentados por Castro et al. (2020) e com o objectivo de reduzir o tempo de aclimatização e o risco de contaminação, bem como aumentar a micorrização e a sobrevivência, cada recipiente foi preenchido com substrato, tendo sido este composto por 3 camadas como esquematizado na Figura 9. Os recipientes foram preparados a começar das concentrações mais baixas para as mais altas de flavonóides, havendo a lavagem do material após cada flavonóide testado.



**Figura 9: Esquema de recipiente de acclimação. a) Camada inferior composta por 100 mL de perlite; b) camada central composta por 250 mL de mistura na proporção de 1:1 de turfa esterilizada com perlite; c) camada superior com 150 mL de perlite. O volume total de substrato no recipiente é de 500 mL.**

Para a preparação do substrato (Figura 10), fez-se a inoculação das camadas inferior e central e proporções diferentes, sendo a que a camada inferior foi apenas hidratada com a suspensão de esporos numa proporção de 1:10 (volume de inóculo: volume final), correspondente a 10 mL de inóculo e a camada central foi inoculada com o dobro, na proporção de 2:10 (50 mL), verificando-se que o volume de inóculo utilizado foi suficiente para a hidratação do substrato. A camada superior foi humedecida com água da torneira esterilizada para prevenir contaminações.



**Figura 10: Medição do volume de inóculo a aplicar por tratamento aquando da preparação do substrato.**

Foi ainda realizada a correção do pH do substrato (turfa: perlite) localizado na camada central. Para o efeito pesaram-se 2,36 g de calcário granulado ( $\text{CaCO}_3$ ) por cada 100mL da mistura de turfa com perlite. Esta dose de calcário foi previamente testada em trabalhos anteriores no âmbito de estágios curriculares anteriores.

Todos os recipientes foram identificados com duas etiquetas (Figura 11), uma no interior contendo a identificação do clone, flavonóide testado e concentração correspondente

ao tratamento e outra no exterior com a mesma informação acrescentando a data de instalação do ensaio.



**Figura 11: Recipientes de aclimatização preparados e identificados.**

Após a preparação do suporte físico, os rebentos foram colocados no respectivo substrato depois de serem lavados com água, seguido por um pré-tratamento com um fungicida tolerado pelos fungos micorrízicos (Kumulus, substância ativa: enxofre) e tratados com hormona de enraizamento, auxina ( $9,8 \mu\text{M}$  AIB), por *dipping* (Figueiredo et al., 2013)

Foram utilizados 30 rebentos por tratamento no ensaio, estando na Figura 12 ilustrado o aspeto final do estabelecimento do ensaio.



**Figura 12: Clone 901 imediatamente após a instalação do ensaio com segundo as condições do tratamento Q  $1,0 \mu\text{M}$  (quercitina na concentração  $1 \mu\text{M}$ ).**

Por fim, todos os recipientes foram vedados com película aderentes de forma preservar a humidade relativa no interior do mesmo e mantidos em câmara de crescimento com luz, temperatura e humidade controlada durante 3 meses (fotoperíodo 16/8h a 20/25°C). Procedeu-se a regas semanais entre uma a duas vezes por semana conforme o desenvolvimento radicular das plantas, tendo sido reduzida rega no decorrer do

ensaio. Foram ainda adubadas uma vez por mês com meio de cultura KNOP (Nétien & Gautheret, 1960).

Um mês antes do fim do período de aclimatização, procedeu-se à abertura gradual dos recipientes por forma a realizar uma redução gradual da humidade relativa no recipiente. Este processo tem como objectivo preparar as plantas para um ambiente com menor humidade relativa e deixá-las em condições de serem transplantadas com estomas funcionais e transferidas para condições de viveiro, após a avaliação dos resultados

### **Delineamento experimental e análise de resultados**

Foram testados 30 rebentos em cada uma das condições estudadas (clone x tipo de flavonóide x concentração). Procedeu-se ao levantamento do ensaio e transplantação das plantas 3 meses após a sua instalação.

Durante o processo de transplantação das plantas foram observados um conjunto de dados relativos à sobrevivência das plantas, ao estabelecimento de micorrizas, bem como os restantes parâmetros associados ao desenvolvimento e crescimento das plantas, tais como o comprimento dos rebentos (SL), o desenvolvimento do sistema radicular, comprimento da maior raiz (LLR), o número de raízes principais (NPR) e a presença de *callus* na base do rebento.

A avaliação da micorrização parte da utilização de uma escala numérica a partir da qual se classifica a presença ou não de micorrizas e qual o seu desenvolvimento quando se verifica a simbiose. Considerou-se a seguinte notação esquematizada na Figura 13, contendo cinco valores: 0 – ausência; 1 – presença de micélio; 2 – presença de baby branch; 3 – presença de micorriza e 4 – mais de 25 pontas micorrizadas.



**Figura 13:** Notação utilizada para avaliação de micorrizas. 1 – Presença de micélio; 2 – Baby branch; 3 – Micorriza, até 25 pontas e 4 – mais de 25 pontas micorrizadas.

Em relação à presença de callus considerou-se também uma escala numérica para a classificação do parâmetro qualitativo, sendo que os números da escala dependem do tamanho que este apresenta, seguindo uma ordem crescente (0-3). O interesse deste parâmetro está diretamente relacionado com o efeito da auxina no enraizamento do clone. A presença de callus está associada a um excesso de hormona ou período de *dipping*. Neste caso será um indicador da necessidade de se reduzir a concentração da auxina ou o período de *dipping*. Em micropropagação de lenhosas, a observação de *callus* após o enraizamento é um indicador do rejuvenescimento do material vegetal conseguido através da micropropagação levando a uma menor necessidade de hormona de enraizamento (Gomes & Canhoto, 2009).

O último parâmetro para o qual se aplicou uma escala numérica para a classificação de parâmetros qualitativos foi o desenvolvimento radicular. A notação aplicada está compreendida entre 1 e 4, sendo 1 – existência apenas de raiz principal, 2 – raízes principais e secundárias, 3 – raízes principais, secundárias e terciárias e 4 – ramificação de raízes terciárias.

Os materiais necessários para a avaliação das micorrizas e restantes parâmetros foram uma lupa binocular, equipamento para luz fria para não desidratar as plantas, um paquímetro para as medições dos comprimentos da parte aérea e radicular, placas de Petri de vidro, tabuleiros com água, tabuleiros e tubetes de 250 cm<sup>3</sup> para transplantação e substrato. Como substrato foi utilizada uma mistura de turfa e perlite na proporção de 75:25 (substrato definitivo).

Concretizou-se a análise dos resultados obtidos através de métodos estatísticos capazes de avaliar os parâmetros observados e a forma como estes se expressaram em função dos fatores testados (fatores principais). Estes são o fator clone, o tipo de flavonóide e a respetiva concentração.

Para o tratamento de dados recorreu-se à análise estatística ANOVA (com o auxílio do programa STATISTICA 7.0), tendo como objetivo avaliar se existiram diferenças entre os parâmetros observados em função dos tratamentos testados. No caso de haver diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, realizou-se um teste de comparação múltipla, nomeadamente o teste de Tukey.

Na presença de variáveis que não apresentam uma distribuição normal, como no caso da notação aplicada à avaliação das micorrizas, avaliação da parte radicular, o número de raízes principais e *callus*, foi efetuada uma análise não paramétrica, realizou-se um teste de Kruskal-Wallis. Para variáveis cujos valores eram expressos em percentagem, como a taxa de sobrevivência foi feita a transformação dos dados com auxílio à expressão  $\text{Arcsen}Vx$ .

Foi efetuada uma análise de componentes principais (PCA) com o objetivo de melhor identificar a relação entre as variáveis estudadas e avaliar a percentagem de variância total explicada pelas variáveis e pelos fatores (análise fatorial). Foi realizada uma regressão múltipla para a variável “desenvolvimento das micorrizas” e foi determinado o valor de  $R^2$  (coeficiente de determinação).

### **Candidatura ao CNMB**

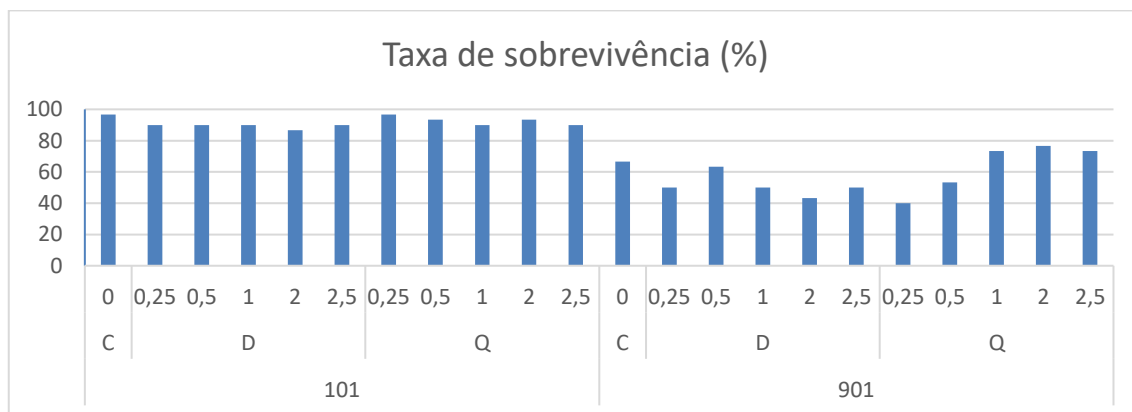
Foi criado um dossier relativo ao Pomar Produtor de Semente instalado na Escola Superior Agrária de Coimbra em 2015, no qual constam um memorando descrevendo o pomar e quais os métodos de seleção dos indivíduos que dele fazem parte, o respectivo passaporte fitossanitário e fichas morfológicas (Anexo 1) dos indivíduos nele constantes, um modelo de requerimento da inscrição preenchido e assinado, onde consta a informação geográfica da parcela onde está instalado o pomar, bem como a respetiva área e autorização do proprietário para a concretização da candidatura (a informação da candidatura consta no Anexo 9).



## Resultados e Discussão

### Taxa de sobrevivência

A Figura 14 mostra a taxa de sobrevivência das plantas em função do clone e dos tratamentos (flavonóides x concentração).



**Figura 14:** Taxa de sobrevivência (%) em função da interação entre o clone (clones 101 e 901), flavonóide (C – controlo; D – Daidzeína; Q – Quercitina) e respetiva concentração testada (concentrações compreendidas entre 0,25 a 2,5 μM).

A sobrevivência foi notoriamente maior no clone 101, comparativamente ao clone 901. Resultados semelhantes observados para o clone 101 foram também reportados por Gomes et al. (2021).

Para os clones a taxa de sobrevivência foi, em particular para o clone 901, tendencialmente maior nos tratamentos com quercitina. Os melhores resultados para o clone 101 foram observados no controlo e no tratamento 0,25 μM de quercitina (Tabela 3).

Para avaliar a existência de diferenças significativas entre os resultados foi feita uma transformação dos dados ( $\text{Arcsen}\sqrt{\%}$ ) de forma a ser possível a aplicação de testes paramétricos, recorrendo-se posteriormente a uma análise de variância (ANOVA, Oneway), seguido de um teste de Tukey no caso de se verificarem diferenças significativas (Tabela 3). As tabelas da ANOVA em anexo (Anexos 2) mostram diferenças significativas entre tratamentos.

**Tabela 3:** Valores médios da taxa de sobrevivência em função: do material vegetal testado, clones 101 e 901, (I); do tipo de flavonoide (II); da respetiva concentração (III) e da interação entre os fatores principais para o clone 901 (IV). São indicados os valores relativos à taxa de sobrevivência (média ± SE %).

Clone	Taxa de Sobrevivência (%)		Clone	Flav.	Taxa de Sobrevivência (%)	
	N	(média ± SE)			N	(média ± SE)
<b>101</b>	33	<b>91,52 ± 0,77</b> <sup>a</sup>	<b>101</b>	D	15	89,33 ± 0,67 <sup>b</sup>
901	33	58,18 ± 2,28 <sup>b</sup>		Q	15	<b>92,67 ± 1,18</b> <sup>a</sup>
<b>Total</b>	66	74,85 ± 2,39		<b>Total</b>	30	91,00 ± 0,74
			<b>901</b>	D	15	51,33 ± 1,92 <sup>b</sup>
				Q	15	<b>63,33 ± 3,98</b> <sup>a</sup>
				<b>Total</b>	30	57,33 ± 2,44

III

IV – Clone 901:

Clone	(μM)	Taxa de Sobrevivência (%)		Flav.	μM	Taxa de Sobrevivência (%)	
		N	(média ± SE)			N	(média ± SE)
<b>101</b>	<b>0,00</b>	3	<b>96,67 ± 5,77</b> <sup>a</sup>	<b>Controlo</b>	<b>3</b>	<b>66,67 ± 3,33</b> <sup>ab</sup>	
	<b>0,25</b>	6	<b>93,33 ± 5,16</b> <sup>ab</sup>	Q x 0,25	3	40,00 ± 0,00 <sup>d</sup>	
	0,50	6	91,67 ± 4,08 <sup>b</sup>	Q x 0,50	3	53,33 ± 3,33 <sup>bcd</sup>	
	1,00	6	90,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	<b>Q x 1,00</b>	<b>3</b>	<b>73,33 ± 3,33</b> <sup>a</sup>	
	2,00	6	90,00 ± 6,32 <sup>b</sup>	<b>Q x 2,00</b>	<b>3</b>	<b>76,67 ± 3,33</b> <sup>a</sup>	
	2,50	6	90,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	<b>Q x 2,50</b>	<b>3</b>	<b>73,33 ± 3,33</b> <sup>a</sup>	
	<b>Total</b>	33	91,52 ± 4,42	Dx 0,25	3	50,00 ± 0,00 <sup>cd</sup>	
<b>901</b>	0,00	3	66,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	Dx 0,50	3	63,33 ± 3,33 <sup>abc</sup>	
	<b>0,25</b>	6	<b>45,00 ± 5,48</b> <sup>b</sup>	Dx 1,00	3	50,00 ± 0,00 <sup>cd</sup>	
	0,50	6	58,33 ± 7,53 <sup>a</sup>	Dx 2,00	3	43,33 ± 3,33 <sup>d</sup>	
	1,00	6	61,67 ± 13,29 <sup>a</sup>	Dx 2,50	3	50,00 ± 0,00 <sup>cd</sup>	
	2,00	6	60,00 ± 18,97 <sup>a</sup>	<b>Total</b>	33	58,18 ± 2,28	
	2,50	6	61,67 ± 13,29 <sup>a</sup>				
	<b>Total</b>	33	58,18 ± 13,10				

**Notas:** Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas, P < 0,05 (Teste de Tukey) São indicados os valores relativos à taxa de sobrevivência (média ± SE). Número total de plantas foram 660, divididas por blocos de tratamento constituídos, cada repetição, por 10 plantas.

A Tabela 2 evidência: que o clone 101 teve uma taxa de sobrevivência significativamente superior (91,52±0,77) comparativamente ao 901. Estes valores podem ser justificados segundo a resiliência do clone a condições de stress, pois no final do processo de aclimatização, os recipientes devem ser abertos lentamente ao longo do último mês, o que não aconteceu exatamente.

Para ambos os clones observou-se uma melhor resposta significativamente superior com os tratamentos com quercitina. As concentrações com taxa significativamente superior foram de 0 e os 0,25  $\mu\text{M}$  para o clone 101, enquanto no clone 901 não se verificaram diferenças significativas em nenhum tratamento com exceção da quercitina a 0,25  $\mu\text{M}$ . Este último resultado oposto pode ser explicado, por erro de manipulação, de ter ocorrido queda do recipiente com as plantas, deixando de haver um suporte físico para acompanhar o crescimento dos rebentos e a conseqüente mortalidade.

Para o clone 901, a interação entre os fatores tipo de flavonóide e respectiva concentração, os resultados significativamente superiores foram observados com quercitina nas concentrações de 1 a 2,5  $\mu\text{M}$  e sem diferenças significativas face ao controlo.

### **Avaliação da micorrização e parâmetros de crescimento vegetal**

Avaliou-se a micorrização e o crescimento das plantas 3 meses após a data de instalação do ensaio. Com a avaliação conjunta destes parâmetros, em particular a presença de micorrizas, pretendeu-se avaliar o efeito do tipo de flavonóide e respectiva concentração, bem como a interação com o clone no desenvolvimento das micorrizas e da planta.

A Tabela 4 mostra que o clone com um desenvolvimento de micorrizas significativamente superior foi o clone 101 comparativamente ao clone 901. Verificaram-se também diferenças significativas entre ambos os clones ao nível do comprimento dos rebentos (SL), bem como do comprimento da maior raiz (LLR) e do número de raízes principais (NPR), tendo os valores sido superiores no clone 101. Os valores mais elevados destes parâmetros no clone 101 estão associados ao maior desenvolvimento das micorrizas do mesmo (Anexo 3).

Os valores significativamente superiores de raízes principais no clone 101 indicam maior potencial de desenvolvimento de raízes secundárias onde se vão estabelecer as micorrizas (Gomes et al., 2021).

A presença de *callus* foi menor no clone 101, sendo próximo de zero, o que representa um bom equilíbrio na reação do clone à auxina, na fase de indução dos primórdios radiculares. Este aspeto é referido por vários autores e está associado posteriormente à taxa de sobrevivência no campo (Gomes et al., 2014).

Na Tabela 5 é possível observar que a presença de flavonóides contribuiu para um maior sucesso no estabelecimento e desenvolvimento de micorrizas, no entanto o tipo de flavonóide testado não teve impacto direto na micorrização, não havendo diferença significativa entre a quercitina e a daidzeína ( $P < 0,05$ ). Porém o tipo de flavonóide mostrou ter impactos maiores ao nível da planta, nomeadamente nos parâmetros do

desenvolvimento radicular, havendo maior ramificação das raízes quando utilizada a daidzeína e da presença de *callus*, tendo sido significativamente superiores quando utilizada também a daidzeína (Anexo 4). Neste caso vê-se que a quercitina não mostra efeitos negativos no desenvolvimento normal da planta contrariamente à daidzeína.

**Tabela 4: Valores médios do desenvolvimento de micorrizas, crescimento da parte aérea (SL), desenvolvimento radicular (Sistema radicular; LLR; NPR) e callus em função do material vegetal testado, clones 101 e 901. São indicados os valores relativos a cada parâmetro avaliado (média ± SE).**

Clone	N	Micorrizas	SL	Sistema radicular	LLR	NRP	Callus
		(1-4)	(mm)	(1-4)	(mm)		(0-3)
		Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE
101	331	<b>3,31 ± 0,04</b> <sup>a</sup>	<b>29,74 ± 0,50</b> <sup>a</sup>	2,89 ± 0,03 <sup>a</sup>	<b>63,35 ± 1,21</b> <sup>a</sup>	<b>5,03 ± 0,24</b> <sup>a</sup>	<b>0,37 ± 0,03</b> <sup>a</sup>
901	212	2,88 ± 0,08 <sup>b</sup>	23,67 ± 0,62 <sup>b</sup>	3,00 ± 0,03 <sup>a</sup>	57,11 ± 1,57 <sup>b</sup>	3,08 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,07 <sup>b</sup>
Total	543	3,15 ± 0,04	27,37 ± 0,41	2,93 ± 0,02	60,91 ± 0,97	4,27 ± 0,17	0,66 ± 0,04

Nota: Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas, P < 0,05 (Teste de Tukey). SL – comprimento dos rebentos; Sistema radicular – desenvolvimento das raízes; LLR – comprimento da maior raiz; NPR – nº de raízes principais.

**Tabela 5: Valores médios do desenvolvimento de micorrizas, crescimento da parte aérea (SL), desenvolvimento radicular (Sistema radicular; LLR; NPR) e callus em função do flavonóide testado, daidzeína (D) e quercitina (Q). São indicados os valores relativos a cada parâmetro avaliado (média ± SE).**

Flav.	N	Micorrizas	SL	Sistema radicular	LLR	NRP	Callus
		(1-4)	(mm)	(1-4)	(mm)		(0-3)
		Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE
D	261	3,07 ± 0,06 <sup>a</sup>	27,06 ± 0,59 <sup>a</sup>	<b>3,02 ± 0,03</b> <sup>a</sup>	61,02 ± 1,51 <sup>a</sup>	4,20 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,738 ± 0,06 <sup>b</sup>
Q	282	3,22 ± 0,05 <sup>a</sup>	27,65 ± 0,56 <sup>a</sup>	2,85 ± 0,03 <sup>b</sup>	60,81 ± 1,24 <sup>a</sup>	4,34 ± 0,23 <sup>a</sup>	<b>0,583 ± 0,05</b> <sup>a</sup>
Total	543	3,15 ± 0,04	27,37 ± 0,41	2,93 ± 0,02	60,91 ± 0,97	4,27 ± 0,17	0,657 ± 0,04

Notas: Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas, P < 0,05 (Teste de Tukey). SL – comprimento dos rebentos; Sistema radicular – desenvolvimento das raízes; LLR – comprimento da maior raiz; NPR – nº de raízes principais.

Embora o tipo de flavonóide testado não tenha mostrado diferenças significativas ao nível do desenvolvimento de micorrizas (1-4), a concentração em que este foi testado mostra diferenças significativas (Anexo 5). Observou-se que concentrações mais baixas podem auxiliar no desenvolvimento de micorrizas (Tabela 6).

A Tabela 6 mostra que o desenvolvimento das micorrizas foi significativamente superior quando testada a concentração de 0,25  $\mu\text{M}$  comparativamente ao controlo.

Verificou-se ainda que o valor mais elevado testado (2,5  $\mu\text{M}$ ) afetaram significativamente o desenvolvimento do sistema radicular ( $P < 0,05$ ; Tabela 6). Observou-se por vezes maior ramificação das raízes, bem como maior comprimento das mesmas. Embora não existam diferenças significativas relativamente ao número de raízes principais, há uma tendência no crescimento deste valor com o aumento da concentração (Figura 15).



**Figura 15: Contagem de raízes principais (NPR) do tratamento com daidzeína a 2,5  $\mu\text{M}$  do clone 901.**

**Nota: Foram contadas no total 26 raízes principais.**

Observou-se ainda que algumas destas raízes eram muito finas, semelhantes às raízes formadas em condições *in vitro*, raízes não funcionais. Estes resultados foram também observados em ensaios realizados previamente (Gonçalves, 1998).

**Tabela 6: Valores médios do desenvolvimento de micorrizas, crescimento da parte aérea (SL), desenvolvimento radicular (Sistema radicular; LLR; NPR) e callus em função das concentrações testadas de cada flavonóide.**

Concentração ( $\mu$ M)	N	Micorrizas (1-4)	SL (mm)	Sistema radicular (1-4)	LLR (mm)	NPR	Callus (0-3)
		Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE	Média $\pm$ SE
0	98	3,06 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	23,29 $\pm$ 0,61 <sup>c</sup>	2,73 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	58,55 $\pm$ 2,16 <sup>ab</sup>	4,51 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	0,827 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
0,25	83	<b>3,48 <math>\pm</math> 0,08<sup>a</sup></b>	<b>30,33 <math>\pm</math> 0,99<sup>a</sup></b>	2,96 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	60,59 $\pm$ 2,27 <sup>ab</sup>	4,27 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	0,675 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
0,5	90	2,97 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	28,50 $\pm$ 0,92 <sup>ab</sup>	2,98 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	<b>64,96 <math>\pm</math> 2,74<sup>a</sup></b>	3,68 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	0,700 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
1	91	3,04 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>	24,82 $\pm$ 0,97 <sup>bc</sup>	2,96 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	60,54 $\pm$ 2,64 <sup>ab</sup>	4,27 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	0,440 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
2	90	3,29 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	27,18 $\pm$ 1,00 <sup>ab</sup>	2,97 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	55,11 $\pm$ 2,10 <sup>c</sup>	4,37 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	0,728 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
2,5	91	3,07 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	<b>30,67 <math>\pm</math> 1,21<sup>a</sup></b>	<b>3,02 <math>\pm</math> 0,05<sup>a</sup></b>	<b>65,87 <math>\pm</math> 2,11<sup>a</sup></b>	4,49 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	0,566 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
Total	543	3,15 $\pm$ 0,04	27,37 $\pm$ 0,41	2,93 $\pm$ 0,02	60,91 $\pm$ 0,97	4,27 $\pm$ 0,17	0,657 $\pm$ 0,04

Notas: Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas, P < 0,05 (Teste de Tukey). SL – comprimento dos rebentos; Sistema radicular – desenvolvimento das raízes; LLR – comprimento da maior raiz; NPR – nº de raízes principais. São indicados os valores relativos a cada parâmetro avaliado (média  $\pm$  SE)..

Constam dos anexos Anexo 6 e Anexo 7 o resumo completo dos resultados para ambos os clones e fatores em estudo. A regressão múltipla (Anexo 8) para a variável desenvolvimento de micorrizas (0-4) com um coeficiente de correlação R de 0,56 mostra que esta variável tem relação significativa ( $P < 0,05$ ): 1) direta com o comprimento dos rebentos (SL), comprimento da maior raiz (LLR), avaliação do sistema radicular (1-4) e 2) relação inversa com o genótipo (clone) e a formação de *callus*.

Estes resultados indicam uma relação direta entre o desenvolvimento das micorrizas e o desenvolvimento da planta (parte aérea e radicular) e ainda mostram que é dependente do genótipo.

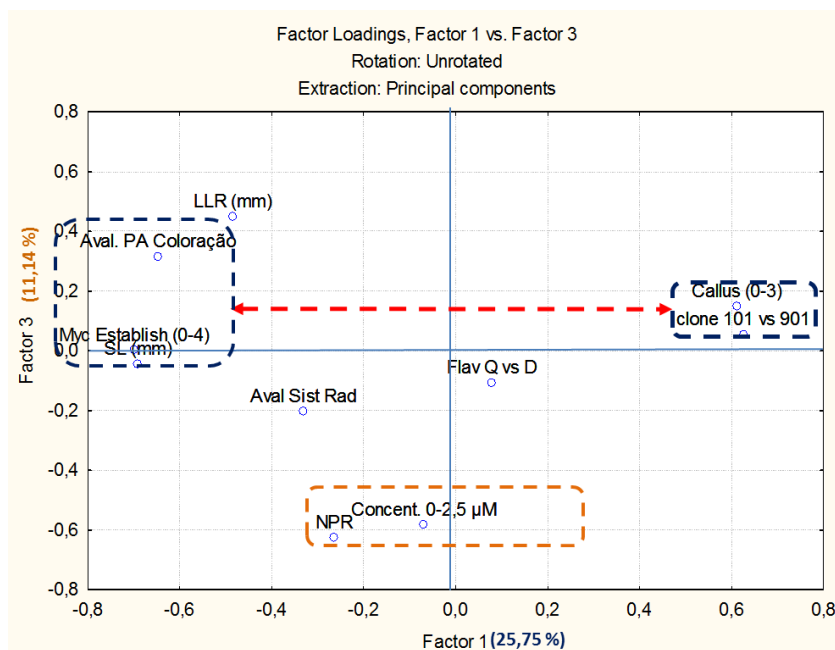
Perante a análise de componentes principais (Figura 16) observa-se que as variáveis associadas ao fator 3 são: a avaliação da coloração da parte aérea, o estabelecimento de micorrizas e o comprimento dos rebentos, este fator é responsável por explicar 11,14% da variância total observada.

No fator 1 estão associados o número de raízes principais e as concentrações testadas, explicando 25,75% da variância total observada (Anexo 8). Estes resultados confirmam que na presença de concentrações de flavonóides mais elevadas observam-se maior número de raízes principais (Figura 15).

Esta análise pode indicar uma relação direta entre o estabelecimento de micorrizas e o crescimento das plantas, tendo-se verificado que este é maior e melhor com a presença de micorrizas bem desenvolvidas. Estes resultados confirmam os anteriores registados com a regressão múltipla.

A PCA atribui ainda uma relação entre o surgimento de *callus* e clone, sugerindo que este parâmetro avaliado anteriormente depende diretamente do clone, contribuindo para um menor estabelecimento de micorrizas.





**Figura 16: Análise de componentes principais (PCA): análise da variância pelos fatores 1 (25,75%) e 3 (11,14%); as suas variáveis explicativas e a relação entre si.**

Comparativamente a resultados anteriores de ensaios realizados na ESAC, observou-se maior taxa de sobrevivência neste ensaio quando comparando com anteriores (Gomes et al., 2021). A otimização do protocolo de enraizamento mostrou ser fundamental para o efeito, havendo maior taxa de sobrevivência das plantas, maior desenvolvimento de micorrizas e ainda a redução do período necessário para o estabelecimento das micorrizas.

Observou-se ainda, à semelhança de trabalhos anteriores que o estabelecimento de micorrizas em plantas micropropagadas de medronheiro é dependente do genótipo e que o uso de flavonóides teve um efeito positivo nos resultados (Gomes et al., 2021).

### **Pomar Produtor de semente**

Do total de 50 indivíduos que constituem o pomar produtor de semente foram preenchidos os passaportes fitossanitários e as fichas morfológicas, bem como identificadas e caracterizadas as regiões de proveniência para cada progenitor de forma a avaliar o destino por excelência da respectiva descendência.

O pomar foi inserido no RNMB (Registo Nacional de Materiais de Base), tendo a ESAC a possibilidade de proceder à venda de semente certificada na categorial de material qualificado.

No presente ano foram instalados os primeiros ensaios de progénies em diferentes regiões com características edafoclimáticas distintas para avaliação dos progenitores.



## Conclusão

Perante os resultados apresentados é possível apontar para o uso de flavonóides como uma mais-valia para a indução de micorrizas em plantas de medronheiro e que o estabelecimento e desenvolvimento de micorrizas é dependente do genótipo, no entanto o acerto das concentrações a utilizar pode melhorar muito os resultados. Concentrações mais baixas mostraram ter efeitos positivos nos resultados.

Para além dos flavonóides a otimização do protocolo de enraizamento teve um papel fundamental na sobrevivência das plantas, no desenvolvimento de micorrizas e na redução do período necessário para o estabelecimento das micorrizas. Melhorando a qualidade do suporte das plantas quer ao nível de estrutura física quer ao nível de maior presença de nutrientes, melhorando a qualidade do material vegetal produzido, bem como melhores resultados da micorrização e o seu desenvolvimento.

O isolamento da camada intermédia composta por turfa e perlite pela camada superior de perlite permitiu o controlo do desenvolvimento de fungos patogénicos, contribuindo para menor mortalidade dos rebentos.

Outro aspeto importante e decisivo nos resultados foi a instalação e condução do ensaio. Isto é, o estabelecimento do ensaio deve ser feito de forma a colocar as plantas aclimatadas nas melhores condições possíveis, sendo que o fator operador tem um papel relevante, sendo necessário o cuidado com o manuseamento do material vegetal, a desinfeção das mãos e material de trabalho, bem como a monitorização contínua.

Por fim, foi conseguida a aprovação da inscrição do Pomar produtor de semente no CNMB cujo ofício com o código de inscrição **ARBUQ001** se encontra nos anexos (Anexo 10), o que permitirá à ESAC (Escola Superior Agrária de Coimbra) a comercialização de material florestal de reprodução (sementes) na categoria de qualificado. É de referir, segundo informação cedida pelos viveiros Altri, que a procura no mercado viveirista de semente certificada de medronheiro é elevada, mostrada pela saída de plantas certificadas de medronheiro dos viveiros no ano anterior, que terá sido superior à de sobreiro.

## Bibliografia

- Anderson, W. C. (1984). A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109(3), 343–347.
- Antunes, P. M., Rajcan, I., & Goss, M. J. (2006). Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Soil Biology and Biochemistry*, 38(3), 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.008>
- Bettinger, P., Boston, K., Siry, J. P., & Grebner, D. L. (2009). *Forest Management and Planning*.
- Bingre, P., Aguiar, C., Espírito Santo, D., Arsénio, P., & Monteiro-Henriques, T. (2007). *Guia de campo: árvores e arbustos de Portugal Continental* (Árvores e). Jornal Público, Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Liga para a Protecção da Natureza. <http://hdl.handle.net/10198/6250>
- Botelho da Costa, J. (2011). *Caracterização e Constituição do Solo* (A. C. Dias (Ed.); 8.<sup>a</sup> Edição). Fundação Calouste Gulbenkian.
- Castro, F., Gomes, B., Murena, C., Figueiredo, M., Reis, D., Vidal, M., Ferreira, I., Nunes, J., Machado, H., & Gomes, F. (2020). Effect of substrate on mycorrhizal synthesis between *Tuber borchii* and micropropagated plants of *Arbutus unedo* L. 4.<sup>o</sup> *Encontro Em Biologia Funcional e Biotecnologia de Plantas*, 1224, 91–100.
- Central, A. (2019). *Diário da República*, 1.<sup>a</sup> série — N.º 29 — 11 de fevereiro de 2019. 112033784, 1060–1079. <https://data.dre.pt/eli/port/54/2019/02/11/p/dre/pt/html>
- Correia, A. V., Oliveira, Â. C., Teixeira, C., Salinas, F., Louro, V., & Costa, Z. (2002). *Principais Espécies Florestais com Interesse para Portugal: Zonas de Influência Mediterrânica* (Direcção-Geral das Florestas (Ed.); 2.<sup>a</sup> Edição).
- Curado, F., Gama, C., & Gomes, F. (2015). A instalação da cultura do medronheiro. // *Jornadas Do Medronho*, 24, 84–92.
- Decreto-Lei n.º 13/2019, (2019). <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/13/2019/01/21/p/dre/pt/html>
- Decreto-Lei n.º 205/2003. (2003). <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/205/2003/09/12/p/dre/pt/html>
- Elwes, H. J., & Henry, A. (2014). ARBUTUS. In *The Trees of Great Britain and Ireland* (pp. 558–559). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107252806.050>

- Figueiredo, P., Gomes, F., Santos, R., & Pop, R. L. (2013). Rapid Propagation of *Arbutus unedo* L. Adult Selected Plants Using Ex Vitro Rooting. In *In 8th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. Program and Abstract Book* (p. 69).
- Ge, Z. W., Brenneman, T., Bonito, G., & Smith, M. E. (2017). Soil pH and mineral nutrients strongly influence truffles and other ectomycorrhizal fungi associated with commercial pecans (*Carya illinoensis*). In *Plant and Soil* (Vol. 418, Issues 1–2, pp. 493–505). <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3312-z>
- Gomes, B., Castro, F., Santos, R., Figueiredo, P., Silva, M., Vidal, M., Ferreira, I., Nunes, J., Machado, H., & Gomes, F. (2021). Effect of Quercetin on Mycorrhizal Synthesis between *Tuberorchii* and *Arbutus unedo* L. In *Vitro Plants. Microbiology Research*, 12(1), 69–81. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12010007>
- Gomes, F., & Canhoto, J. M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45(1), 72–82. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9164-8>
- Gomes, F., Castro, F., Gomes, B., Vidal, M., Reis, D., Figueiredo, P., Ferreira, I., Nunes, J., & Machado, M. (2021). Produção de plantas micorrizadas e Instalação de ensaios com clones de Medronheiro. *VI COLÓQUIO NACIONAL DA PRODUÇÃO DE PEQUENOS FRUTOS*.
- Gomes, F., Franco, J., Pato, R. L., Botelho, G., Rodrigues, I., Figueiredo, P., & Casau, F. (2017). Produção de medronho para destilar. *Medronheiro, Caderno Técnico*, 5–33.
- Gomes, F., Gama, J., Figueiredo, P., Santos, R., & João, C. (2014). Clonagem de plantas selecionadas de medronheiro e a sua avaliação de campo. *I Jornadas Do Medronho No Algarve*, 1–8.
- Gomes, F., Lopes, M. L., Santos, T., & Canhoto, J. M. (2009). Micropropagation of selected trees of *Arbutus unedo* L. through axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae*, 839(1997), 111–116. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.12>
- Gomes, F., Palha, G., & Guilherme, R. (2013). Actas Portuguesas de Horticultura: Jornadas do Medronho. In R. G. Graça Palha, Filomena Gomes (Ed.), *Jornadas do Medronho* (Associação).
- Gonçalves, J. C. D. D. (1998). *Micropropagação de castanheiro: Estudo das fases de enraizamento e aclimatização* [Instituto Superior de Agronomia]. <https://repositorio.ipcb.pt/handle/10400.11/1053>
- Hassan, S., & Mathesius, U. (2012). The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: Opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3429–3444. <https://doi.org/10.1093/jxb/err430>
- Iotti, M., Piattoni, F., Leonardi, P., Hall, I. R., & Zambonelli, A. (2016). First evidence for

- truffle production from plants inoculated with mycelial pure cultures. *Mycorrhiza*, 26(7), 793–798. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0703-6>
- Kaçar, D. (2008). *Screening of some plant species for their total antioxidant and antimicrobial activities* (Issue July). School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology.
- Konstantinidis, P., Tsiourlis, G., & Xofis, P. (2006). Effect of fire season, aspect and pre-fire plant size on the growth of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree) resprouts. *Forest Ecology and Management*, 225(1–3), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.01.011>
- Lancellotti, E., Iotti, M., Zambonelli, A., & Franceschini, A. (2014). Characterization of *Tuber borchii* and *Arbutus unedo* mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 24(6), 481–486. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0564-9>
- Louredo, P. (2018). *Micorrizas*. <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/micorrizas.htm>
- Louro, V. (2016). *A floresta em Portugal: um apelo à inquietação cívica* (G. Valente (Ed.); 3ª edição). Gradiva.
- Machado, H., Barrento, M. J., Plácito, F., Suárez, D., Clemente, M., Figueiredo, P., & Gomes, F. (2017). Mycorrhizal synthesis between *Lactarius deliciosus* and *Arbutus unedo* under nursery conditions. *Acta Horticulturae*, 1187, 265–271. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1187.27>
- Martins, A. (1997). *Micorrização in vitro de plantas micropropagadas de Castanea sativa Mill* (E. S. A. Instituto Politécnico de Bragança (Ed.); Série Estu). Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária. [https://www.researchgate.net/publication/309375775\\_Micorrizacao\\_in\\_vitro\\_de\\_plantas\\_micropropagadas\\_de\\_Castanea\\_sativa\\_Mill](https://www.researchgate.net/publication/309375775_Micorrizacao_in_vitro_de_plantas_micropropagadas_de_Castanea_sativa_Mill)
- Martins, J., & Canhoto, J. (2014). Biotecnologia do medronheiro (*Arbutus unedo* L.): ensaios de cultura in vitro e hibridação. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 24, 494–499.
- Nétien, G., & Gautheret, R. J. (1960). La Culture des Tissus végétaux. *Publications de La Société Linnéenne de Lyon*, 24. [https://www.persee.fr/doc/linly\\_0366-1326\\_1960\\_num\\_29\\_1\\_6848\\_t1\\_0024\\_0000\\_3](https://www.persee.fr/doc/linly_0366-1326_1960_num_29_1_6848_t1_0024_0000_3)
- Nicolás, E., Maestre-Valero, J. F., Alarcón, J. J., Pedrero, F., Vicente-Sánchez, J., Bernabé, A., Gómez-Montiel, J., Hernández, J. A., & Fernández, F. (2015). Effectiveness and persistence of arbuscular mycorrhizal fungi on the physiology, nutrient uptake and yield of Crimson seedless grapevine. *Journal of Agricultural Science*, 153(6), 1084–1096. <https://doi.org/10.1017/S002185961400080X>
- Peris Gisbert, J., Stübing, J., & Roselló Gimeno, R. (1995). *Sideritis velayosiana*, nueva especie para la flora de Marruecos. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 53(1), 131–133. <https://doi.org/10.3989/ajbm>

- Peterson, R. L., & Massicotte, H. B. (2004). Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany*, *82*(8), 1074–1088. <https://doi.org/10.1139/b04-071>
- Rasmont, P., Regali, A., Ings, T. C., Lognay, G., Baudart, E., Marlier, M., Delcarte, E., Viville, P., Marot, C., Falmagne, P., Verhaeghe, J. C., & Chittka, L. (2005). Analysis of pollen and nectar of *Arbutus unedo* as a food source for *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, *98*(3), 656–663. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.3.656>
- Read, D. J. (2001). *Mycorrhiza. Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Ribeiro, M. M., Piotti, A., Ricardo, A., Gaspar, D., Costa, R., Parducci, L., & Vendramin, G. G. (2017). Genetic diversity and divergence at the *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) westernmost distribution limit. *PLoS ONE*, *12*(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175239>
- Rożek, K., Rola, K., Błaszczkowski, J., Leski, T., & Zubek, S. (2020). How do monocultures of fourteen forest tree species affect arbuscular mycorrhizal fungi abundance and species richness and composition in soil? *Forest Ecology and Management*, *465*(January). <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118091>
- Simões, V., Favarin, L. R. V., Cabeza, N. A., De Oliveira, T. D., Fiorucci, A. R., Stropa, J. M., Rodrigues, D. C. M., Cavalheiro, A. A., & Dos Anjos, A. (2013). Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). *Química Nova*, *36*(4), 495–501. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000400002>
- Smith, S., & Read, D. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis* (2nd Editio). Academic Press. <https://www.elsevier.com/books/mycorrhizal-symbiosis/smith/978-0-12-652840-4>
- Torres, J., Gonçalves, J., Pinto, A. T., Proença, V., & Honrado, J. P. (2011). Fogo, resiliência e dinâmica em espaços florestais do Norte de Portugal. In *Florestas do Norte de Portugal: História, Ecologia e Desafios de Gestão* (Issue December 2015).
- Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. (2013). Ficha da espécie *Arbutus unedo*. *Ficha Da Espécie Arbutus Unedo*, 1. [http://jb.utad.pt/especie/arbutus\\_unedo](http://jb.utad.pt/especie/arbutus_unedo)
- White, T. L., Adams, W. T., & Neale, D. B. (2007). *Forest genetics* (T. L. White, W. T. Adams, & D. B. Neale (Eds.)). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845932855.0000>
- Wu, B., Isobe, K., & Ishii, R. (2004). Arbuscular mycorrhizal colonization of the dominant plant species in primary successional volcanic deserts on the Southeast slope of Mount Fuji. *Mycorrhiza*, *14*(6), 391–395. <https://doi.org/10.1007/s00572-004-0328-z>

# Anexos

## Anexo 1: Ficha Morfológica e Passaporte fitossanitário dos clones.

LABORATÓRIO DE GENÉTICA E CITOPLOGIA DE PLANTAS  
VIADEGO DE COLHEITA DE ESPÉCIES SILVESTRES

2023/24

VIADEGO DE COLHEITA DE ESPÉCIES SILVESTRES

IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA COLHEITA

ESPÉCIE: *Arbutus unedo*

SUBESPÉCIE: \_\_\_\_\_

NOME DOS COLECTORES: Luísa Maria Galvão

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

NÚMERO DE COLHEITA: LG1

INSTITUIÇÃO COLECTORA: Universidade do Algarve

2020 / (2012 - Estabelecido)

PAÍS DA COLHEITA: Portugal

DISTRITO: Faro

CONCELHO: Faro

FREGUESIA: St. Barbara de Nexe

N.º DO LOCAL DE COLHEITA: \_\_\_\_\_

LOCAL DA COLHEITA: \_\_\_\_\_  
Cidade/Vila/município: \_\_\_\_\_  
distância (em Km): \_\_\_\_\_  
direção: \_\_\_\_\_

LATITUDE DO LOCAL: N 37°06'26"

LONGITUDE DO LOCAL: O 7° 56' 23,6"

ALTITUDE DO LOCAL: \_\_\_\_\_

FONTE DE COLHEITA:

1. Habitat silvestre: _____	2. Quinta: _____	3. Mercado: _____
1.1 Floresta/Bosque _____	2.1 Campo cultivado _____	3.1 Municipal _____
1.2 Matagal _____	2.2 Pomar _____	3.2 Vila _____
1.3 Prado _____	2.3 Jardim _____	3.3 Cidade _____
1.4 Habitat aquático _____	2.4 Terra de pouso _____	3.4 Comercial _____
_____	2.5 Pastagem _____	3.5 Outro _____
_____	2.6 Actividade agrícola _____	_____
4 Instituição _____	2.7 Vivia _____	5 Outra _____

ESTATUTO DA AMOSTRA:

1. Silvestre _____	2. Infante _____	3. Outro _____
--------------------	------------------	----------------

PARTE DA PLANTA UTILIZADA

1. Cule/Tronco _____	5. Casca _____	8. Semente _____
2. Ramos _____	6. Flores/Florescência _____	9. Raiz _____
3. Folha _____	7. Fruto _____	10. Seiva/Rexina/Látex _____
4. Rizoma, bolbo, tubérculo ou outros propágulos vegetativos _____	_____	_____

UTILIZAÇÃO DA PLANTA

1. Alimento _____	5. Bebida _____	9. Forragem/Pastagem _____
2. Medicinal _____	6. Fibra _____	10. Controlo _____
3. Aromática _____	7. Madeira _____	11. Ornamental _____
4. Condimento _____	8. Artesanal _____	12. Outras _____

TIPO DE AMOSTRA COLHIDA

1. vegetalivo _____	2. semente _____	3. ambos _____
---------------------	------------------	----------------

NOME LOCAL PLANTA: Medeolano Ervideiro/Arvore morango

NÚMERO DE PLANTAS ENCONTRADAS

Por local 8 Tamanho do local 60 m<sup>2</sup>

NÚMERO DE PLANTAS AMOSTRADAS: 1

TIPO DE AMOSTRAGEM: Vegetal (fruto e folhas; flor)

QUANTIDADE DEMATERIAL: 150-200 g de fruto; 10 g folhas

FOTOGRAFIA: sim n.º de fotos: 3 + 3 (contacto morfológica)

FORAM COLHIDAS OUTRAS AMOSTRAS DO MESMO GRUPO DE ESPÉCIES DE PLANTAS: sim não \_\_\_\_\_

ESPÉCIME DE HERBÁRIO: sim não \_\_\_\_\_

N.º DE COLHEITA: LG1

FICHA DE COLHEITA DE ESPÉCIES SILVESTRES

N.º ACESSO: LG1

HABITAT

1. Floresta _____	8. Alpinho _____
2. Bosque _____	9. Charneira/Gândara _____
3. Mato _____	10. Terreno cultivado _____
4. Campo arborizado _____	11. Terrenos marginais _____
5. Pastagem _____	12. Pântano _____
6. Floresta c/ pastagem sob coberto _____	13. Outras _____
7. Deserto _____	14. Outras _____

MICROAMBIENTE

1. Cume (mostarda/terra) _____	8. Pato queimado _____
2. Rochedo/Pedraço _____	9. Bancos de areia _____
3. Encosta da Montanha _____	10. Margem (rio/mar) _____
4. Base do Vale _____	11. Áreas marítimas _____
5. Planície _____	12. Urbano/Primitivo urbano _____
6. Margem da floresta _____	13. Margem de estrada _____
7. Área florestal queimada _____	14. Outras _____

FISIOGRAFIA DO LOCAL

1. Planície _____	4. Planalto _____	7. Montanha _____
2. Baixa _____	5. Terra Alta _____	8. Outras _____
3. Vale _____	6. Colina _____	_____

TOPOGRAFIA DO LOCAL

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

TEXTURA DO SOLO

1. Arenoso _____	5. S. Argiloso _____	9. Franco-limoso _____
2. Franco _____	6. Limoso _____	10. Argilo-arenoso _____
3. Franco arenoso _____	7. Argilo-limoso _____	11. Aluvionares orgânicos _____
4. Franco argiloso _____	8. Limo-arenoso _____	10. Outras _____

PEDREGOSIDADE

1. Nenhuma _____	3. Média (5 a 25%) _____
2. Pouca (1 a 5%) _____	4. Alta (>25%) _____

DRENAGEM

1. Pobre _____	3. Boa _____
2. Moderada _____	4. Excessiva _____

AMOSTRA DE SOLO: sim não \_\_\_\_\_

GESTÃO HUMANA DO HABITAT

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

PRINCIPAL AMEAÇA DA POPULAÇÃO

1. Desertificação _____
2. Erosão do solo _____
3. Desflorestação _____
4. Outras: Erosão gravítica _____

TIPOS DE PROPAGAÇÃO NATURAL

1. Por semente _____	3. Por semente e vegetativa _____
2. Vegetativa _____	4. Apocárita _____

IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA COLHEITA

ESPÉCIE: *Arbutus unedo*

SUBESPÉCIE: \_\_\_\_\_

NOME DOS COLECTORES: Luísa Maria Galvão

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

NÚMERO DE COLHEITA: LG1

INSTITUIÇÃO COLECTORA: Universidade do Algarve

2020 / (2012 - Estabelecido)

PAÍS DA COLHEITA: Portugal

DISTRITO: Faro

CONCELHO: Faro

FREGUESIA: St. Barbara de Nexe

N.º DO LOCAL DE COLHEITA: \_\_\_\_\_

LOCAL DA COLHEITA: \_\_\_\_\_  
Cidade/Vila/município: \_\_\_\_\_  
distância (em Km): \_\_\_\_\_  
direção: \_\_\_\_\_

LATITUDE DO LOCAL: N 37°06'26"

LONGITUDE DO LOCAL: O 7° 56' 23,6"

ALTITUDE DO LOCAL: \_\_\_\_\_

FONTE DE COLHEITA:

1. Habitat silvestre: _____	2. Quinta: _____	3. Mercado: _____
1.1 Floresta/Bosque _____	2.1 Campo cultivado _____	3.1 Municipal _____
1.2 Matagal _____	2.2 Pomar _____	3.2 Vila _____
1.3 Prado _____	2.3 Jardim _____	3.3 Cidade _____
1.4 Habitat aquático _____	2.4 Terra de pouso _____	3.4 Comercial _____
_____	2.5 Pastagem _____	3.5 Outro _____
_____	2.6 Actividade agrícola _____	_____
4 Instituição _____	2.7 Vivia _____	5 Outra _____

ESTATUTO DA AMOSTRA:

1. Silvestre _____	2. Infante _____	3. Outro _____
--------------------	------------------	----------------

PARTE DA PLANTA UTILIZADA

1. Cule/Tronco _____	5. Casca _____	8. Semente _____
2. Ramos _____	6. Flores/Florescência _____	9. Raiz _____
3. Folha _____	7. Fruto _____	10. Seiva/Rexina/Látex _____
4. Rizoma, bolbo, tubérculo ou outros propágulos vegetativos _____	_____	_____

UTILIZAÇÃO DA PLANTA

1. Alimento _____	5. Bebida _____	9. Forragem/Pastagem _____
2. Medicinal _____	6. Fibra _____	10. Controlo _____
3. Aromática _____	7. Madeira _____	11. Ornamental _____
4. Condimento _____	8. Artesanal _____	12. Outras _____

TIPO DE AMOSTRA COLHIDA

1. vegetalivo _____	2. semente _____	3. ambos _____
---------------------	------------------	----------------

NOME LOCAL PLANTA: Medeolano Ervideiro/Arvore morango

NÚMERO DE PLANTAS ENCONTRADAS

Por local 8 Tamanho do local 60 m<sup>2</sup>

NÚMERO DE PLANTAS AMOSTRADAS: 1

TIPO DE AMOSTRAGEM: Vegetal (fruto e folhas; flor)

QUANTIDADE DEMATERIAL: 150-200 g de fruto; 10 g folhas

FOTOGRAFIA: sim n.º de fotos: 3 + 3 (contacto morfológica)

FORAM COLHIDAS OUTRAS AMOSTRAS DO MESMO GRUPO DE ESPÉCIES DE PLANTAS: sim não \_\_\_\_\_

ESPÉCIME DE HERBÁRIO: sim não \_\_\_\_\_

IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA COLHEITA

ESPÉCIE: *Arbutus unedo*

SUBESPÉCIE: \_\_\_\_\_

NOME DOS COLECTORES: Luísa Maria Galvão

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

NÚMERO DE COLHEITA: LG1

INSTITUIÇÃO COLECTORA: Universidade do Algarve

2020 / (2012 - Estabelecido)

PAÍS DA COLHEITA: Portugal

DISTRITO: Faro

CONCELHO: Faro

FREGUESIA: St. Barbara de Nexe

N.º DO LOCAL DE COLHEITA: \_\_\_\_\_

LOCAL DA COLHEITA: \_\_\_\_\_  
Cidade/Vila/município: \_\_\_\_\_  
distância (em Km): \_\_\_\_\_  
direção: \_\_\_\_\_

LATITUDE DO LOCAL: N 37°06'26"

LONGITUDE DO LOCAL: O 7° 56' 23,6"

ALTITUDE DO LOCAL: \_\_\_\_\_

FONTE DE COLHEITA:

1. Habitat silvestre: _____	2. Quinta: _____	3. Mercado: _____
1.1 Floresta/Bosque _____	2.1 Campo cultivado _____	3.1 Municipal _____
1.2 Matagal _____	2.2 Pomar _____	3.2 Vila _____
1.3 Prado _____	2.3 Jardim _____	3.3 Cidade _____
1.4 Habitat aquático _____	2.4 Terra de pouso _____	3.4 Comercial _____
_____	2.5 Pastagem _____	3.5 Outro _____
_____	2.6 Actividade agrícola _____	_____
4 Instituição _____	2.7 Vivia _____	5 Outra _____

ESTATUTO DA AMOSTRA:

1. Silvestre _____	2. Infante _____	3. Outro _____
--------------------	------------------	----------------

PARTE DA PLANTA UTILIZADA

1. Cule/Tronco _____	5. Casca _____	8. Semente _____
2. Ramos _____	6. Flores/Florescência _____	9. Raiz _____
3. Folha _____	7. Fruto _____	10. Seiva/Rexina/Látex _____
4. Rizoma, bolbo, tubérculo ou outros propágulos vegetativos _____	_____	_____

UTILIZAÇÃO DA PLANTA

1. Alimento _____	5. Bebida _____	9. Forragem/Pastagem _____
2. Medicinal _____	6. Fibra _____	10. Controlo _____
3. Aromática _____	7. Madeira _____	11. Ornamental _____
4. Condimento _____	8. Artesanal _____	12. Outras _____

TIPO DE AMOSTRA COLHIDA

1. vegetalivo _____	2. semente _____	3. ambos _____
---------------------	------------------	----------------

NOME LOCAL PLANTA: Medeolano Ervideiro/Arvore morango

NÚMERO DE PLANTAS ENCONTRADAS

Por local 8 Tamanho do local 60 m<sup>2</sup>

NÚMERO DE PLANTAS AMOSTRADAS: 1

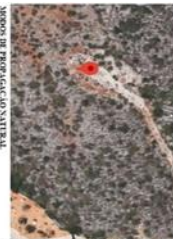
TIPO DE AMOSTRAGEM: Vegetal (fruto e folhas; flor)

QUANTIDADE DEMATERIAL: 150-200 g de fruto; 10 g folhas

FOTOGRAFIA: sim n.º de fotos: 3 + 3 (contacto morfológica)

FORAM COLHIDAS OUTRAS AMOSTRAS DO MESMO GRUPO DE ESPÉCIES DE PLANTAS: sim não \_\_\_\_\_

ESPÉCIME DE HERBÁRIO: sim não \_\_\_\_\_



1. Por semente

2. Vegetativa

3. Por semente e vegetativa

4. Apocárita

5. Por semente e vegetativa

6. Vegetativa

7. Por semente e vegetativa

8. Vegetativa

9. Por semente e vegetativa

10. Vegetativa

11. Por semente e vegetativa

12. Vegetativa

13. Por semente e vegetativa

14. Vegetativa

15. Por semente e vegetativa

16. Vegetativa



**Anexo 2: Anova para a sobrevivência em função de clones.**

Univariate Tests of Significance for ArcSen Sobrev (%) (BG_Msc_Tb_Surv.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	256116,6	1	256116,6	4359,892	0,00
clone: 101 vs 901	10109,6	1	10109,6	172,096	0,00
Error	3759,6	64	58,7		

**Anexo 3: Avaliação do desenvolvimento de micorrizas (0-4) e outros parâmetros, comparação entre clones.**

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Myc Establish (0;4) (BG_dados all.sta)		
Independent (grouping) variable: clone: 101 vs 901		
Kruskal-Wallis test: H ( 1, N= 543) =19,03481 p =,0000		
Depend.:	clone: 101 vs 901	901 R:237,98
Myc Establish (0;4)	R:293,79	
clone: 101 vs 901		0,000053
901	0,000053	

Univariate Tests of Significance for SL (mm) (BG_dados all.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	368620,0	1	368620,0	4518,859	0,000000
clone: 101 vs 901	4761,4	1	4761,4	58,369	0,000000
Error	44131,4	541	81,6		

Univariate Tests of Significance for LLR (mm) (BG_dados all.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	187511,9	1	187511,9	3748,585	0,000000
clone: 101 vs 901	5021	1	5021	10,037	0,001621
Error	270619	541	500		

Multiple Comparisons p values (2-tailed); NPR (BG_dados all.sta)		
Independent (grouping) variable: clone: 101 vs 901		
Kruskal-Wallis test: H ( 1, N= 543) =42,69699 p =,0000		
Depend.:	clone: 101 vs 901	901 R:217,70
NPR	R:306,78	
clone: 101 vs 901		0,000000
901	0,000000	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Callus (0-3) (BG_dados all.sta)		
Independent (grouping) variable: clone: 101 vs 901		
Kruskal-Wallis test: H ( 1, N= 543) =80,15469 p =0,000		
Depend.:	clone: 101 vs 901	901 R:341,82
Callus (0-3)	R:227,28	
clone: 101 vs 901		0,00
901	0,00	

**Anexo 4: Avaliação do desenvolvimento de micorrizas (0-4) e outros parâmetros, comparação entre flavonóides.**

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Myc Establish (0;4) (BG_dados a	
		Independent (grouping) variable: Flav: Q vs D	
		Kruskal-Wallis test: H ( 1, N= 543) =3,296544 p =,0694	
Depend.:	Q	D	
Myc Establish (0;4)	R:282,90	R:260,22	
Q		0,092401	
D	0,092401		

Univariate Tests of Significance for SL (mm) (BG_dados all.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	405799,1	1	405799,1	4494,530	0,000000
Flav: Q vs D	47,3	1	47,3	0,524	0,469572
Error	48845,4	541	90,3		

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Aval. Parte radicular (BG_dados all.sta)	
		Independent (grouping) variable: Flav: Q vs D	
		Kruskal-Wallis test: H ( 1, N= 543) =13,33112 p =,0003	
Depend.:	Q	D	
Aval. Parte radicular	R:253,46	R:292,03	
Q		0,004201	
D	0,004201		

Univariate Tests of Significance for LLR (mm) (BG_dados all.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	201191,3	1	201191,3	3948,882	0,000000
Flav: Q vs D	6	1	6	0,013	0,910583
Error	275634	541	509		

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Callus (0-3) (BG_dados all.sta)	
		Independent (grouping) variable: Flav: Q vs D	
		Kruskal-Wallis test: H ( 1, N= 543) =6,093129 p =,0136	
Depend.:	Q	D	
Callus (0-3)	R:257,18	R:288,01	
Q		0,022133	
D	0,022133		

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); NPR (BG_dados all.sta)	
		Independent (grouping) variable: Flav: Q vs D	
		Kruskal-Wallis test: H ( 1, N= 543) =,7447061 p =,3882	
Depend.:	Q	D	
NPR	R:277,52	R:266,03	
Q		0,394001	
D	0,394001		

**Anexo 5: Avaliação do desenvolvimento de micorrizas (0-4) e outros parâmetros, comparação entre concentrações dos flavonóides.**

Multiple Comparisons z' values; Myc Establish (0:4) (BG_dados all.sta)						
Independent (grouping) variable: Conc_µM: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 2,5 µM						
Kruskal-Wallis test: H ( 5, N= 543) =22,87509 p =,0004						
Depend.:	Conc. 0	Conc. 0.25	Conc. 0.5	Conc. 1.0	Conc. 2.0	Conc. 2.5
Myc Establish (0:4)	R:250,47	R:329,39	R:250,10	R:264,96	R:297,36	R:246,46
Conc. 0		3,372121	0,016126	0,634493	2,047118	0,175712
Conc. 0.25	3,372121		3,320898	2,705607	1,341503	3,482707
Conc. 0.5	0,016126	3,320898		0,637173	2,020698	0,156231
Conc. 1.0	0,634493	2,705607	0,637173		1,389099	0,795605
Conc. 2.0	2,047118	1,341503	2,020698	1,389099		2,182503
Conc. 2.5	0,175712	3,482707	0,156231	0,795605	2,182503	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Aval. Parte radicular (BG_dados all.sta)						
Independent (grouping) variable: Conc_µM: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 2,5 µM						
Kruskal-Wallis test: H ( 5, N= 543) =18,51374 p =,0024						
Depend.:	Conc. 0	Conc. 0.25	Conc. 0.5	Conc. 1.0	Conc. 2.0	Conc. 2.5
Aval. Parte radicular	R:224,80	R:279,92	R:282,20	R:276,75	R:280,10	R:292,77
Conc. 0		0,277758	0,183134	0,344016	0,236437	0,043806
Conc. 0.25	0,277758		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Conc. 0.5	0,183134	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
Conc. 1.0	0,344016	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
Conc. 2.0	0,236437	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
Conc. 2.5	0,043806	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Univariate Tests of Significance for LLR (mm) (BG_dados all.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2011453	1	2011453	4025,437	0,000000
Conc_µM: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 2,5 µM	7309	5	1462	2,925	0,012876
Error	268331	537	500		

Multiple Comparisons p values (2-tailed); NPR (BG_dados all.sta)						
Independent (grouping) variable: Conc_µM: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 2,5 µM						
Kruskal-Wallis test: H ( 5, N= 543) =1,351430 p =,9296						
Depend.:	Conc. 0	Conc. 0.25	Conc. 0.5	Conc. 1.0	Conc. 2.0	Conc. 2.5
NPR	R:268,06	R:275,33	R:259,23	R:279,86	R:268,28	R:281,65
Conc. 0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Conc. 0.25	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Conc. 0.5	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
Conc. 1.0	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
Conc. 2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
Conc. 2.5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Callus (0-3) (BG_dados all.sta)						
Independent (grouping) variable: Conc_µM: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 2,5 µM						
Kruskal-Wallis test: H ( 5, N= 543) =8,966140 p =,1104						
Depend.:	Conc. 0	Conc. 0.25	Conc. 0.5	Conc. 1.0	Conc. 2.0	Conc. 2.5
Callus (0-3)	R:297,76	R:258,99	R:275,68	R:240,94	R:287,11	R:268,61
Conc. 0		1,000000	1,000000	0,192972	1,000000	1,000000
Conc. 0.25	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Conc. 0.5	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
Conc. 1.0	0,192972	1,000000	1,000000		0,716699	1,000000
Conc. 2.0	1,000000	1,000000	1,000000	0,716699		1,000000
Conc. 2.5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

**Anexo 6: Valores médios do estabelecimento de micorrização, crescimento da parte aérea (SL), desenvolvimento radicular (Sistema radicular; LLR; NPR) e callus em função interação entre os diferentes fatores de teste.**

Clone x Flav x Conc (µM)			Micorrizas		SL (mm)		Sistem radicular (1-4)		LLR (mm)		NRP		Callus (0-3)	
			N	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE				
101	Q	0	29	3,17 ± 0,14 <sup>ab</sup>	25,31 ± 1,13 <sup>de</sup>	2,62 ± 0,25 <sup>b</sup>	56,20 ± 7,06 <sup>bc</sup>	5,52 ± 0,93 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,13 <sup>a</sup>					
		0,25	29	3,62 ± 0,10 <sup>a</sup>	31,58 ± 1,32 <sup>de</sup>	2,76 ± 0,19 <sup>abc</sup>	57,13 ± 6,69 <sup>bc</sup>	6,69 ± 0,84 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,07 <sup>a</sup>					
		0,5	28	3,32 ± 0,18 <sup>ab</sup>	26,53 ± 1,54 <sup>cde</sup>	2,75 ± 0,18 <sup>abc</sup>	66,73 ± 8,15 <sup>abc</sup>	3,93 ± 0,50 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,09 <sup>a</sup>					
		1	26	3,69 ± 0,09 <sup>a</sup>	27,93 ± 1,41 <sup>abcd</sup>	2,77 ± 0,16 <sup>abc</sup>	67,45 ± 7,69 <sup>abc</sup>	5,31 ± 0,95 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,06 <sup>a</sup>					
		2	28	3,46 ± 0,13 <sup>ab</sup>	32,92 ± 1,36 <sup>cde</sup>	2,86 ± 0,13 <sup>abc</sup>	52,36 ± 6,41 <sup>c</sup>	5,79 ± 0,88 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,09 <sup>a</sup>					
		2,5	27	2,81 ± 0,13 <sup>b</sup>	35,66 ± 1,93 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,16 <sup>c</sup>	62,31 ± 5,45 <sup>bc</sup>	3,63 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,12 <sup>a</sup>					
	D	0	29	3,17 ± 0,14 <sup>ab</sup>	25,31 ± 1,13 <sup>de</sup>	2,62 ± 0,25 <sup>b</sup>	56,20 ± 7,06 <sup>bc</sup>	5,52 ± 0,93 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,13 <sup>a</sup>					
		0,25	27	3,52 ± 0,15 <sup>a</sup>	33,83 ± 1,70 <sup>ab</sup>	3,04 ± 0,11 <sup>abc</sup>	58,65 ± 5,64 <sup>bc</sup>	3,04 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,12 <sup>a</sup>					
		0,5	27	3,00 ± 0,15 <sup>ab</sup>	32,21 ± 1,65 <sup>abcd</sup>	3,30 ± 0,16 <sup>a</sup>	84,34 ± 8,50 <sup>a</sup>	5,19 ± 0,76 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,10 <sup>a</sup>					
		1	28	3,07 ± 0,15 <sup>ab</sup>	21,03 ± 0,79 <sup>bcde</sup>	2,96 ± 0,28 <sup>abc</sup>	66,60 ± 15,10 <sup>abc</sup>	4,61 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,16 <sup>a</sup>					
		2	26	3,58 ± 0,10 <sup>a</sup>	31,58 ± 1,57 <sup>abcd</sup>	3,27 ± 0,16 <sup>a</sup>	62,27 ± 6,72 <sup>bc</sup>	4,85 ± 1,08 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,14 <sup>a</sup>					
		2,5	27	3,37 ± 0,11 <sup>ab</sup>	33,82 ± 2,45 <sup>ab</sup>	3,22 ± 0,12 <sup>ac</sup>	71,69 ± 6,07 <sup>ab</sup>	6,19 ± 1,09 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,10 <sup>a</sup>					
	901	Q	0	20	2,90 ± 0,22 <sup>a</sup>	20,37 ± 1,12 <sup>bc</sup>	2,90 ± 0,14 <sup>a</sup>	61,95 ± 11,83 <sup>ab</sup>	3,05 ± 0,67 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,25 <sup>a</sup>				
			0,25	12	3,58 ± 0,15 <sup>a</sup>	26,12 ± 2,05 <sup>abc</sup>	3,08 ± 0,11 <sup>a</sup>	67,53 ± 10,82 <sup>ab</sup>	2,17 ± 0,47 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,38 <sup>a</sup>				
0,5			16	2,88 ± 0,27 <sup>a</sup>	27,11 ± 2,16 <sup>ab</sup>	2,94 ± 0,15 <sup>a</sup>	48,14 ± 4,96 <sup>bc</sup>	2,94 ± 0,43 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,28 <sup>a</sup>					
1			22	2,95 ± 0,26 <sup>a</sup>	27,67 ± 3,10 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,17 <sup>a</sup>	63,44 ± 4,11 <sup>ab</sup>	3,09 ± 0,55 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,17 <sup>a</sup>					
2			23	3,26 ± 0,17 <sup>a</sup>	19,48 ± 1,33 <sup>c</sup>	2,91 ± 0,20 <sup>a</sup>	55,21 ± 9,39 <sup>abc</sup>	3,00 ± 0,56 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,24 <sup>a</sup>					
2,5			22	2,82 ± 0,20 <sup>a</sup>	26,52 ± 2,11 <sup>ab</sup>	3,18 ± 0,13 <sup>a</sup>	72,98 ± 6,06 <sup>a</sup>	4,09 ± 0,67 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,16 <sup>a</sup>					
D		0	20	2,90 ± 0,22 <sup>a</sup>	20,37 ± 1,12 <sup>bc</sup>	2,90 ± 0,14 <sup>a</sup>	61,946 ± 11,83 <sup>ab</sup>	3,05 ± 0,67 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,25 <sup>a</sup>					
		0,25	15	3,07 ± 0,25 <sup>a</sup>	24,98 ± 2,85 <sup>abc</sup>	3,13 ± 0,11 <sup>a</sup>	65,222 ± 7,30 <sup>ab</sup>	3,47 ± 0,95 <sup>a</sup>	1,63 ± 0,27 <sup>a</sup>					
		0,5	19	2,47 ± 0,33 <sup>a</sup>	27,28 ± 2,04 <sup>a</sup>	2,89 ± 0,19 <sup>a</sup>	48,961 ± 6,39 <sup>bc</sup>	1,79 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,27 <sup>a</sup>					
		1	15	2,00 ± 0,32 <sup>b</sup>	22,36 ± 1,73 <sup>abc</sup>	2,93 ± 0,23 <sup>a</sup>	32,984 ± 4,14 <sup>c</sup>	3,60 ± 0,89 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,12 <sup>a</sup>					
		2	13	2,38 ± 0,37 <sup>a</sup>	19,67 ± 1,94 <sup>c</sup>	2,69 ± 0,18 <sup>a</sup>	46,528 ± 6,39 <sup>bc</sup>	2,77 ± 0,78 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,35 <sup>a</sup>					
		2,5	15	3,33 ± 0,19 <sup>a</sup>	22,10 ± 1,78 <sup>abc</sup>	3,13 ± 0,20 <sup>a</sup>	51,337 ± 5,95 <sup>abc</sup>	3,60 ± 0,80 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,29 <sup>a</sup>					
Total Geral			543	3,15 ± 0,04	27,37 ± 0,41	2,93 ± 0,17	60,91 ± 7,32	4,27 ± 0,17	0,657 ± 0,04					

Notas: Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas, P < 0,05 (Teste de Tukey). SL – comprimento dos rebentos; Sistema radicular – desenvolvimento das raízes; LLR – comprimento da maior raiz; NPR – nº de raízes principais. São indicados os valores relativos a cada parâmetro avaliado (média ± SE)

Anexo 7: Interação entre todos os fatores: clone, flavonóide e concentração.

a) clone 101

Multiple Comparisons p values (2-tailed): Myc Establish (0-4) (BG_dados all_101.sta) Independent (grouping) variable: Flav x Conc µM Kruskal-Wallis test: H ( 11, N= 331 )=45,29669 p =,0000													
Depend:		QxConc. 0	QxConc. 0.25	QxConc. 0.5	QxConc. 1.0	QxConc. 2.0	QxConc. 2.5	DxConc. 0.25	DxConc. 0.5	DxConc. 1.0	DxConc. 2.0	DxConc. 2.5	DxConc. 0
Myc Establish (0-4)		R:147,36	R:202,83	R:175,39	R:211,27	R:184,52	R:102,74	R:197,22	R:127,72	R:137,86	R:194,31	R:166,19	R:147,36
QxConc. 0		1,000000	1,000000	0,885175	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 0.25	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,006070	1,000000	0,220346	0,685881	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 0.5	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,322209	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 1.0	0,885175	1,000000	1,000000		1,000000	0,002421	1,000000	0,098084	0,320209	1,000000	1,000000	0,885175	1,000000
QxConc. 2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,101215	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 2.5	1,000000	0,006070	0,322209	0,002421	0,101215		1,000000	0,018875	1,000000	0,032800	0,980285	1,000000	1,000000
DxConc. 0.25	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,101215	1,000000		0,502932	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 0.5	1,000000	0,220346	1,000000	0,098084	1,000000	1,000000	1,000000	0,502932		1,000000	0,747861	1,000000	1,000000
DxConc. 1.0	1,000000	0,685881	1,000000	0,320209	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,032800	1,000000	0,747861	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
DxConc. 2.5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,980285	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
DxConc. 0	1,000000	1,000000	1,000000	0,885179	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

Multiple Comparisons p values (2-tailed): Aval Sist Rad (BG_dados all_101.sta) Independent (grouping) variable: Flav x Conc µM Kruskal-Wallis test: H ( 11, N= 331 )=65,92191 p =,0000													
Depend:		QxConc. 0	QxConc. 0.25	QxConc. 0.5	QxConc. 1.0	QxConc. 2.0	QxConc. 2.5	DxConc. 0.25	DxConc. 0.5	DxConc. 1.0	DxConc. 2.0	DxConc. 2.5	DxConc. 0
Aval Sist Rad		R:125,78	R:146,93	R:145,63	R:149,12	R:162,21	R:128,31	R:187,72	R:222,46	R:175,68	R:218,90	R:212,72	R:125,78
QxConc. 0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,010434	1,000000	0,020743	0,044900	1,000000
QxConc. 0.25	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,208796	1,000000	0,353596	0,669732	1,000000
QxConc. 0.5	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,192184	1,000000	0,325342	0,616154	1,000000
QxConc. 1.0	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,348427	1,000000	0,564473	1,000000	1,000000
QxConc. 2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 2.5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,019837	1,000000	0,037663	0,078663	1,000000	1,000000
DxConc. 0.25	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 0.5	0,010434	0,208796	0,192184	0,348427	1,000000	0,019837	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,010434	1,000000
DxConc. 1.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 2.0	0,020743	0,353596	0,325342	0,564473	1,000000	0,037663	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,020743	1,000000
DxConc. 2.5	0,044900	0,669732	0,616154	1,000000	1,000000	0,078663	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,044900
DxConc. 0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,010434	1,000000	0,020743	0,044900	1,000000	1,000000

Multiple Comparisons p values (2-tailed): NPR (BG_dados all_101.sta) Independent (grouping) variable: Flav x Conc µM Kruskal-Wallis test: H ( 11, N= 331 )=20,38660 p =,0403													
Depend:		QxConc. 0	QxConc. 0.25	QxConc. 0.5	QxConc. 1.0	QxConc. 2.0	QxConc. 2.5	DxConc. 0.25	DxConc. 0.5	DxConc. 1.0	DxConc. 2.0	DxConc. 2.5	DxConc. 0
NPR		R:168,31	R:210,16	R:148,23	R:173,42	R:188,11	R:130,74	R:123,00	R:177,06	R:166,89	R:149,27	R:184,35	R:168,31
QxConc. 0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 0.25	1,000000		0,963185	1,000000	1,000000	1,000000	0,126399	0,043580	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 0.5	1,000000	0,963185		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 1.0	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,769254	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 2.5	1,000000	0,126399	0,043580	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 0.25	1,000000	0,963185	1,000000	1,000000	1,000000	0,769254	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 0.5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 1.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
DxConc. 2.5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
DxConc. 0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

Multiple Comparisons p values (2-tailed): Callus (0-3) (BG_dados all_101.sta) Independent (grouping) variable: Flav x Conc µM Kruskal-Wallis test: H ( 11, N= 331 )=25,97537 p =,0065													
Depend:		QxConc. 0	QxConc. 0.25	QxConc. 0.5	QxConc. 1.0	QxConc. 2.0	QxConc. 2.5	DxConc. 0.25	DxConc. 0.5	DxConc. 1.0	DxConc. 2.0	DxConc. 2.5	DxConc. 0
Callus (0-3)		R:177,10	R:130,71	R:143,70	R:126,75	R:165,57	R:186,41	R:153,67	R:171,96	R:181,95	R:210,98	R:167,54	R:177,10
QxConc. 0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 0.25	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,125207	1,000000	1,000000
QxConc. 0.5	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,649051	1,000000	1,000000
QxConc. 1.0	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,099376	1,000000	1,000000
QxConc. 2.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
QxConc. 2.5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 0.25	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 0.5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 1.0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
DxConc. 2.0	1,000000	0,125207	0,649051	0,099376	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
DxConc. 2.5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
DxConc. 0	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

Univariate Tests of Significance for SL (mm) (BG_dados all_101.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	293710,0	1	293710,0	4504,111	0,000000
Flav x Conc µM	6115,9	11	556,0	8,526	0,000000
Error	20801,8	319	65,2		

Univariate Tests of Significance for LLR (mm) (BG_dados all_101.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	133255,0	1	133255,0	3097,531	0,000000
Flav x Conc µM	2296,0	11	208,7	4,852	0,000001
Error	137233,0	319	430		

b) Clone 901

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Myc Establish (0-4) (BG_dados all_901.sta)												
Independent (grouping) variable: Flav x Conc µM												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 212) =22.79758 p =.0189												
Depend.:	QxConc. 0	QxConc. 0.25	QxConc. 0.5	QxConc. 1.0	QxConc. 2.0	QxConc. 2.5	DxConc. 0.25	DxConc. 0.5	DxConc. 1.0	DxConc. 2.0	DxConc. 2.5	DxConc. 0
Myc Establish (0-4)	R:104,20	R:145,13	R:105,13	R:114,23	R:125,39	R:99,205	R:114,57	R:90,974	R:62,933	R:83,385	R:128,80	R:104,20
QxConc. 0		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 0.25	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	0,035716	0,787467	1,00000C	1,00000C
QxConc. 0.5	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 1.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	0,826154	1,00000C	1,00000C
QxConc. 2.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	0,142284	1,00000C	1,00000C
QxConc. 2.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 0.25	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 0.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 1.0	1,00000C	0,035716	1,00000C	0,826154	0,142284	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	0,216233	1,00000C
DxConc. 2.0	1,00000C	0,787467	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C
DxConc. 2.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	0,216233	1,00000C		1,00000C
DxConc. 0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Aval Sist Rad (BG_dados all_901.sta)												
Independent (grouping) variable: Flav x Conc µM												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 212) =18,12458 p =.0787												
Depend.:	QxConc. 0	QxConc. 0.25	QxConc. 0.5	QxConc. 1.0	QxConc. 2.0	QxConc. 2.5	DxConc. 0.25	DxConc. 0.5	DxConc. 1.0	DxConc. 2.0	DxConc. 2.5	DxConc. 0
Aval Sist Rad	R:97,600	R:114,79	R:101,09	R:123,93	R:98,783	R:124,70	R:119,47	R:97,053	R:100,67	R:78,077	R:119,43	R:97,600
QxConc. 0		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 0.25	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 0.5	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 1.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 2.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 2.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 0.25	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 0.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 1.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 2.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C
DxConc. 2.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C
DxConc. 0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); NPR (BG_dados all_901.sta)												
Independent (grouping) variable: Flav x Conc µM												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 212) =11,43276 p =.4078												
Depend.:	QxConc. 0	QxConc. 0.25	QxConc. 0.5	QxConc. 1.0	QxConc. 2.0	QxConc. 2.5	DxConc. 0.25	DxConc. 0.5	DxConc. 1.0	DxConc. 2.0	DxConc. 2.5	DxConc. 0
NPR	R:104,10	R:85,958	R:117,25	R:109,68	R:103,59	R:130,70	R:108,20	R:80,658	R:111,90	R:90,462	R:121,70	R:104,10
QxConc. 0		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 0.25	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 0.5	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 1.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 2.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 2.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	0,606408	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 0.25	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 0.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	0,606408	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 1.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 2.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C
DxConc. 2.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C
DxConc. 0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Callus (0-3) (BG_dados all_901.sta)												
Independent (grouping) variable: Flav x Conc µM												
Kruskal-Wallis test: H (11, N= 212) =22,07975 p =.0238												
Depend.:	QxConc. 0	QxConc. 0.25	QxConc. 0.5	QxConc. 1.0	QxConc. 2.0	QxConc. 2.5	DxConc. 0.25	DxConc. 0.5	DxConc. 1.0	DxConc. 2.0	DxConc. 2.5	DxConc. 0
Callus (0-3)	R:119,53	R:128,67	R:112,19	R:80,409	R:93,087	R:82,795	R:137,13	R:125,87	R:80,433	R:119,92	R:100,83	R:119,53
QxConc. 0		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 0.25	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 0.5	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 1.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 2.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
QxConc. 2.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	0,379647	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 0.25	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	0,379647	1,00000C	0,538520	1,00000C	0,749991	1,00000C	1,00000C
DxConc. 0.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C
DxConc. 1.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	0,749991	1,00000C		1,00000C	1,00000C
DxConc. 2.0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C		1,00000C
DxConc. 2.5	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	
DxConc. 0	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	1,00000C	

Univariate Tests of Significance for SL (mm) (BG_dados all_901.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	113660,3	1	113660,3	1511,709	0,000000
Flav x Conc µM	2176,4	11	197,9	2,632	0,003684
Error	15037,3	200	75,2		

Univariate Tests of Significance for LLR (mm) (BG_dados all_901.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	644256,1	1	644256,1	1473,294	0,000000
Flav x Conc µM	22968,3	11	2088,0	4,775	0,000002
Error	87457,9	200	437,3		

**Anexo 8: Regressão múltipla e Análise de componentes principais.**

Summary Statistics; DV: Myc Establish (0;4) (BG_dados all.sta)	
Statistic	Value
Multiple R	0,56004
Multiple R <sup>2</sup>	0,31364
Adjusted R <sup>2</sup>	0,30205
F(9,533)	27,06261
p	0,00000
Std.Err. of Estimate	0,76923

Factor Loadings (Unrotated) (BG_dados all.sta) Extraction: Principal components (Marked loadings are >,700000)			
Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3
clone: 101 vs 901	0,626846	-0,471580	0,055239
Flav: Q vs D	0,080077	-0,273526	-0,106571
Conc. µM: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 2,5 µM	-0,069431	-0,381264	-0,583930
SL (mm)	-0,690835	-0,225258	-0,045666
LLR (mm)	-0,484442	-0,379423	0,448352
Aval. Parte radicular	-0,330048	-0,691847	-0,204578
Av. Parte aérea coloração	-0,646449	0,231256	0,315922
NPR	-0,263905	0,405347	-0,626154
Callus (0-3)	0,611892	-0,178289	0,148998
Myc Establish (0;4)	-0,698899	-0,127106	0,000989
Expl.Var	2,575452	1,381650	1,114417
Prp.Totl	0,257545	0,138165	0,111442

Eigenvalues (BG_dados all.sta) Extraction: Principal components				
Value	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %
1	2,575452	25,75452	2,575452	25,75452
2	1,381650	13,81650	3,957102	39,57102
3	1,114417	11,14417	5,071519	50,71519

Anexo 9:Requerimento para inscrição no Registo Nacional de Materiais de Base

**REQUERIMENTO**  
**Inscrição no Registo Nacional de Materiais de Base**

(Decreto-lei n.º 205/2003, de 12 de setembro, alterado e republicado pelo decreto-lei n.º 13/2018, de 21 de janeiro)

Proprietário  X ..... Proponente /Gestor  ..... (1)  
 Nome: Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra; Filomena Gomes .....  
 Domicílio / Sede: Escola Superior Agrária, Bencanta, Apartado 7036, 3045-601 Coimbra.  
 ..... 3045 601 Coimbra .....  
 Contato ...Presidência / ESAC e Respe Filomena Gomes Tel: 239.802.940 / 285 Tlm: 982650955  
 E-mail ...presidencia@esac.pt; fgomes@esac.pt.

---

Propõe para inscrição no RNMB, o material de base da espécie:

Anexo I Parte A do D.L. n.º 205/2003\*  ..... (3)  
 Anexo I Parte B do D.L. n.º 205/2003\*  Pinheiro-bravo  Pinheiro-manso  Sobreiro  Eucalipto   
 Outros  Espécie...Arbutus unedo (L.)..... (4)

na Categoria de: Fonte Identificada  Seleccionada  Qualificada  Testada  ..... (5)

Objetivo: Produção de semente na categoria de qualificada, proveniente do cruzamento entre clones seleccionados e pela produção e qualidade de fruto e posteriormente micropropagados (6)

---

Área: 2400 m<sup>2</sup> ..... Local ... Escola Superior Agrária, Bencanta... (7)  
 Freguesia: São Martinho do Bispo ..... Concelho: ... Coimbra ..... Distrito: Coimbra.....

Obrigatório juntar os seguintes elementos:

<input checked="" type="checkbox"/> Declaração/autorização do proprietário	(8)
<input checked="" type="checkbox"/> Titularidade	(10)
<input checked="" type="checkbox"/> Cartografia	(11)
<input checked="" type="checkbox"/> Shapefile	(12)

..... (8)

Reservado aos Serviços

**Anotações:**  
 (1) Nome ou denominação de firma.  
 (2) Técnico responsável ou representante.  
 (3) MFR constantes do anexo I ao D.L. n.º 205/2003.  
 (4) MFR não constantes do anexo I ao D.L. n.º 205/2003.  
 (5) Indicar o tipo de categoria do MFR.  
 (6) Indicar o objetivo da inscrição no RNMB.  
 (7) Designação da propriedade.  
 (8) Local, data e assinatura ou carimbo da firma.  
 (9) Se o requerente não for o proprietário.  
 (10) Cópia do título de registo da propriedade.  
 (11) Localização em carta militar de Portugal, à escala 1:25.000:  
 N.º de folha, orientação e área (ha) de parcela a inscrever,  
 altitude média, latitude e longitude (ao Meridiano de Greenwich).  
 (12) Ficheiro – Shapefile da parcela a inscrever.

\* Decreto-lei n.º 205/2003, de 12 de setembro, alterado e republicado pelo decreto-lei n.º 13/2018, de 21 de janeiro

Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas, I. P.  
 Avenida da República, 16 1050-101 LISBOA, PORTUGAL

TEL + 351 213621900  
 E-MAIL: icnf@icnf.pt <http://www.icnf.pt>



## Anexo 10: C55\_1.1\_Ofício ICNF



Serviços Centrais  
Avenida da República, 16  
1050-191 LISBOA



30038975

À Escola Superior Agrária de Coimbra  
a/c Prof. Filomena Gomes  
fgomes@esac.pt

www.icnf.pt | rubus.icnf.pt  
gdp.urde@icnf.pt  
213507900

<b>vossa referência</b> <i>your reference</i>	<b>nossa referência</b> <i>our reference</i>	<b>nosso processo</b> <i>our process</i>	<b>Data</b> <i>date</i>
	S-043537/2021	P-036005/2021	2021-10-28
<b>Assunto</b> <i>subject</i>	Inscrição de pomar de sementes de Arbutus unedo no RNMB- ESAC		

Relativamente à candidatura para inscrição de material de base no Registo Nacional de Materiais de Base (RNMB):

Proponente: ESAC

Material de Base: Pomar de sementes

Produção de MFR da categoria: Qualificada

Espécie: *Arbutus unedo*

Informa-se que, nos termos do n.º 2 do artigo 10.º e do Anexo IV do Decreto-Lei n.º 205/2003, de 12 de setembro, alterado e republicado pelo Decreto-Lei n.º 13/2019, de 21 de janeiro, foi inscrito com o código **ARBUC001**.

Mais se informa que a inscrição tem uma taxa de 1 030,35 €, cuja fatura segue em anexo.

Só após pagamento integral da mesma a inscrição tem validade.

Mais se informa que a comercialização de MFR só pode ser realizada por fornecedor registado, pelo que se a ESAC vai comercializar MFR deste pomar terá de se registar como produtor e fornecedor de MFR, junto do ICNF, I.P., instruções em:

<http://www2.icnf.pt/portal/florestas/pt/ps/ps-mfr/resource/doc/folhetos-mfr/folheto-mb.pdf>

Com os melhores cumprimentos,

A Chefe de D

Assinado por: **DINA MARIA DA SILVA SANTOS RIBEIRO**  
Num. de identificação: 808294323  
Data: 2021.11.24 13:48:08:0000



Dina Ribeiro

Documento processado por computador, n.º S-043537/2021