

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM

Estudo da quebra de dormência em sementes de piorno
[Genista tenera (Jacq. Ex Murr.) O. Kuntze]

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre
em Produção de Plantas Medicinais e para Fins Industriais

Margarida Teresa
Rodrigues Lopes D'Avó

Coorientador:

José António Grego

Orientadora:

Maria de Fátima Quedas

Santarém

2013

Dedico este trabalho ao meu marido Rui
e aos meus filhos, Beatriz e Francisco.

À memória da Professora Natália Gaspar,
pelos ensinamentos e pela amizade.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior Agrária de Santarém, ao Instituto Superior de Agronomia e à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pelos meios disponibilizados.

Aos Professores Maria de Fátima Quedas e José António Grego, pela disponibilidade, dedicação e orientação pedagógica.

À Técnica Superior Maria de Fátima Lopes, da Escola Superior Agrária de Santarém, pela amizade, dedicação e apoio.

Ao meu marido, aos meus pais e aos meus sogros, por todo o apoio e colaboração.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

Estudo da quebra de dormência em sementes de piorno

[*Genista tenera* (Jacq. Ex Murr.) O. Kuntze]

RESUMO

O Piorno [*Genista tenera* (Jacq. ex Murr.) O. Kuntze] é uma planta endêmica da Ilha da Madeira. Estudos bioquímicos sobre a sua composição têm mostrado que é rico em compostos flavonóides e alcalóides. Para além dos seus efeitos antidiabéticos, também têm sido efetuados estudos epidemiológicos no domínio oncológico, das doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e de Parkinson. O uso tradicional do piorno e a sua investigação científica como planta medicinal exigem, cada vez mais, novos estudos, designadamente, os que se relacionam com o conhecimento dos seus mecanismos de propagação, tendo em conta a possível utilização comercial da planta e a sua produção em sistemas agrícolas extensivos. Tratando-se de uma planta com sementes de tegumento duro, uma das vias para a quebra da dormência física passa pela digestão do tegumento com ácido sulfúrico. O estudo usou três tempos de exposição ao ácido, de 10, 20 e 40 minutos e uma amostra de controlo, sem digestão ácida. Os resultados revelaram que a escarificação ácida das sementes teve um efeito estatisticamente significativo sobre a sua germinação. No entanto, a percentagem de germinação obtida nas amostras tratadas com ácido (abaixo dos 40%) não traduziu uma aplicação agronomicamente interessante, emergindo a necessidade de aprofundar esta técnica e de estudar outros tipos de tratamentos de pré-germinação das sementes.

PALAVRAS-CHAVE:

Genista tenera, propagação, dormência, escarificação, germinação.

Study of breaking seed dormancy in Piorno

[*Genista tenera* (Jacq. Ex Murr.) O. Kuntze]

ABSTRACT

The piorno [*Genista tenera* (Jacq. ex Murr.) O. Kuntze] is an endemic plant of Madeira Island. Biochemical studies about its composition have shown that it is rich on flavonoids and alkaloids compounds. Beyond its antidiabetic effects, they have been included in epidemiological studies on cancer and cardiovascular diseases and also on some neurodegenerative diseases, such as the Alzheimer's and Parkinson's diseases. The traditional use and scientific research of piorno, as medicinal plant, requires new studies, such as who care with the knowledge about its propagation mechanisms, concerning with the commercial utilization of the plant and with its production on extensive agricultural systems. The piorno is a plant with hard tegument seeds; so, a path to breaking the seeds dormancy passes through the tegument digestion with sulphuric acid. The study used three exposure times to the acid, of 10, 20 and 40 minutes and a control sample, without acid digestion. This study has shown that acid scarification of seeds had a statistically significant effect on their germination. However, the germination percentage in the samples treated with acid (below 40%) does not reflected an interesting agronomical application; emerging the need to further the study of this method and of other types of pre-germination treatments of seeds.

KEYWORDS:

Genista tenera, propagation, dormancy, scarification, germination.

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
1. Interesse medicinal da <i>G. tenera</i>	9
2. Caracterização taxonómica do género <i>Genista</i> L.....	15
3. Caracterização morfológica do género <i>Genista</i> L.	19
3.1. Morfologia da espécie <i>G. tenera</i>	21
4. Propagação seminal da <i>G. tenera</i>	23
4.1. Estrutura das sementes	27
4.2. Dormência das sementes.....	29
4.3. Sementes de tegumento duro	32
4.4. Tratamentos de quebra de dormência	35
4.5. Estudos de propagação de espécies do género <i>Genista</i> L.	43
CAPÍTULO II – METODOLOGIA DA INVESTIGAÇÃO	49
1. Ensaios de germinação	51
2. Análise estatística de resultados	57
CAPÍTULO III – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	59
CONCLUSÕES E SUGESTÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta adulta de <i>G. tenera</i>	22
Figura 2. Aspeto da flor e da vagem de <i>G. tenera</i>	22
Figura 3. Aspeto visível do lote de sementes de <i>G. tenera</i>	52
Figura 4. Dimensão das sementes de <i>G. tenera</i>	52
Figura 5. Distribuição de sementes de <i>G. tenera</i> em placa de Petri com fundo humedecido	55
Figura 6. Eclosão da radícula na semente de <i>G. tenera</i>	56
Figura 7. Semente de <i>G. tenera</i> com radícula germinada há dois dias.....	56
Figura 8. Evolução das taxas de germinação nas quatro amostras ensaiadas.....	61
Figura 9. Diagrama de extremos e quartis das quatro amostras ensaiadas	67

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Taxas de germinação de sementes de espécies do género <i>Genista</i> L., após diferentes tratamentos da semente	45
Quadro 2. Taxas de sementes atacadas por fungos nas amostras ensaiadas	65

ANEXOS

Anexo I – Revisão bibliográfica da caracterização taxonómica do género <i>Genista</i> L.	83
Anexo II – Dados obtidos nos ensaios, expressos em sementes germinadas	87
Anexo III – Dados obtidos nos ensaios, expressos em taxas de germinação	88

LISTA DE ABREVIATURAS

CID – Collision-induced dissociation (Dissociação por colisão induzida)

DAD – Diode-array detection

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ESI-MS – Electrospray ionization mass spectrometry

GC-MS – Gas chromatography – mass spectrometry (Cromatografia gasosa – Espetrom. massa)

LC – Liquid Chromatography (Cromatografia líquida)

LSIMS – Liquid secondary ion mass spectrometry (Espetrometria de massa de iões secundários)

MS/MS – Tandem mass spectrometry (Espetrometria de massa tandem)

RMN – Nuclear magnetic resonance (Ressonância magnética nuclear)

UV – Ultraviolet (Ultra violeta)

*“Que o teu alimento seja teu remédio
e o teu remédio seja o teu alimento”*

(Hipócrates)

INTRODUÇÃO

No presente capítulo delineamos as linhas gerais do projeto de investigação. Apresentamos uma breve caracterização botânica e fitofarmacológica do género *Genista* L. e da espécie *Genista tenera*, objeto do nosso estudo. Apresentamos, seguidamente, a linha metodológica aplicada no ensaio de germinação de sementes desta espécie, bem como o plano estrutural da dissertação.

O presente trabalho reporta a investigação de uma espécie vegetal endémica da ilha da Madeira – o piorno-da-Madeira [*Genista tenera* (Jacq. ex Murr.) O. Kuntze]. O piorno-da-Madeira é uma espécie classificada no género *Genista* L., na subfamília Papilionoideae e família Fabaceae. É um arbusto de folhagem escassa, acetinado-pubescente e esbranquiçada, que pode atingir 2,5m de altura, de ramos frágeis e arqueados, com folhas simples e muito pequenas, flores amarelas, por vezes avermelhadas.

A planta ocorre em escarpas rochosas do litoral da Ilha da Madeira, desde os 50 até aos 1500 m de altitude (Vieira, 1992) e tem sido utilizada, desde há muito, pelas populações locais, como adjuvante no tratamento da diabetes.

Estudos bioquímicos da composição da planta confirmam que esta é rica em compostos alcalóides e flavonóides (Borges *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2005; Rauter *et al.*, 2005, 2007, 2009 e 2010) considerados marcadores quimiotaxonómicos do género *Genista* (Harborne, 1994). Estes compostos, para além dos estudos biofitofarmacológicos realizados ao nível das células beta do pâncreas (efeito antidiabético), têm sido, igualmente, objeto de estudos epidemiológicos do foro cancerígeno e das doenças cardiovasculares (Mariappan *et al.*, 2006), bem como de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Kaur & Geetha, 2006).

Não sendo uma das espécies endémicas que corre riscos de extinção, a *G. tenera* não se encontra protegida ao abrigo da diretiva habitats¹ (Jardim &

¹ Diretiva 92/43/CEE, de 21 de Maio, relativa à preservação dos habitats naturais, da fauna e da flora selvagens

Francisco, 2000). Considera-se, no entanto, que o interesse que começa a suscitar como espécie de uso medicinal, tendo em vista a sua utilização no domínio da fitofarmacologia e da medicina tradicional, poderá conduzir ao crescente interesse agronómico da propagação e produção de plantas desta espécie; neste sentido, integra a listagem de 58 espécies locais a propagar, constante no Plano de Recuperação do Parque Ecológico do Funchal 2010-20.

Compreendendo os riscos de sustentabilidade a que a espécie estaria sujeita, caso se generalizasse a sua colheita massiva no campo, o nosso estudo pretendeu contribuir, precisamente, para consolidação do conhecimento sobre os mecanismos de propagação desta espécie, fase primordial para o estabelecimento de um sistema de produção técnico-economicamente viável.

Em muitas espécies de plantas, e também nas da família Fabaceae e do género *Genista* L., a propagação poderá fazer-se por via vegetativa ou seminal. De acordo com McDonald (1990), de um modo geral, a propagação seminal apresenta diversas vantagens no capítulo técnico-económico, afigurando-se-nos como a melhor opção para a propagação da espécie *G. tenera*.

O projeto de investigação que nos propusemos desenvolver teve como objeto a germinação de sementes de *G. tenera*, integrando-se, no entanto, num projeto de investigação de âmbito fitofarmacológico mais alargado – “*Novos agentes antidiabéticos a partir de Genista tenera - Isolamento, caracterização estrutural, síntese e mecanismos de ação*” – desenvolvido em parceria pelo Departamento de Química e Bioquímica / Centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e pela Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Santarém.

As sementes de *G. tenera*, como acontece em muitas espécies da família Fabaceae, possuem tegumento duro (McDonald, 1990; Rolston, 1978), o que dificulta a absorção da água, o acesso de oxigênio ao embrião e a emergência da radícula, tendo como consequência uma germinação mais lenta e irregular das sementes. A dureza do tegumento configura-se, então, como uma forma de dormência física das sementes (McDonald, 1990).

São várias as técnicas que podem ser utilizadas para quebrar a dormência de sementes duras, designadamente: a escarificação mecânica, a imersão em água quente, a escarificação ácida e a estratificação quente e húmida. Gonzalez-Andrés & Ortiz (1996) estudaram os mecanismos de germinação para várias espécies do género *Genista* L., incluindo a espécie em estudo, designadamente, quanto à eficácia da escarificação da semente com ácido sulfúrico concentrado (95-97%) e quanto à influência do tempo de exposição ao ácido nas taxas de germinação. Atendendo ao sucesso germinativo obtido em plantas da mesma espécie, delineámos o nosso ensaio com base na metodologia proposta por estes autores.

Estabelecemos como principal objetivo operativo do presente estudo, a determinação das taxas de germinação de sementes de *G. tenera*, distribuídas em quatro amostras aleatórias de dimensões semelhantes, uma utilizada como testemunha, as restantes previamente tratadas com diferentes tempos de exposição ao ácido, concretamente, de 10, 20 e 40 minutos. Pretendeu-se, assim, avaliar a resposta germinativa das sementes tratadas à redução da espessura do tegumento produzida por efeito da digestão ácida.

A presente dissertação estrutura-se em três capítulos.

No capítulo 1 – “Revisão bibliográfica” – apresentam-se cinco linhas de pesquisa bibliográfica de suporte ao projeto de investigação: (1) o interesse fitofarmacológico de compostos ativos da espécie *G. tenera*; (2) a revisão taxonómica e morfológica do género *Genista* L. e da espécie *G. tenera*; (3) os mecanismos de dormência identificados nas sementes de tegumento duro, (4) as técnicas de tratamento de sementes de tegumento duro, a realizar antes da sementeira e (5) os resultados obtidos em estudos de germinação congéneres de plantas do género *Genista* L.

No capítulo 2 – “Metodologia da investigação” – apresentam-se os materiais e a metodologia aplicada neste estudo, incluindo os processos de tratamento estatístico de dados recolhidos.

No capítulo 3 – “Apresentação e discussão de resultados” – apresentam-se os resultados obtidos no ensaio, fazendo-se a sua interpretação e discussão, com base em observações registadas, em processos de inferência estatística e na sua comparação com resultados obtidos em estudos referenciados.

A dissertação termina com a apresentação de conclusões sobre o estudo e das suas implicações para o conhecimento agronómico sobre a propagação seminal da espécie. Seguem-se as referências bibliográficas e webgráficas pesquisadas para a elaboração da dissertação e anexos ao corpo da dissertação.

Capítulo I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No presente capítulo apresentamos a pesquisa bibliográfica que realizámos para enquadrar o estudo, organizada em quatro pontos: (1) O interesse medicinal da espécie *G. tenera*; (2) Caracterização taxonómica do género *Genista* L.; (3) Caracterização morfológica do género *Genista* L.; (3.1.) Morfologia da espécie *G. tenera* e (4) Propagação seminal da espécie *G. tenera*, abordada nos seguintes subpontos: (4.1.) Estrutura das sementes; (4.2.) Dormência das sementes; (4.3.) Sementes de tegumento duro; (4.4.) Tratamentos de quebra de dormência e (4.5) Estudos de propagação de espécies do género *Genista* L.

1. Interesse medicinal da *G. tenera*

O piorno da Madeira [*Genista tenera* (Jacq. ex Murr.) O. Kuntze] é uma espécie autóctone da Ilha da Madeira com uso tradicional na medicina popular, sobretudo no controlo da diabetes (Rauter *et al.*, 2009); utilizando-se a infusão das suas partes aéreas como coadjuvante no tratamento desta doença (Rauter *et al.*, 2005). Atendendo aos efeitos positivos empiricamente comprovados, terá surgido a necessidade de estudar cientificamente a ação fitofarmacológica correspondente.

O departamento de Química e Bioquímica / Centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e instituições parceiras, designadamente a Escola Superior Agrária de Santarém, têm efetuado vários estudos fitoquímicos e de bioatividade sobre a *G. tenera*, designadamente, sobre a presença e ação de alcalóides e de flavonóides, constituintes reconhecidos pela ação no controlo da diabetes (Martins *et al.*, 2005). Os estudos realizados até então² têm confirmado, cientificamente, os efeitos observados no uso tradicional da planta, tendo sido identificada a presença destes constituintes ativos, numa análise fitoquímica preliminar de uma infusão de partes aéreas desta planta (Martins *et al.*, 2005).

Os alcalóides são compostos que se encontram num vasto número de plantas, destacando-se a sua presença nas famílias Apocinaceae, Papaveraceae e Fabaceae. Os alcalóides podem encontrar-se em todos os

² A partir de extratos obtidos de partes aéreas (pulverizadas) de plantas de *G. tenera*, colhidas no início do período de floração, na Ilha da Madeira.

órgãos das plantas, mas tendem a concentrar-se nos tecidos externos. São quase sempre produtos orgânicos marcados por elevada toxicidade, no entanto, muitos desses compostos são também reconhecidos por uma atividade fitofarmacológica relevante (Cunha, 2009).

Como forma de comprovar a vasta gama de propriedades biológicas atribuídas aos alcalóides quinolizidine (Michael, 2002), incluindo a atividade hipoglicemiante (Perez *et al.*, 1998), foram investigados estes compostos ativos a partir do estrato de etanol da parte aérea de *G. tenera*, por GC-MS³ (Martins, *et al.*, 2005). Foram distintamente identificados dez alcalóides. A anagirina, lupanina, citisina, N-metilcitisina e N-formilcitisina foram os principais compostos, sendo os dois últimos conhecidos pela sua atividade hipoglicemiante. Os alcalóides presentes em menor quantidade foram: dihidrocitisina, 5,6-dihidrolupanina, rombifolina, apillina e termopsina (Martins *et al.*, 2005).

Os flavonóides e flavonóides glicosídeos fazem parte de um vasto grupo de moléculas que ocorrem naturalmente nas plantas (Rauter *et al.*, 2007). São moléculas de baixo peso molecular, presentes, sobretudo, na parte aérea das plantas (Cunha, 2009). Estudos recentes revelaram a sua presença em frutos e vegetais, em concentrações elevadas (Borges *et al.*, 2001; Havsteen, 2002). Em várias plantas medicinais⁴ foram identificados, nos extratos obtidos, diferentes tipos de flavonóides, reconhecendo-se um esforço recente para a validação farmacológica de alguns deles (Cunha, 2009), que tem sido acompanhado pelo crescente registo de patentes que compreendem os

³ Gas chromatography-mass spectrometry (Cromatografia gasosa – Espetrometria de massa)

⁴ Como é o caso da *Momordica charantia* L. [Cucurbitaceae], *Pterocarpus marsupium* Roxb. [Fabaceae], e *Trigonella foenum graecum* L. [Fabaceae] (Jung *et al.*, 2006) e *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* [Asteraceae] (Aslan *et al.*, 2007).

compostos flavonóides como princípios ativos (Omoigui, 2006). Estes extratos são potencialmente úteis como fontes de compostos bioativos, sobretudo pela comprovada atividade dos flavonóides (Havsteen, 2002); conhecimento que contribuirá, também, para a valorização agronômica destas espécies vegetais.

A atividade antidiabética de vários extratos de plantas relaciona-se, diretamente, com propriedades antioxidantes associadas à presença de flavonóides (Aslan *et al.*, 2007). Como antioxidantes, os flavonóides podem impedir o progressivo comprometimento da função das células beta-pancreáticas, devido ao *stress* oxidativo⁵, reduzindo assim a ocorrência da diabetes tipo 2 (Song *et al.*, 2005). Para além da ação anti-hiperglicémica, os flavonóides têm sido recentemente relatados como inibidores da aldose-reductase, bloqueando a via do sorbitol, processo relacionado com muitos problemas associados à diabetes (Rauter *et al.*, 2005).

Ainda no capítulo das propriedades antioxidantes evidenciadas pelos compostos flavonóides, têm-se multiplicado os estudos que referenciam a sua atividade no tratamento de outras doenças. Determinados tipos de oxigénio reativo são responsáveis por várias anomalias celulares, como danos em proteínas, desativação de enzimas, alteração de DNA e peroxidação lipídica, sendo precursores de distúrbios neurológicos como as doenças de Alzheimer e Parkinson (Kaur & Geetha, 2006). Múltiplos fatores patogênicos, incluindo o *stress* oxidativo e a redução dos níveis de acetilcolina têm sido implicados na doença de Alzheimer. Entre os potenciais agentes, os flavonóides são compostos promissores no tratamento destes distúrbios neurológicos (Ji & Zhang, 2006). A genisteína, um dos compostos do extrato de éter dietílico de

⁵ O *stress* oxidativo também está associado a complicações secundárias da diabetes *mellitus*, designadamente, a complicações vasculares (Vítor *et al.*, 2004).

plantas, previne a modificação de glucose mediada por auto-oxidação-aterogénica da lipoproteína de baixa densidade (LDL - low-density lipoprotein) (Exner *et al.*, 2001) prevenindo, pelas suas propriedades antioxidantes, doenças neurodegenerativas (Sonee *et al.*, 2004).

Uma das abordagens mais promissoras para o tratamento da doença de Alzheimer baseia-se no incremento dos níveis de acetilcolina no cérebro, usando, para tal, inibidores da acetilcolinesterase (Wilkinson *et al.*, 2004). No entanto, algumas drogas sintéticas usadas para tratar as disfunções cognitivas e de perda de memória associada à doença de Alzheimer apresentam, apenas, moderados benefícios sintomáticos, incentivando a pesquisa de novos inibidores desta enzima, em que os compostos flavonóides podem ser compreendidos.

Vários estudos epidemiológicos têm relatado que o consumo regular de flavonóides, principalmente de catequinas, pode ser, também, eficaz na prevenção de neoplasias e de doenças cardiovasculares (Mariappan *et al.*, 2006). A apigenina é uma bioflavona dietética com propriedades anticancerígenas, que se pensa poder desempenhar um papel relevante na quimioprevenção e na quimioterapia de diferentes patologias neoplásicas. Também a flavona luteolina e algumas isoflavonas têm sido relatadas como agentes anticancerígenos; a genisteína, por exemplo, intervém positivamente na atividade do estrogénio, sendo aplicável na proteção de cancros estrogénio-dependentes.

Vários flavonóides têm demonstrado, também, efeito positivo sobre os parâmetros associados com arteriosclerose, incluindo a oxidação da lipoproteína, agregação de plaquetas e reatividade vascular (Peluso, 2006).

As flavonas são um dos maiores grupos de flavonóides presentes nas plantas, sendo que, foram encontradas isoflavonas em espécies da família Fabaceae. Num dos primeiros estudos efetuados sobre a *G. tenera*, a partir do extrato de etanol, foram isoladas duas flavonas, três isoflavonas e uma 7-O-glicosilados de isoflavona. A sua caracterização estrutural foi efetuada por LSIMS, CID, MS/MS, RMN e UV⁶ (Borges *et al.*, 2001). No entanto, num estudo posterior de caracterização de metabólitos secundários, a partir de um extrato de n-butanol, por eletroforese capilar com espectrometria de massa, foram identificados 26 compostos flavonóides com efeito anti-hiperglicémico (Edwards *et al.*, 2006).

O estudo de flavonóides com efeito anti-hiperglicémico, a partir de um extrato de etilo de *G. tenera*, por LC acoplada a DAD e ESI-MS⁷, identificou a presença de dois compostos glicosídeos principais, um anteriormente identificado, a genisteína-7-glucosídeo e um desconhecido, o 5,7,4-trihydroxisoflavona-8-C-glicosídeo, no entanto, em quantidade superior. Foi também identificada, em menor escala, a luteolina-7-O-glucosídeo e vestígios de luteolina-7,3'-di-O-glicosídeo e rufina (Rauter *et al.*, 2005).

Em estudo posterior, desenvolvido pelos mesmos autores, a partir de um extrato de n-butanol, foi, também, avaliada a atividade antidiabética da espécie, pela combinação de HPLC-DAD-ESI-MS⁸, tendo sido identificados, no perfil dos flavonóides, 21 monoglicosídeos e 12 diglicosídeos. A atividade

⁶ Liquid secondary ion mass spectrometry (Espectrometria de massa de iões secundários); Collision-induced dissociation (Dissociação por colisão induzida); Tandem mass spectrometry (Espectrometria de massa em tandem); Nuclear magnetic resonance (Ressonância magnética nuclear); Ultraviolet (Ultra violeta).

⁷ Liquid Chromatography (Cromatografia líquida); Diode-array detection (DAD); Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).

⁸ High Performance/Pressure Liquid Chromatography (HPLC), método que se tem mostrado eficaz na identificação de flavonóides complexos.

antidiabética do estrato foi estudada em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina durante 15 dias, tendo-se concluído que os níveis de glucose no sangue foram significativamente reduzidos, para valores normais após 15 dias de tratamento (Rauter *et al.*, 2009).

O mesmo estudo congregou, ainda, a avaliação da atividade antioxidante e a inibição da acetilcolinesterase, a partir de estratos de éter dietílico, acetato de etilo e n-butanol; foram também realizados estudos de toxicidade *in vitro* para, assim, se poder avaliar o potencial farmacológico da planta. A atividade antioxidante foi analisada através da utilização do DPPH⁹, em que a atividade de radicais livres mais eficaz foi observada no extrato de acetato de etilo (48.7% em 139.1 µg/ml), que também foi o mais eficaz no teste de concentração mínima. Os efeitos da inibição da acetilcolinesterase, pelo método Ellman¹⁰ revelaram que a atividade inibitória da acetilcolinesterase (77% em 70,0 µg/ml) foi também mais eficaz no extrato de acetato de etilo. A genotoxicidade e a citotoxicidade aguda foram avaliadas por meio de quantificação do índice proliferativo e da técnica de “aberração” cromossômica a curto prazo, após a exposição de linfócitos aos extratos, sendo que os primeiros estudos de toxicidade do género *Genista L.* demonstraram não existir evidência de genotoxicidade, nem de citotoxicidade aguda (Rauter, 2009).

Estes trabalhos corroboraram a concepção geral de Harborne (1994), quando refere que, tanto os alcalóides como os flavonóides são importantes marcadores quimiotaxonómicos¹¹ do género *Genista L.*

⁹ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

¹⁰ Método espectrofotométrico para a monitorização precisa da atividade da colinesterase no sangue.

¹¹ Micromoléculas, na maioria das vezes, metabolitos secundários, ou em alguns casos, metabolitos primários, que permitem a observação de diferença entre indivíduos em qualquer nível hierárquico.

2. Caracterização taxonómica do género *Genista* L.

A *Genista tenera* (Jacq. Ex Murr.) O. Kuntze [*Cytisus tener* Jacq.ex Murr.; *C. virgatus* (Ait.) Masf., non Salisb., nec Vest.; *Genista gracilis* Poir.; *G. virgata* (Ait.) DC., non Lam; *Spartium virgatum* Ait.], de nome comum Piorno-da-Madeira (Vieira, 1992), é uma espécie endémica da ilha da Madeira, classificada na família Fabaceae, na subfamília Papilionoideae, na tribo Genisteeae e no género *Genista* L..

Esta espécie não é referenciada nas floras nacionais e internacionais, sendo descrita em bibliografia muito escassa (Jardim & Francisco, 2000; Vieira, 1992). Após uma pesquisa exaustiva foram encontradas breves referências a esta espécie nas seguintes obras referenciadas no sítio da Biodiversity Heritage Library: *Icones plantarum rariorum* [vol. 1] (Jacquin; Nikolaus & von Freiherr, 1781-93, p. 147); *Botanische Jahrbucher fur Systematik Pflanzengeschilhte und Pfanzengeographie* [vol. 33] (1904, p. 437); *Journal of the Arnold Arboretum* [vol. 3-4] (Arboretum, 1922-1923, p. 34); *List of rare, threatened and endemic plants in Europe* (1983, p. 130); *The botanic gardens list of rare and treatened species* (1984, p. 17); *British journal of entomology and natural history* [vol. 12] (BENHS, 1988, p. 85) e *1997 IUCN red list of threatened plants* (IUCN, 1997, p. 358).

Atendendo à escassa informação botânica sobre a *G. tenera*, houve a necessidade de efetuar uma revisão bibliográfica sobre o género *Genista* L. e tribo Genisteeae, de forma a enquadrar botanicamente a espécie objeto deste estudo.

Num trabalho de doutoramento sobre a taxonomia de géneros da tribo Genisteeae foi encontrada referência a uma investigação sobre a taxonomia da família Leguminosae¹² em Portugal, levada a cabo pela secção de Fitoecologia e Herbologia do Departamento de Botânica e de Engenharia Biológica do Instituto Superior de Agronomia, no qual surgiu o interesse em caracterizar o género *Genista* L., cujas delimitações taxonómicas têm sido frequentemente alteradas desde a sua publicação por Lineu em 1754 (Costa, 1996).

Após um período, durante o qual o género original de Lineu foi repetidamente alterado, algumas obras foram clarificando cada vez melhor as características distintivas do género, relativamente a outros géneros, escopo nem sempre bem sucedido; neste sentido, identificámos algumas das alterações mais relevantes a que este género esteve sujeito, que apresentamos por ordem cronológica.

Lineu (1753), na sua obra *Species Plantarum*, integrou o género *Genista* na Classe Diadelphia Decandria, classificando nove espécies, organizou-as em dois grupos, diferenciados pela presença/ausência de espinhos (consultar anexo I). Incluiu no género *Genista* L. diversas espécies dos antigos géneros *Genistella* de Tournefort, *Cytisus* e do atual *Spartium*. Descreveu ainda o género *Spartium* L. que continha as espécies *S. jeuceum*, *Adenocarpus* sp. e várias espécies que atualmente pertencem ao género *Genista* L.

Vahl (1790-94) incluiu no género *Genista* L. a espécie *G. hirsuta* e Ortega (1798) a espécie *G. micrantha*. Brotero (1804), estudando material de diferentes regiões de Portugal descreve mais 5 espécies. De Candolle (1825) na sua obra *Prodromus*, considera 76 espécies e 13 variedades no género

¹² Atualmente designada Fabaceae.

Genista L., descrevendo 12 espécies novas (consultar anexo I), tendo considerado a *G. algarbiensis* uma subespécie de *G. hirsuta*.

Endlicher (1836-1840) passa a distinguir o género Genista L. do género Cytisus, pela introdução do carácter distintivo “cálice bilabiado” em oposição a “curtamente ou não bilabiado”. Boissier (1839-1845) adicionou ao género Genista L. mais 4 espécies (consultar anexo I).

Spach (1844-1845, citado por Costa, 1996) integrou os géneros Genista L., Echinopartum Spach e Pteropartum num único género, tomando como base os seguintes caracteres taxonómicos: (i) presença ou ausência de espinhos; (ii) forma do fruto; (iii) forma da folha (consultar anexo I). A sistematização proposta pelo autor visou a criação de secções nos subgéneros, identificando alguns caracteres específicos de diferenciação das espécies no género, no entanto, o elevado número de subgéneros identificados tornou-se pouco funcional sob o ponto de vista taxonómico. Adicionou, também, novas espécies ao género, descrevendo a *G. obtusiramea* e a *G. leptoclada*, identificadas por Claude Gay.

Roemer (1852, citado por Costa, 1996) descreve a *G. polyanthos*. Lange (1864, citado por Costa, 1998) descreve as espécies *G. hystrix* e *G. berberidea*, baseado em material oriundo de Espanha. Cosson (1852, citado por Costa, 1996) ao estudar plantas das regiões montanhosas de Marrocos e Argélia, descreveu mais três espécies (consultar anexo I).

Sampaio (1990) na sua obra *Flora Portuguesa*, que deixou inacabada em 1937, considerou, no território Português, 12 espécies no género Genista L.. No entanto, Coutinho (1939) reconheceu, na sua obra *Flora de Portugal*, 18 espécies e 13 subespécies no mesmo género (consultar anexo I).

Rothmaler (1941, citado por Costa, 1996) criou o género *Echinopartum* retirando-o como secção do género *Genista* L., classificando neste género as espécies *G. lusitanica* e *G. horrida*. No entanto, Vicioso (1953, citado por Costa, 1996), após revisão dos géneros da tribo Genisteeae, presentes em Espanha, reclassifica o *Echinopartum* no género *Genista* L..

Gibbs (1966, citado por Costa, 1996) fez algumas alterações à sistematização proposta por Spach, com base no número de feixes vasculares presentes no pecíolo das folhas. Admite a divisão do género *Genista* L. em três subgéneros, 10 secções e 80 espécies, a maioria das quais endémicas da Península Ibérica (consultar anexo I). Considerou ainda que a secção *Echinopartum*, pelo facto de apresentar um cálice fortemente indumentado e infletido, deveria ser retirado do género *Genista* L.. Propôs a reclassificação dos subgéneros *Pterospartum* e *Teline* como novos géneros; incluindo o subgénero *Camptolobium* no subgénero *Phyllobotrys*, compreendendo as secções *Phyllobotrys* e *Voglera*; incluiu, ainda, as secções *Asterospartum* e *Ephedospartum* na secção *Spartocarpus*.

Franco (1971), na revisão do género *Genista* L., considerou, para Portugal, quatro secções e dez espécies (consultar anexo I). Fernandes e Queirós (1978, citados por Costa, 1996) e Gonzalez (1982) mantiveram as mesmas secções propostas por Franco (1971), mas com algumas alterações (consultar anexo I).

Cantó e Sánchez (1988, citados por Costa, 1996), numa revisão da espécie *G. cinérea*, descreveram uma espécie e uma subespécie novas (anexo I). Castroviejo (1999) na sua obra *Flora Ibérica* considerou 39 espécies e 13 subespécies no género *Genista* L..

3. Caraterização morfológica do género *Genista* L.

O género *Genista* L. inclui plantas arbustivas ou subarbustivas perenes, lenhosas, com ramos alternos, opostos ou verticilados, inermes ou espinhosos. Os espinhos resultam do endurecimento e afilamento dos ramos, assim como dos filódios. Os espinhos dispostos no eixo principal da planta são designados por espinhos primários.

Nas plantas adultas podem distinguir-se dois tipos de ramos espinhosos, os ramos espinescentes, de crescimento limitado, e os ramos acessórios, de crescimento mais prolongado e rápido. Os primeiros surgem a partir de uma gema situada entre um eixo e uma folha, estes, por sua vez, possuem gemas que vão dar origem a novas ramificações, mais curtas, designadas por secundárias, que também podem originar novas ramificações (e.g. *G. tournefortii*). O desenvolvimento dos ramos, na época de máxima atividade vegetativa, marca o volume aparente da planta. Na fase inicial são tenros, flexíveis e com pelos abundantes, tornando-se, com o tempo, mais grossos, lenhificados e inermes, convertendo-se em ramos espinhosos, terminando com um pequeno espinho (e.g. *G. polyanthos*). A disposição dos espinhos pode ser alterna, suboposta, oposta, ou densamente agrupados sobre os eixos curtos. No entanto, também existem espécies em que as ramificações não apresentam espinhos (e.g. *G. florida*, *G. micrantha*, *G. cinerascens*).

Apresenta folhas alternas ou opostas, trifoliadas ou unifoliadas; com ou sem estipulas diferenciadas. Após as folhas cotiledonares, surgem duas ramificações do caule com folhas trifoliadas, cada um desses ramos divide-se

em dois, formando dois grupos de folhas trifoliadas, que no caso da *G. hirsuta* e *G. florida* se apresentam tomentosas. Posteriormente, estas folhas transformam-se em folhas de limbo, progressivamente menores, de forma alongada, triangular ou linear. As folhas variam em tamanho e forma, desde estritamente elípticas, de 3-8 x 1-2 mm, a largamente elípticas ou abovadas, de 5-25 x 2-5 mm (*G. florida* e *G. tournefortii*). Quando as folhas são trifoliadas também são sésseis.

As flores são amarelas, fasciculadas, ou dispostas em cachos terminais, por vezes subcapitados; o cálice é persistente, bilabiado, com o lábio superior bipartido ou bifendido e o inferior, tridentado ou trifendido; a corola apresenta estandarte ereto ou ascendente, que pode apresentar diversas formas: ovado, triangular, de base truncada ou obtusa (e.g. *G. micrantha*); obcordiforme, pouco maior que o cálice (e.g. *G. lusitanica*); arredondado-chanfrado, duas vezes maior que o cálice (e.g. *G. Barnadesii*); a quilha é oblonga, reta ou pouco curva; apresenta estames monadelfos e estilete assovelado, ascendente, com estigma terminal capitado.

O fruto é uma vagem de dimensão e forma variável, comprida ou subentumecida, seca, linear, oblonga ou ovada, reta ou curva, não alada, bivalve, mono ou polispérmica (Coutinho, 1938). Apresenta secção de estreitamento elíptico, mais ou menos orbicular, por vezes algo toruloso, deiscente, com 1-30 sementes, glabro ou peludo (Castroviejo, 1999).

As sementes apresentam-se sem arilo (Coutinho, 1938), com menos de 3 (3,8) mm, de forma ovoide ou discoide, pardas, esverdeadas ou negras, sem manchas, raras vezes com máculas concêntricas, frequentemente brilhantes, sem estrofíolo (Castroviejo, 1999).

3.1. Morfologia da espécie *G. tenera*

A *G. tenera* é um arbusto de folhagem escassa, acetinado-pubescente e esbranquiçada, que pode atingir 2,5m de altura, de ramos frágeis e arqueados, com folhas simples e muito pequenas, flores amarelas, por vezes avermelhadas (Vieira, 1992).

Descrita com maior pormenor por Jardim e Francisco (2000), é uma planta comum, que habita ravinas e escarpas rochosas expostas, desde o nível do mar até aos 1700 m de altitude¹³, principalmente na vertente sul da ilha da Madeira. Apresenta folhas sésseis, linear-lanceoladas a obovadas de 2.5-14 x 0.5-4.5 mm. Apresenta inflorescência racemosa terminal, de 1-5 cm, com 1-9 flores; corola amarela de 10-15 mm. Fruto (vagem) comprido, de 15-35 x 4-6.5mm.

A época de floração prolonga-se de março a julho (Jardim & Francisco, 2000), pelo que, na ausência de referências bibliográficas, podemos inferir que a formação e maturação do fruto e das sementes se deverão estender aos meses de verão¹⁴, ocorrendo possivelmente no período do ano com temperaturas mais elevadas.

Na figura 1 apresenta-se uma planta jovem de *G. tenera* em floração, com porte subarborescente. Na figura 2 apresenta-se em pormenor a inflorescência e o fruto (vagem).

¹³ Segundo Vieira (1992), desde os 50 até aos 1500 m de altitude.

¹⁴ Verificámos que, em 2013, numa planta localizada no concelho de Santarém, a maturação da semente se concluiu no mês de julho.

Figura 1: Planta adulta de *G. tenera*



Foto de Margarida D'Avó (2011)

Figura 2: Aspeto da flor e da vagem de *G. tenera*



Foto de Margarida D'Avó (2011)

4. Propagação seminal da *G. tenera*

Em muitas espécies de plantas e também nas da família Fabaceae e do género *Genista* L., a propagação poderá fazer-se por via vegetativa ou seminal. A nossa opção pela via seminal relacionou-se com critérios agronómicos e de manutenção do património genético, os primeiros, de carácter, essencialmente, produtivo e os segundos, de pendor qualitativo.

Assegurada a estabilidade genética de um lote de sementes, a multiplicação seminal será a via que melhor poderá contribuir para a produção vegetal em massa. De acordo com McDonald (1990), a propagação seminal poderá apresentar as seguintes vantagens no capítulo técnico-económico: (1) a germinação sincronizada de um elevado número de plantas; (2) menores problemas de transmissão de vírus; (3) uma maior taxa de crescimento e de sobrevivência após o transplante; (4) menores custos de produção, pois exige instalações e equipamentos menos sofisticados do que os utilizados na propagação vegetativa em massa; (5) um armazenamento mais fácil; (6) menores custos de transporte, pelo facto de as sementes ocuparem menor volume e (7) menores exigências em termos de regulamentação fitossanitária, no transporte e nos processos administrativos de importação / exportação.

A necessidade de conservação do património genético correlaciona-se, sobretudo, com a necessidade de obter estabilidade fitoquímica, isto é, de obter concentrações idênticas de constituintes fitoquímicos em diferentes extratos de plantas cultivadas. Nesse sentido, sob o ponto de vista da manutenção do património genético, haverá duas vias alternativas que importa

compreender no contexto desta investigação – a via da conservação e a via do melhoramento genético.

Atendendo a que o objetivo produtivo do nosso estudo se relaciona com a utilização fitofarmacológica das plantas produzidas, haverá interesse em que os extratos obtidos possuam composição idêntica quanto aos constituintes com aplicação fitofarmacológica. Quanto à possibilidade de melhoramento genético das plantas, no que respeita à concentração desses constituintes, não será um objetivo deste estudo, que apenas pretende contribuir para a produção de plantas fora do seu habitat, havendo, em primeira mão, que comparar a sua composição fitoquímica com a composição de plantas colhidas no habitat original.

A estabilidade genética relaciona-se, naturalmente, com a fidelidade genética e fenotípica entre os lotes de sementes às populações de origem. Se essas populações apresentam, em maior ou menor escala, variabilidade genética entre indivíduos, a propagação seminal deve, então, procurar representar essa variabilidade.

Atendendo ao exposto, a estabilidade genética poderá ser potenciada pelos mesmos meios aplicados na conservação de germoplasma. De acordo com Ferreira (1996, p. 72), “A fim de garantir a manutenção da integridade genética e as peculiaridades da amostra inicial, recomenda-se que as sementes utilizadas para regeneração estejam geneticamente mais próximas do germoplasma original.”. Dever-se-á recorrer, preferencialmente, a sementes colhidas nas populações silvestres – “coleção de base” – em detrimento das que resultem de cultivo intermédio – “coleção ativa” – uma vez que estas são mais vulneráveis à instabilidade genética, devido aos plantios sucessivos.

No que respeita à estabilidade fitoquímica, importará ter em consideração que em condições de campo, resultará, não apenas da informação genética, mas também da sua interação com o ambiente. Considerando que ambiente é um termo genérico que inclui uma grande multiplicidade de componentes (Quedas, 2001) – designadamente, pedológicos, climatéricos, bioecológicos e agronómicos – a sua influência sobre o valor fitofarmacológico será inevitável, contribuindo para diferenciar quimicamente os extratos de plantas colhidas nos seus habitats, das produzidas noutros locais. A interação genótipo x ambiente consiste, assim, na desigual variação dos valores fenotípicos de diferentes genótipos, resultante de variações ambientais.

Neste sentido, surgem também os conceitos de estabilidade biológica ou homeostática e de estabilidade agronómica, o primeiro, que avalia os genótipos em função da constância do valor fenotípico, no espaço e no tempo e o segundo, que avalia os genótipos pela resposta linear e positiva do valor fenotípico ao potencial produtivo dos diversos ambientes (Quedas, 2001). Aplicando estes conceitos ao campo das plantas medicinais, será fundamental estudar a influência das interações genótipo x ambiente sobre a presença e concentração dos constituintes ativos nessas plantas, objetivo que não se enquadrou no âmbito deste estudo.

Outro aspeto a ter em conta na propagação seminal é a longevidade das sementes e a sua aptidão para o armazenamento. Lazaro e Leopold (1998, p. 83) referem que “a análise de sobrevivência média de geração (MGSA) pode ser utilizada para estimar os componentes genéticos para a sobrevivência das

sementes em condições adequadas de armazenamento”. A estimativa da estabilidade genómica entre diferentes populações baseia-se, assim, numa distribuição normal, que descreve com precisão a sobrevivência de sementes, sendo o declive da equação linear probit igual ao inverso do desvio padrão da velocidade de perda da capacidade germinativa (Robert & Ellis, 1982, citados por Russell & Listman, 1988). Estes autores demonstraram que esse declive traduzia matematicamente a combinação das condições de armazenamento com a constituição genética da população armazenada.

Valois (1996) refere que é importante determinar a longevidade das sementes antes do seu armazenamento, designadamente, quanto à sua reação ao ambiente seco e temperaturas baixas (inferiores a 0°C). A maioria das sementes, entre as quais, as de espécies do género *Genista* L, consideram-se “ortodoxas”, o que significa que podem ser armazenadas, em boas condições, a temperaturas entre 0 e -18°C, a baixos graus de humidade, entre 4 e 6%, sem que ocorram danos fisiológicos.

As sementes de *G. tenera*, como acontece em muitas espécies da família Fabaceae, possuem tegumento duro (Mcdonald, 1990, Rolston, 1978), o que dificulta a absorção da água, o acesso de oxigénio ao embrião e a emergência da radícula, tendo como consequência uma germinação mais lenta e irregular das sementes. A dureza do tegumento configura-se, então, como uma forma de dormência física das sementes (Mcdonald, 1990). O grau de dureza do tegumento depende da espécie, da localização geográfica, e sobretudo, da influência que as condições climáticas tenham sobre o processo de maturação das sementes.

4.1. Estrutura das sementes

Na propagação seminal é importante conhecer com rigor a estrutura da semente, quer sobre a necessidade de tratamentos específicos de pré-sementeira, quer sobre as lesões que esses tratamentos lhe poderão causar ao nível físico ou fisiológico.

A semente é o órgão responsável pela reprodução e dispersão das plantas que produzem sementes, as espermatófitas. As sementes variam muito nas diferentes espécies vegetais, quanto ao tamanho, cor, características externas e internas, quantidade e natureza das reservas alimentares, resultado de processos evolutivos de adaptação aos habitats, para garantir a sobrevivência das espécies e a melhor ocupação do terreno ao seu dispor.

Todas as sementes contêm o embrião de uma nova planta, envolvido por um ou mais invólucros, geralmente dois, designados por tegumentos. Estes têm origem a partir da parede do óvulo e apresentam, muitas vezes, características estruturais externas provenientes da sua origem e que persistem na semente desenvolvida. Destas características destacam-se: (1) o hilo, que representa o ponto onde a semente se liga ao funículo – o cordão do óvulo; (2) o micrópilo, que persiste frequentemente na semente madura e (3) a rafe, que é uma reminiscência do cordão do óvulo que, em certos tipos de sementes, adere aos seus tegumentos.

Em sementes que possuem apenas um tegumento, este é, geralmente, espesso e lenhoso; as que possuem dois tegumentos, como é o caso das sementes das plantas da família Fabaceae, o mais interno é, normalmente, fino

e membranoso. Os embriões de sementes de espécies diferentes distinguem-se, quer pelo tamanho, quer pela forma, volume e textura; porém, todos os embriões desenvolvidos se compõem de um ou mais cotilédones, uma plúmula e um hipocótilo. As plantas monocotiledóneas possuem apenas um cotilédone e as dicotiledóneas (como as Fabaceae) possuem dois cotilédones.

Nas sementes de muitas espécies encontra-se presente um endosperma, que contém reservas acumuladas. Nas espécies que não possuem endosperma, como é o caso das Fabaceae, os cotilédones são geralmente grandes, acumulando muitas substâncias de reserva.

O óvulo apresenta, nas Fabaceae, os primórdios de dois tegumentos – a testa e o tégmen – respetivamente, o tegumento externo e o tegumento interno da semente. No entanto, mesmo que o óvulo apresente dois tegumentos (bitegmentado), a semente dele resultante, pode, após o seu desenvolvimento, apresentar apenas um tegumento, neste caso, também designado de testa (Esau, 1960, citado por Rolston, 1978). Os tegumentos da semente assumem, então, características específicas determinadas pelo óvulo, designadamente, o número de camadas e a espessura, sendo influenciadas pelas modificações ocorridas durante o processo de maturação da semente.

O tegumento da semente, para além da função de proteção, apresenta também as funções de regulação e de recetáculo, designadamente, para: (1) manter unidas as partes internas da semente; (2) proteger as partes internas contra choques e abrasões; (3) servir como barreira à entrada de microrganismos na semente; (4) regular a velocidade de reidratação da semente; (5) regular a velocidade das trocas gasosas (oxigénio e gás

carbónico) e (6) condicionar o início do processo de germinação, em alguns casos, por mecanismos de dormência.

O tegumento torna-se, frequentemente, duro e seco, protegendo o embrião de fatores ambientais desfavoráveis, principalmente: (1) das radiações solares, que podem causar danos ao material genético; (2) das oscilações térmicas; (3) da desidratação; (4) da ação de decompositores e (5) da germinação em locais e em épocas pouco propícias ao desenvolvimento da planta; no entanto, algumas espécies apresentam o tegumento carnudo e colorido, sobretudo, para atrair os dispersores.

4.2. Dormência das sementes

Muitas sementes viáveis não germinam quando colocadas em condições aparentemente adequadas à sua germinação, devido a mecanismos designados por dormência. A dormência das sementes configura-se como uma estratégia de sobrevivência das espécies nos seus habitats, criando condições internas e/ou externas para impedir a germinação na época errada do ano, ou na proximidade das plantas-mãe, potenciando a disseminação e o desenvolvimento das plantas jovens sob as condições climáticas mais adequadas.

A dormência é particularmente importante em climas em que ocorrem condições extremas de temperatura e humidade, como é o caso do clima mediterrânico, em que a germinação em determinadas épocas do ano poderá resultar em morte quase instantânea da plântula. Uma semente viva é considerada “dormente” se estiver, temporariamente, incapacitada para

absorver humidade do meio exterior, ou para ativar reações bioquímicas associadas à germinação, impedindo-a de desenvolver o embrião.

Algumas sementes apresentam apenas um mecanismo de dormência, outras, combinam mais do que um mecanismo, designando-se, neste caso, por sementes de "dupla dormência".

A dormência pode ser "quebrada", na maioria das espécies que apresentam estes fenómenos, pela aplicação de tratamentos que simulam as condições ecológicas de germinação das sementes, sendo, para tal, fundamental estudar os mecanismos específicos de dormência. Estes mecanismos resultam, por um lado, da herança genética das espécies, e por outro, de condições circunstanciadas, marcantes do desenvolvimento e maturação das sementes, dando origem a respostas distintas em diferentes lotes de sementes, com diferentes origens no espaço e no tempo.

A dormência resulta, geralmente, de processos que ocorrem durante o desenvolvimento da semente, após a fecundação (geralmente, após a conclusão do desenvolvimento do embrião e acumulação de reservas). Os processos de dormência podem categorizar-se em dois tipos, de dormência física ou fisiológica. Existem, no entanto, dois outros períodos em que a dormência das sementes se pode desenvolver, nestes casos designada de "dormência secundária"; podendo ocorrer durante o processamento e armazenamento de sementes, como por exemplo, o excesso de secagem de sementes; ou ocorrer após a sementeira, em condições desfavoráveis, como a alta temperatura, podendo re-induzir a dormência.

A dormência física de sementes está relacionada com o seu tegumento duro ou ceroso. O tegumento duro dificulta a absorção da água pela semente, levando assim a uma germinação mais lenta e irregular das plantas, de que são exemplos as sementes de muitas espécies da família Fabaceae. O grau de dureza do tegumento depende da espécie, da localização geográfica onde a semente foi colhida e das condições meteorológicas ocorridas durante o processo de maturação das sementes. Algumas espécies mantêm cera dentro ou sobre o tegumento da semente, tornando-o impermeável à água. Esta impermeabilidade também confere à semente a capacidade de não se desidratar.

A dormência fisiológica resulta de bloqueio temporário de processos bioquímicos desenvolvidos nas sementes e / ou no revestimento da semente. As causas da dormência fisiológica podem ser divididas em duas categorias: (1) as provocadas por um insuficiente desenvolvimento do embrião, que se designa por embrião rudimentar; ou (2) as provocadas por inibidores químicos ou pela suspensão das reações químicas, mecanismos que indisponibilizam as reservas de alimentos para o embrião. Num número alargado de espécies da família Rosaceae sabe-se que o inibidor químico está contido na polpa da fruta amadurecida (McDonald, 1990); as substâncias inibidoras penetram no tegumento enquanto a polpa permanecer sobre as sementes, podendo prolongar-se o efeito, quer devido à excessiva maturação do fruto antes da colheita, quer pela deficiente remoção da polpa antes do armazenamento das sementes.

O nível de dormência fisiológica varia em diferentes espécies. Alguns autores subdividem esses níveis em dormência superficial, intermédia e profunda, com base na complexidade dos mecanismos fisiológicos envolvidos e no período de tempo, sob baixas temperaturas, necessário para a germinação ocorrer.

4.3. Sementes de tegumento duro

Como já foi referido anteriormente, existem sementes que embora sejam viáveis, por vezes, não conseguem absorver a humidade, mesmo em condições aparentemente favoráveis. Por essa razão não germinam, sendo designadas por “sementes de tegumento duro” ou também por “sementes impermeáveis” (Rolston,1978). Sementes impermeáveis ou de tegumento duro são comuns a muitas das espécies da família das Fabaceae (McDonald, 1990, Rolston, 1978). Num dos estudos dedicados a esta problemática foram estudadas sementes de 260 espécies de Fabaceae, das quais, 85% apresentaram impermeabilidade parcial ou total (Guppy, 1912). A impermeabilidade do tegumento de sementes duras constitui uma forma de dormência física exógena, no entanto, também se pode combinar com outros tipos de dormência (Nikolaeva, 1969, citada por Rolston,1978).

As sementes de tegumento duro assumem grande importância, tanto ao nível ecológico como agronómico. Os tegumentos duros contribuem para a longevidade das sementes, tornando-as viáveis por mais tempo, capazes de sobreviver em condições desfavoráveis, designadamente, pela sua resistência ao fogo, que lhes permite germinarem e colonizarem rapidamente as áreas

queimadas e pela capacidade de resistirem à ingestão por animais, que as disseminam por vastas áreas. Em termos agronômicos, particularmente, nas culturas arvenses, as sementes de tegumento duro (e.g. trevos e luzernas) podem ser consideradas como agentes de conservação das espécies em prados naturais, seja para povoar o terreno livre, seja para constituir um banco de sementes no solo, que permita a regeneração progressiva das plantas.

Podem ser muitos os fatores que afetam a impermeabilidade das sementes. Rolston (1978), na sua revisão sobre as sementes impermeáveis à água, destacou como fatores: (1) a anatomia do tegumento; (2) o ambiente e (3) a genética. Relativamente à anatomia do tegumento, este autor realça as estruturas anatómicas: tegumento externo, hilo e estrofíolo. Quanto ao tegumento externo, uma característica comum às sementes impermeáveis à água é a de possuírem uma camada de células em paliçada de macroesclerídeos, também designadas por células de Malpighi. A extremidade exterior dessas células é pontiaguda ou abaulada e apresenta um espessamento da parede celular denominado de tampa terminal. Através da camada em paliçada de macroesclerídeos, podem ser observadas uma ou duas linhas claras que resultam da diferença na refração da luz, devido a uma alteração na composição química da macroesclerídea. Nas Fabaceae, a superfície exterior da testa é imediatamente externa às células macroesclerídeas e consiste numa cutícula (Corner, 1951, citado por Rolston, 1978). Internamente aos macroesclerídeos existe uma camada subepidérmica de osteoesclerídeos, também designada de colunar, ampulheta, pilar ou células de carretel, dependendo da distribuição dos espessamentos da parede e da forma das células. Espaços largos intercelulares podem ocorrer entre essas

células. Sob os osteoesclerídeos existe uma camada de parênquima, com espessura até 12 células.

Ainda relativamente às características do tegumento, tendo em conta o trabalho de Azzoui (1999), que estudou ao microscópio eletrónico de varrimento o tegumento externo de sementes de 19 espécies pertencentes a sete diferentes secções do género *Genista* L., verificou-se, em algumas delas, uma estrutura plissada “dobrada” e duas secções que apresentam estruturas ainda mais elaboradas. A observação de sementes de *G. tenera* à lupa binocular, com ampliação de 20x e 40x, mostrou que a superfície do tegumento da semente não é uniforme, apresentando algumas depressões.

O hilo da semente, que é a cicatriz deixada pelo pedúnculo do ovário, no caso da subfamília Papilionoideae consiste nas camadas em paliçada e contra-paliçada de macroesclerídeos. Segundo Rolston (1978), o termo estrofiolo tem sido utilizado na anatomia das sementes, com dois significados distintos, um, que está relacionado com modificações ecológicas e disseminação de sementes, o outro, relacionado com uma modificação estrutural da camada de células macroesclerídeas em paliçada, característica em sementes de plantas da subfamília Papilionoideae (Hamly, 1932, citado por Rolston, 1978).

Relativamente aos fatores ambientais: humidade relativa, temperatura, luz e fertilidade do solo, Rolston (1978) fez o levantamento de vários trabalhos que revelaram que, com a redução do teor de humidade relativa, aumentou a percentagem de sementes impermeáveis, logo, em locais com baixas humidades relativas e temperaturas elevadas, verifica-se uma maior abundância de espécies com sementes impermeáveis. Ao contrário da combinação entre a temperatura e a humidade relativa, o efeito da luz sobre a

rigidez do tegumento das sementes necessita de mais investigação, não existindo estudos suficientes que comprovem a sua influência sobre a formação do tegumento. Porém, várias experiências demonstraram pequenas alterações no número de sementes impermeáveis em espécies tratadas com fertilizante; no entanto, a fertilidade do solo parece desempenhar um papel bastante menos relevante no desenvolvimento de sementes impermeáveis.

Vários trabalhos referem que a impermeabilidade das sementes está relacionada com a genética. Kilen (1978), num estudo sobre a herança genética da condição impermeável em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) sugeriu que apenas três genes principais podem controlar a resposta permeável/impermeável, reforçando o papel primordial da hereditariedade nos mecanismos de dormência das sementes.

4.4. Tratamentos de quebra de dormência

Neste ponto, apresentamos alguns dos tratamentos que se podem aplicar na quebra de dormência de sementes; tendo como objetivo aumentar a proporção de sementes viáveis ao ponto de germinação. Os tratamentos de quebra de dormência têm como objetivo melhorar a taxa de germinação das sementes, concentrando a germinação de um lote de sementes num espaço de tempo mais curto, nesse sentido, contribuem para tornar o processo de sementeira mais produtivo.

São várias as técnicas que podem ser utilizadas para quebrar a dormência de sementes duras. Segundo Rolston (1978) e Mcdonald (1990), as principais técnicas de referência são: (a) a escarificação mecânica; (b) a

imersão em água quente; (c) a escarificação ácida. McDonald (1990) acrescentou a este conjunto a técnica de estratificação quente e húmida. Apresentamos, de seguida, uma breve descrição dessas técnicas.

a) Escarificação mecânica: Este conjunto de técnicas consiste na punção, rachadura, ou redução da espessura do tegumento da semente seca, para torná-lo mais permeável à água e ao ar. As técnicas consistem em limar, estilhaçar, ou rachar o tegumento com ferramentas manuais. Assim, por uma questão de produtividade, apenas serão aplicáveis a sementes de médias ou grandes dimensões e a pequenos lotes de sementes.

As técnicas mais vulgares consistem na redução da espessura do tegumento pela fricção das sementes individuais num bloco de madeira revestida com lixa de areia, ou com uso de um equipamento elétrico de tambor rotativo, forrado com lixa de areia no interior, que poderá processar maior quantidade de semente. A rotação do tambor vai reduzindo gradualmente a espessura do tegumento, ainda que nem sempre de uma forma homogénea, em diferentes sementes do mesmo lote, ou em diferentes pontos dos tegumentos. Como alternativa mecanizada pode-se utilizar uma betoneira comum, sendo a semente misturada no tambor com areia grossa, cujo contacto em rotação produz o efeito abrasivo nos tegumentos.

Mesmo nas versões mecanizadas a produtividade é relativamente baixa, quer pela quantidade limitada de sementes, quer pelo longo período de tempo necessário para as tratar.

b) Imersão em água quente: A técnica consiste em amolecer o tegumento e permitir, assim, que absorva água. As sementes vão intumescendo, o tegumento atinge um tom mais claro e por vezes uma superfície gelatinosa. Esta técnica é particularmente útil para muitas espécies da família Fabaceae, sendo recomendados os seguintes procedimentos: (i) aquecer a água entre 77-100°C¹⁵; (ii) verter a água sobre as sementes, dispostas num recipiente resistente ao calor, garantindo que fiquem bem cobertas; o volume de água deverá ser cerca de 4-6 vezes o volume das sementes, evitando-se que arrefeça rapidamente; (iii) imergir as sementes na água de resfriamento por 18-24 horas, voltando-as em intervalos regulares e (iv) após o período de imersão, misturar as sementes com turfa húmida, por mais 24 horas. O efeito do tempo de imersão deverá ser testado numa pequena amostra, antes de se tratar os lotes de sementes. Há propagadores que experimentam a imersão em água fria antes de recorrerem à imersão em água quente, adequada para as sementes com os tegumentos mais finos.

Deverá ter-se o cuidado de não deixar as sementes imersas durante mais tempo do que o necessário, correndo-se o risco de deterioração, bem como, não deixar que as sementes se desidratem após o final do tratamento, até que ocorra a germinação (manter a humidade é uma condição fundamental nesta fase). A sementeira deverá ser efetuada até quatro dias após o tratamento, aconselhando-se a preparação de uma cama de sementeira e de uma cobertura de textura muito ligeira, pois as sementes estarão muito frágeis, danificando-se facilmente.

¹⁵ Nas sementes de algumas espécies as temperaturas muito elevadas podem provocar lesões nos embriões, sendo recomendável fazer um teste com algumas sementes para verificar os efeitos do tratamento sobre a morfologia das sementes e sobre a germinação. Este risco pode ser mitigado com um tratamento a temperatura mais baixa, designadamente entre 65 e 70 °C.

c) Escarificação ácida: Esta técnica tem objetivos idênticos à escarificação mecânica, sendo uma técnica eficaz para reduzir a espessura do tegumento de sementes duras, utilizável em grandes lotes de sementes. O ácido sulfúrico concentrado (classe comercial, a gravidade específica 1,84) é utilizado como agente corrosivo, atuando por digestão ácida sobre o tegumento. Esta ação do ácido pode ser observada pela descoloração rápida de algumas sementes, sendo um dos indicadores para avaliar a aplicabilidade desta técnica a determinados lotes de sementes e poder estimar o tempo de exposição.

A aplicação da técnica exige, naturalmente, grandes cuidados na manipulação dos ácidos, designadamente: (i) realizar o trabalho sob exaustão forçada; (ii) usar vestuário de proteção integral, como luvas, botas de borracha e óculos, visando a proteção dos olhos e da pele; (iii) usar utensílios resistentes ao ácido (de vidro ou vidrados); (iv) não adicionar água ao ácido, evitando efervescência e projeção sobre o operador e (v) não derramar o ácido diretamente numa pia ou ralo, depois de utilizado, devendo ser vertido sobre grandes volumes de água, para reduzir previamente a concentração. Salienta-se que, no caso de sementes armazenadas em frio, estas não deverão ser tratadas sem que aqueçam à temperatura ambiente, pois a humidade formada no tegumento poderá causar uma reação perigosa com o ácido.

A maioria das sementes é imersa no ácido concentrado, tratamento que pode variar de 15 a 90 minutos, por exemplo, para a *Robinia pseudoacacia* e *Cercis chinensis* bastam 20 minutos, enquanto para a *Gleditsia triacanthos* são necessários 90 minutos. Porém, em algumas espécies, aplicam-se tratamentos ainda mais prolongados, como é o caso da *Gymnocladus dioica*, de 2 a 3

horas e da *Rhus typhina*, de 5 a 6 horas (McDonald, 1990). Como já foi referido, deverá ser realizado um teste preliminar para testar a duração do período de escarificação com ácido, antes de se tratar todo o lote de sementes, neste sentido, apresentam-se dois métodos de teste mais utilizados:

(1) The USDA Agriculture Handbook n.º 450 sugere que deverá ser colhida uma amostra de cada lote, dividida em pequenas subamostras, tratadas numa série de períodos de tempo considerados na bibliografia. As sementes serão imersas em água durante 1 a 5 dias após o tratamento com ácido e, em seguida examinadas. O tratamento que apresentar o maior número de sementes viáveis e intumescidas será o indicado para o processo de escarificação ácida (McDonald, 1990).

(2) Tratar toda a amostra com ácido, removendo algumas sementes em intervalos regulares cronometrados. Cortar as sementes, de forma a avaliar a espessura do tegumento reduzida. Um dos sinais que pode servir de orientação neste tipo de tratamentos, realizados em sementes brilhantes, é a aparência ligeiramente baça do tegumento após o tratamento, no entanto, a avaliação mais precisa é obtida através da observação das sementes em microscópio de baixa potência ou à lupa binocular. O tegumento deverá ser quase todo “queimado” pelo ácido.

Salvaguardados estes cuidados, o operador pode iniciar os procedimentos da técnica de escarificação ácida, designadamente os seguintes: (i) dispor as sementes num recipiente limpo, seco e resistente ao ácido, como vidro ou cerâmica vitrificada, as sementes devem ser limpas para evitar o risco de acumulação de calor; (ii) adicionar, lentamente, cerca de duas partes de ácido a uma parte de sementes (volume aparente) e agitar a mistura

com uma vareta de vidro ou agitador mecânico; recipiente e o conteúdo devem ser deixados à temperatura ambiente, ou numa tina de água fria, para reduzir a acumulação de calor; (iii) agitar o conteúdo em intervalos regulares, para prevenir que a temperatura aumente e provoque a formação de um “carvão vegetal” em torno das sementes, evitando, também, que as sementes se coleem umas às outras; (iv) preparar um recipiente com um grande volume de uma solução a 5% de carbonato de sódio, a utilizar como um agente neutralizante; (v) Decantar o ácido com cuidado e transferir as sementes para a solução de carbonato de sódio, agitando-as até que a solução termine de efervescer, o que indica que o ácido junto ao tegumento foi neutralizado; (vi) lavar cuidadosamente as sementes em água corrente, para remover todos os vestígios de ácido e base. Após o tratamento, dependendo da espécie, as sementes ficam prontas, quer para sementeira imediata, quer para tratamentos pré-germinativos, ou para armazenamento de curto prazo.

Após o tratamento, algumas sementes podem ainda conter uma camada de "carvão", que poderá ser removido pela fricção das sementes secas numa lixa, ou numa peneira fina.

d) Estratificação quente e húmida: Esta técnica é normalmente utilizada para quebrar a dormência fisiológica, no entanto, também se aplica no tratamento de sementes com tegumentos duros, podendo ser usada em complementaridade com a escarificação ácida, para facilitar a ruptura do tegumento (McDonald, 1990), principalmente, porque enfraquece o tegumento da semente, tornando-o mais permeável.

Os princípios da estratificação quente e húmida são semelhantes aos da estratificação a frio húmido, em que as sementes são misturadas com um substrato previamente humedecido (folhas húmidas, turfa ou perlite) sendo, de seguida, colocadas num saco de polietileno a uma temperatura de 21-24°C, durante 4-12 semanas. Na prática, a temperatura poderá variar entre os 18 e os 29°C, dependendo da espécie. O objetivo da estratificação quente e húmida é duplo: (i) para induzir o desenvolvimento de um embrião imaturo e (ii) para amaciar e tornar permeável o tegumento da semente. Na natureza, a semente obtém esse período de aquecimento durante a estação de verão, permitindo o desenvolvimento do embrião no inverno seguinte e a germinação com sucesso na primavera, ou seja, 18 meses após a fecundação.

A estratificação quente e húmida é um meio artificial que simula o calor do verão. Sem ela apenas algumas sementes germinariam na primavera após a sementeira, as restantes germinariam somente no ano seguinte. Esta estratificação quente é normalmente seguida de um período de estratificação a frio húmido, pois as sementes que requerem um período de temperaturas elevadas, também requerem um período de temperaturas mais baixas.

As sementes limpas e previamente humedecidas são misturadas com o meio de estratificação, colocadas em sacos de plástico e etiquetadas. Para as sementes de algumas espécies pode ser necessária a pré-embebição em água até 24 horas. Existem três formas possíveis de manipulação da semente, no intervalo de temperaturas exigido, designadamente: (i) suspender os sacos de polietileno numa estufa aquecida; (ii) colocar os sacos de polietileno num banco ou no chão aquecido de uma unidade de propagação com nebulização e (iii) armazenamento das sementes em caixa térmica; a Oakover Viveiros (Ashford,

Kent, Inglaterra) utiliza um contentor frigorífico usado, cujo isolamento pode ser melhorado através da fixação adicional de poliestireno no interior para formar uma caixa térmica equipada com prateleiras; três lâmpadas de calor radiante elevam a temperatura a cerca de 24-27°C. Esta alternativa tem-se vindo a confirmar mais eficaz e económica do que a estratificação numa estufa convencional (McDonald, 1990). Nos três casos, as sementes, as temperaturas médias e humidade são verificadas pelo menos duas vezes por semana, para garantir que o nível de humidade correto é mantido. O meio deve ser re-humedecido, sempre que necessário.

Outras técnicas mais recentes se poderão utilizar no tratamento de sementes duras, embora com custos superiores e com aplicações mais específicas, como é o caso da ação enzimática, da pressão atmosférica, da congelação e da radiação (Rolston, 1978). A técnica de ação enzimática baseia-se no tratamento com enzimas que promovem a degradação dos tecidos do tegumento. Num estudo realizado por Brant *et al.* (1971), a hemicelulase e a pectinase reduziram a impermeabilidade na semente de ervilhaca para 48% e 54%, respetivamente; um valor discreto, em comparação com o resultado de 68% de sementes impermeáveis, registado na testemunha. A técnica de pressão atmosférica baseia-se no tratamento das sementes a pressões elevadas (500-200 atm) reduzindo a ocorrência de sementes impermeáveis em várias espécies. O tratamento por radiações elétricas apresenta um interesse comercial considerável, mostrando-se tecnicamente eficaz como alternativa aos métodos clássicos, implicando, no entanto, equipamento específico.

4.5. Estudos de propagação de espécies do género *Genista* L.

Foram escassos os trabalhos encontrados sobre a propagação seminal de espécies do género *Genista* L, pelo que sintetizamos os resultados obtidos em estudos de espécies deste género, pela ordem cronológica da sua publicação.

Tarrega *et al.* (1992) estudaram o efeito de altas temperaturas na germinação de sementes de duas Fabaceae lenhosas, nomeadamente: *Cytisus scoparius* e *G. florida*. Sementes destas espécies foram aquecidas a uma gama de temperaturas semelhantes às registadas na superfície do solo durante incêndios naturais (de 50 a 150°C) numa gama de tempos de exposição de 1 a 15 minutos. Observou-se que não ocorreram germinações a temperaturas superiores a 130°C, com tempo de exposição igual ou superior a 5 min. No entanto, os tratamentos térmicos moderados (a 70 e 100°C) aumentaram significativamente a taxa de germinação em relação às amostras testemunha. O *C. scoparius* foi mais favorecido pela ação do calor do que a *G. florida*, apresentando taxas de germinação ligeiramente superiores no tratamento de 100°C durante 5 min e de 130 °C durante 1 min, após escarificação mecânica.

Costa (1996) estudou a germinação de sementes de espécies do género *Genista* L., nomeadamente: *G. falcata*, *G. florida*, *G. tournefortii*, *G. anglica* e *G. micrantha*, após escarificação com uma ligeira incisão no tegumento. As sementes escarificadas foram colocadas em estufas, em três gamas de temperatura, 10-20°C, 20-30°C e também, de 10-20°C, durante dois dias, seguida de 20-30°C, designadas por temperaturas conjugadas. A iluminação foi

controlada, com 12 h/dia e 12 h/noite. Verificou-se, então, que as taxas de germinação foram superiores nas sementes sujeitas a temperaturas conjugadas, concretamente, na ordem dos 90% *na espécie C. scoparius* e 50% na *G. florida*.

Gonzalez-Andrés e Ortiz (1996) estudaram os mecanismos de germinação de várias espécies da família Fabaceae, nomeadamente quatro espécies do género *Genista* L.: *G. canariensis*, *G. linifolia*, *G. monspessulana* e *G. tenera*, concluindo sobre a eficácia do método de escarificação ácida com H_2SO_4 (95-97%) e sobre a influência do tempo de 40 minutos de exposição ao ácido. Como resultados obtiveram taxas de germinação de 69 a 100%, num período de 15 a 20 dias, a uma temperatura de 16°C. A taxa de germinação da *G. tenera* foi de 78%, um valor bastante interessante sob o ponto de vista agronómico.

López *et al.* (1999) realizaram um estudo sobre a capacidade de germinação de 30 espécies oriundas da Península Ibérica, pertencentes a nove géneros da tribo Genisteeae, entre as quais, nove espécies do género *Genista* L., nomeadamente: *G. tridentata*, *G. polyanthos subsp hystrix*, *G. triacanthos*, *G. hirsuta*, *G. ânglica*, *G. falcata*, *G. umbellata*, *G. cinerascens* e *G. florida*. Neste trabalho foram aplicados dois tipos de tratamentos de quebra de dormência: imersão em água quente e escarificação ácida. Na primeira técnica foi testado um minuto de imersão das sementes em água fervente. Na segunda técnica foram testados os tempos de exposição de 60 e 90 minutos das sementes ao ácido (H_2SO_4 , 96%). Foi ainda estudada a influência da luz na germinação das sementes em cada tratamento. Os ensaios de germinação ocorreram à temperatura constante de 20°C e humidade relativa de 40-60%, no

caso das amostras com presença de luz, com 8 horas de fotoperíodo de luz branca (fria). O período experimental foi de 30 dias, apresentando-se os resultados no quadro seguinte:

Quadro 1. Taxa de germinação (em %) de sementes de espécies do género *Genista* L., após diferentes tratamentos da semente.

Táxon: Genista L.	C1 %	C2 %	B1 %	B2 %	S1 %	S2 %	S3 %	S4 %
<i>G. tridentata</i>	13.33	10.00	33.33	3.33	43.33	20.00	43.33	50.00
<i>G. polyanthos</i> subsp. <i>Hystrix</i>	16.66	0.00	10.00	6.66	63.33	66.66	76.66	73.33
<i>G. triacanthos</i>	3.33	13.33	66.66	70.00	43.33	63.33	6.66	10.00
<i>G. hirsuta</i>	3.33	3.33	73.33	33.33	96.66	96.66	96.66	86.66
<i>G. anglica</i>	6.66	3.33	33.33	10.00	66.66	33.33	76.66	56.66
<i>G. falcata</i>	6.66	0.00	6.66	0.00	56.66	26.66	93.33	86.66
<i>G. umbellata</i>	3.33	6.66	30.00	16.66	53.33	80.00	66.66	83.33
<i>G. cinerascens</i>	3.33	3.33	43.33	33.33	76.66	83.33	66.66	80.00
<i>G. florida</i>	0.00	0.00	6.66	13.33	46.66	43.33	73.33	50.00

Adaptado de López *et al.* (1999)

LEGENDA: **C** – Amostra de controlo (sementes não escarificadas) com: **(C1)** germinação em condições de luz; **(C2)** germinação na escuridão. **B** - Imersão em água em ebulição durante 1 minuto com: **(B1)** germinação em condições de luz; **(B2)** germinação na escuridão. **S** - Escarificação por imersão em ácido sulfúrico: **(S1)** num período de 60 minutos, com germinação em condições de luz; **(S2)** num período de 60 minutos, com germinação na escuridão; **(S3)** num período de 90 minutos, com germinação em condições de luz; **(S4)** num período de 90 minutos, com germinação na escuridão.

Os resultados obtidos permitiram confirmar que as sementes do género *Genista* L. apresentam tegumento duro, pois as taxas de germinação das sementes submetidas a tratamento de quebra de dormência foi significativamente diferente das taxas de germinação obtidas nas amostras testemunha.

A ação do tratamento de imersão em água quente sobre as sementes de *Genista L.* foi significativamente diferente em 63% dos casos. O tratamento com ácido sulfúrico conduziu a um aumento generalizado das taxas de germinação, relativamente ao método anterior, verificando-se, na maioria das espécies, que as taxas de germinação mais elevadas se situaram no tratamento com exposição de 90 minutos. Em relação ao efeito da luz, não foi significativa a diferença face aos ensaios sem luz.

Num estudo desenvolvido por Papafotiou *et al.* (2000), de propagação de espécies xerófitas da vegetação da Grécia com uso potencial na floricultura, realizaram-se ensaios de germinação de sementes da espécie *G. acanthoclada*. As sementes foram colhidas em plantas selecionadas, no final de junho, tendo sido semeadas sem pré-tratamento de quebra de dormência, em dois meios diferentes: um meio de 1:1 de turfa e perlite e outro meio de 3:2:1 de solo argiloso, turfa e perlite, respetivamente. Obteve-se, assim, uma taxa de germinação máxima na ordem dos 20-35%, no período de dezembro até final de abril (em estufa não aquecida). Este estudo é interessante por reproduzir condições de produção em viveiro, sem recurso a tratamento de sementes, contudo os resultados são pouco interessantes sob o ponto de vista agronómico.

Piotto e Di Noi (2001) salientaram que para escarificar os tegumentos de algumas espécies do género *Genista L.*, nomeadamente: *G. germanica*, *G. hispanica* e *G. pilosa*, alguns autores têm aconselhado o tratamento com ácido sulfúrico durante 30 minutos, seguida de lavagem prolongada e no caso da *G. tinctoria*, estratificação a frio durante 3 meses.

Aprile *et al.* (2011) realizou um estudo das características de germinação para a conservação do germoplasma de algumas “vassouras” presentes na Sicília, nomeadamente de espécies da Tribo Genisteeae Benth (Adans.) Benth, entre as quais, espécies do gênero *Genista* L., nomeadamente: *G. aspalathoides* Lam, *G. aspalathoides* var. *gussonei* e *G. tyrrhena* Valsecchi. Neste trabalho foram realizados tratamentos de quebra de dormência por imersão das sementes em ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄ 96%) em tempos de exposição de 12, 36, 48 e 60 minutos¹⁶. Posteriormente, as sementes foram semeadas em recipientes de poliestireno, numa mistura de 20% de turfa comercial e 80% de areia muito fina¹⁷, colhida nas regiões de onde estas espécies são nativas. Todas as sementes foram colocadas em estufa, sem luz, à temperatura de 24 ± 1°C. O número de sementes germinadas foi registado a cada dois dias e avaliado após 40 dias, sendo determinada a taxa de germinação final e o tempo de germinação médio.

As taxas de germinação mais favoráveis foram obtidas, em todas as espécies, na exposição de 36 minutos ao ácido e as menos favoráveis, na exposição de 60 minutos, respetivamente, com os seguintes valores: *G. aspalathoides* – 50,0%, 18,4% (testemunha – 18%); *G. aspalathoides* var. *gussonei* - 52.6%, 21,0% (testemunha – 21,0%) e *G. tyrrhena* - 55.2%, 10,5.% (testemunha – 5,2%). Os dados recolhidos demonstraram que o tratamento com exposição de 60 minutos ao ácido se aproximou bastante das taxas de germinação das amostras de controlo, evidenciando que o tempo de exposição ao ácido é uma variável decisiva para o sucesso do processo de germinação

¹⁶ Em comparação com uma testemunha.

¹⁷ De acordo com a classificação de solos USDA, de 0,05 a 0,10mm.

de espécies do género *Genista* L.; talvez porque abaixo do ponto ótimo o tegumento não se torne suficientemente permeável e porque acima desse ponto, o ácido poderá ser absorvido através do tegumento, deteriorando o embrião ou destruindo os cotilédones.

Em suma, podemos inferir, com base nos resultados obtidos nestes trabalhos, que as taxas de germinação obtidas em sementes de espécies do género *Genista* L., sujeitas a escarificação ácida, apresentam valores médios a altos, o que perspectivou uma base de trabalho relativamente segura para o delineamento do nosso projeto de investigação. Neste sentido, foi particularmente importante o trabalho de Gonzalez-Andrés e Ortiz (1996), quer pelos resultados interessantes sob o ponto de vista agronómico, quer por se tratar do único trabalho científico encontrado sobre o tratamento das sementes e germinação da espécie *G. tenera*.

Capítulo II

METODOLOGIA DA INVESTIGAÇÃO

No presente capítulo apresentamos a metodologia aplicada na investigação, designadamente, no que respeita aos tratamentos de pré-sementeira utilizados, às condições em que ocorreram os ensaios de germinação, bem como, ao registo e tratamento estatístico de dados obtidos nos ensaios de germinação e sua comparação com trabalhos de referência apresentados na revisão bibliográfica.

1. Ensaio de germinação

A metodologia a aplicar nesta investigação teve como ponto de partida a revisão bibliográfica que estabelecemos no último ponto do capítulo anterior, ainda que contando com informação escassa sobre o comportamento germinativo da *G. tenera* sob ação de tratamentos de quebra de dormência.

Assumimos como condição de base do estudo a disponibilização de uma quantidade exígua de sementes, mais concretamente, de 145 sementes. As sementes para este ensaio foram cedidas pelo Herbário “João de Carvalho e Vasconcelos”, do Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. As sementes foram colhidas na Ilha da Madeira, no verão de 2009. As sementes foram rececionadas em envelope de papel, apresentando-se limpas e sem impurezas.

Dada a reduzida dimensão do lote disponibilizado para o ensaio, foram observadas todas as sementes à lupa binocular, com ampliação de 20x e 40x, procurando identificar as que estavam vácuas ou com lesões no tegumento. Após este controlo foram rejeitadas três sementes vácuas, sendo identificadas 142 sementes em boas condições anatómicas, a utilizar no ensaio. Nas figuras 3 e 4 apresentam-se fotografias macro das sementes de *G. tenera* objeto deste estudo, revelando pormenores de cor, forma, textura e dimensão, observados a olho nu.

Figura 3: Aspeto visível do lote de sementes de *G. tenera*



Foto de Margarida D' Avó (2011)

Figura 4: Dimensão das sementes de *G. tenera*

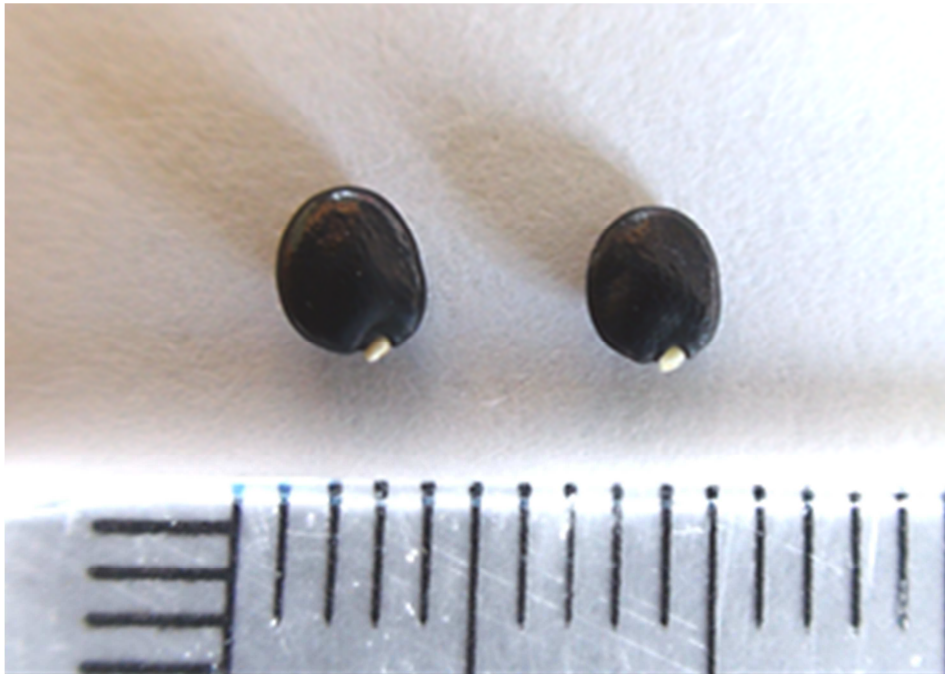


Foto de Margarida D' Avó (2011)

Atendendo, ainda, ao número reduzido de sementes, não foi possível fazer um ensaio preliminar que permitisse estabelecer os limites máximos e mínimos de tempo de exposição ao ácido, assumindo o próprio ensaio de germinação o objetivo de testagem desses limites. Nesse sentido, optou-se por dividir o lote em quatro amostras, de 35 a 36 sementes, uma delas com a função de testemunha e as três restantes, a submeter a tratamento de escarificação com ácido, com três períodos de exposição.

Considerando a dimensão da amostra global, também não foi possível a repetição de ensaios nas quatro modalidades de tratamento da semente, o que, em si mesmo, contraria as regras básicas de investigação de fenômenos biológicos, devendo, idealmente, realizar-se ensaios com três repetições, de forma a poder-se obter, no mínimo, dois valores concordantes.

O tratamento foi elaborado de acordo com os procedimentos recomendados por McDonald (1990) para a escarificação ácida de sementes. Assim, as sementes limpas e secas foram distribuídas em copos de vidro. Em cada copo foi colocado um volume de ácido sulfúrico (H_2SO_4 95-97%), cerca de duas vezes superior ao volume aparente das sementes. Os tempos de exposição ao ácido foram de 10, 20 e 40 minutos, sendo que a amostra testemunha não foi exposta ao ácido. Estes tempos de exposição foram selecionados tendo em conta as metodologias de escarificação ácida desenvolvidas por Gonzalez-Andrés e Ortiz (1996), López *et al.* (1999), Piotto & Di Noi (2001), e Aprile *et al.* (2011).

O contacto das sementes com o ácido foi mantido por agitação mecânica, facilitando a sua digestão e a redução homogénea da espessura dos tegumentos. Após o tempo de exposição predefinido, a digestão dos tegumentos foi interrompida, neutralizando-se o ácido com uma solução de carbonato de sódio a 5%, a que se seguiu uma lavagem das sementes em água corrente.

Atendendo ao relativo desconhecimento dos mecanismos de dormência da *G. tenera* e à escassa investigação sobre a propagação desta espécie pela via seminal, considerou-se a possibilidade de estender o período de ensaio para além dos períodos de 30 a 40 dias, aplicados pela maioria dos autores, cujos trabalhos foram referenciados no último ponto do capítulo anterior. O período de 30 dias para um ensaio de germinação será razoável, não apenas porque é expectável que as sementes devidamente tratadas possam germinar nesse espaço de tempo, mas também, porque é um período técnico-economicamente viável para a germinação de sementes com fins agronómicos.

O ensaio de germinação teve início a 28 de janeiro de 2011 e terminou a 10 de abril de 2011. Para o ensaio da faculdade germinativa usaram-se placas de Petri de material plástico, com um diâmetro de 8,5 cm, cujo fundo foi revestido com uma camada fina de algodão humedecido, coberto posteriormente por papel de filtro, sobre o qual foram dispostas as sementes, que foram cobertas por outra folha de papel de filtro. Por fim, as caixas de Petri foram hermeticamente fechadas com película do tipo “parafilm” e identificadas com a data e a modalidade do tratamento nos bordos da tampa, utilizando marcador de acetato.

Apresenta-se, na figura 5, a disposição de uma amostra de sementes sobre o papel de filtro humedecido.

Figura 5: Distribuição de sementes de *G. tenera* em placa de Petri com fundo humedecido.



Foto de Margarida D'Avó (2011)

Devido à escassa informação bibliográfica sobre a temperatura ótima de germinação da espécie em estudo, considerou-se adequada a temperatura de 22°C, que se integra na gama de temperaturas médias dos meses de verão na ilha da Madeira.

Foram identificadas e registadas as sementes germinadas, de dois em dois dias, no período de ensaio (ver anexo II). Considerou-se que uma semente estava germinada quando ocorria a eclosão visível da radícula (figuras 6 e 7).

Figura 6: Ecloração da radícula na semente de *G. tenera*.



Foto de Margarida D'Avó (2011)

Figura 7: Semente de *G. tenera* com radícula germinada há dois dias.



Foto de Margarida D'Avó (2011)

No período de 74 dias de ensaio, para além das sementes germinadas, também foram identificadas e registadas as sementes com sinais de ataque por fungos, revelando ausência de faculdade germinativa (ver quadro 2).

2. Análise estatística de resultados

Finalizado o ensaio, foram calculadas as taxas de germinação com base no número de germinações registadas de dois em dois dias, nos quatro ensaios paralelos. A taxa de germinação (**TG**), apresentada em percentagem, foi calculada de acordo com a seguinte expressão, em que **n** é o n.º de sementes germinadas e **N**, o número total de sementes.

$$TG \% = \frac{n}{N} \cdot 100$$

Foram igualmente calculadas as taxas de sementes perdidas pelo aparecimento de fungos, em todas as amostras ensaiadas.

Para medir a associação das distribuições das taxas de germinação observadas ao longo dos ensaios, recorreremos ao cálculo de coeficientes de correlação de Pearson¹⁸, entre cada uma das amostras escarificadas com ácido, considerando-se expectável que a relação entre a germinação das sementes e o tempo de ensaio fosse minimamente linear (Marôco, 2010). Estas correlações foram calculadas com recurso ao software “RExcel” compatível com “Microsoft Excel 2010”.

Para determinar se as diferenças amostrais observadas, nos valores médios e medianos das variáveis, sugeriam diferenças entre as respetivas populações ou se eram apenas variações casuais esperadas entre amostras aleatórias da mesma população, recorreremos a técnicas de inferência estatística

¹⁸ Tipo de correlação adequada para associar variáveis de natureza quantitativa e intervalar.

não-paramétrica, dado que as variáveis consideradas não provinham de populações com distribuição normal ou aproximadamente normal, mesmo depois de efetuadas transformações matemáticas para simetrizar os dados e homogeneizar as variâncias (Marôco, 2010).

Para avaliar se o tratamento com ácido (H₂SO₄_0 min. – tratamento testemunha; H₂SO₄_10 min, – 10 minutos; H₂SO₄_20 – 20 minutos e H₂SO₄_40 – 40 minutos de exposição ao ácido) influenciou significativamente a percentagem de germinação, recorreu-se ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido da comparação múltipla de médias. Usou-se uma probabilidade de erro tipo I (α) de 0,05. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado com recurso ao software PASW Statistics (v.18, SPSS Inc. Chicago, IL).

Capítulo III

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

No presente capítulo apresentamos os resultados obtidos nos ensaios de germinação, obtidos por via estatística descritiva e por via de inferência estatística não-paramétrica, analisando e interpretando esses resultados com base nos resultados obtidos por outros autores em estudos similares, referenciados no ponto 4.5. do Capítulo I.

Como foi referido, no capítulo anterior, foram realizadas contagens de sementes germinadas, de dois em dois dias. Nesse sentido, tendo em conta a necessidade de comparação de resultados entre amostras, com número diferente de sementes¹⁹, optou-se por calcular as taxas de germinação em cada amostra, nessa frequência de medição. Apresenta-se, assim, a evolução das taxas de germinação em cada ensaio, no gráfico da figura 8 (ver, também, anexos II e III).

Figura 8 – Evolução das taxas de germinação nas quatro amostras ensaiadas.

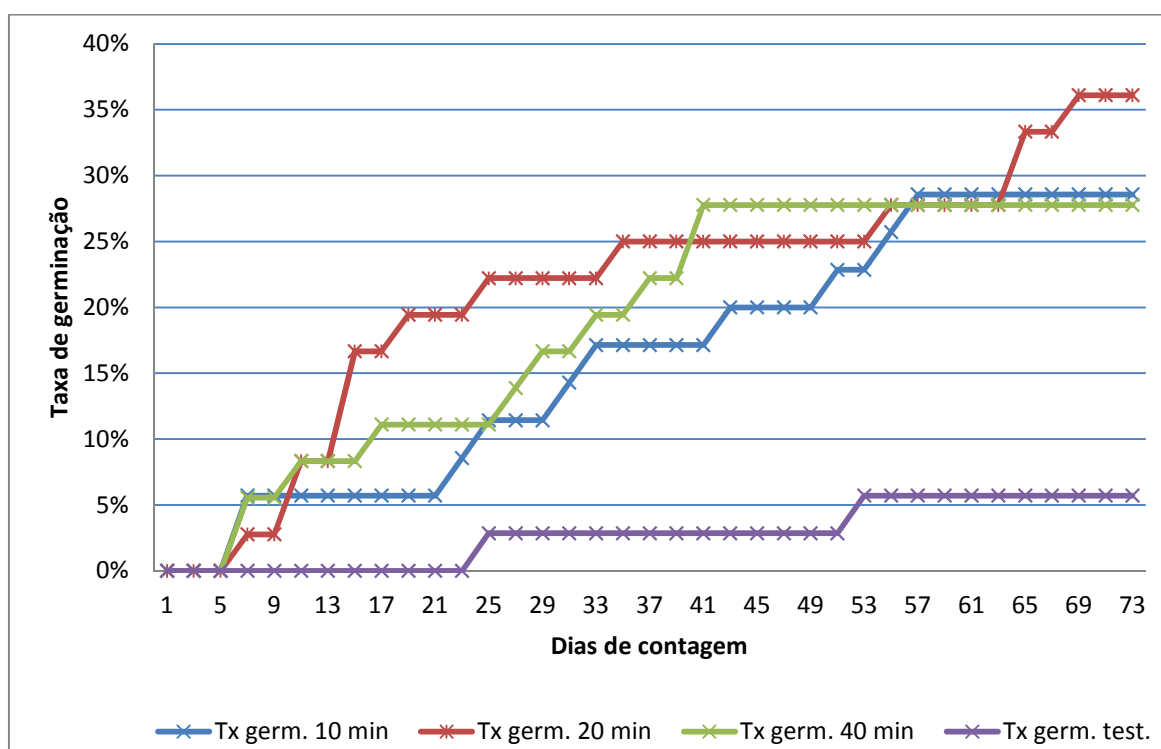


Gráfico elaborado em "Microsoft Excel 2010" por Margarida D'Ávo (2011)

As taxas de germinação máximas obtidas aos 73 dias, à temperatura de 22°C, foram, nos quatro ensaios: H₂SO₄_0min. (testemunha) - 5,7%; H₂SO₄_10 min. - 28,6%; H₂SO₄_20 min. - 36,1%; H₂SO₄_40 min. - 27,8%.

¹⁹ Duas amostras com 35 sementes e duas amostras com 36 sementes.

Se analisarmos os comportamentos de germinação das três amostras sujeitas a escarificação ácida, ao longo do período de ensaio, verificamos existirem correlações²⁰ fortes entre si, quanto à evolução das taxas de germinação, traduzindo a germinação progressiva e relativamente sincronizada das sementes ao longo dos 73 dias de ensaio. Destacam-se as correlações de valor inferior, estabelecidas entre a amostra com exposição de 20 minutos ao ácido e as outras duas amostras – $R(\text{H}_2\text{SO}_4_{20\text{min.}} \times \text{H}_2\text{SO}_4_{10\text{min}}) = 0,891$ e $R(\text{H}_2\text{SO}_4_{20\text{min.}} \times \text{H}_2\text{SO}_4_{40\text{min}}) = 0,901$ – dado que esta amostra evidenciou um comportamento germinativo ligeiramente diferente das outras duas, ao longo do ensaio.

Numa abordagem direta deste gráfico, podemos observar que a taxa de germinação mais elevada resultou de germinação tardia na amostra $\text{H}_2\text{SO}_4_{20}$ min, a partir do dia 65, quando já não se verificavam germinações na amostra $\text{H}_2\text{SO}_4_{40}$ min, desde o dia 41 e na amostra $\text{H}_2\text{SO}_4_{10}$ min., desde o dia 57. Esta tendência também foi acentuada pelas taxas de germinação superiores, observadas na amostra $\text{H}_2\text{SO}_4_{20}$, do dia 15 ao dia 39 do ensaio²¹. Quanto à evolução na germinação das amostras $\text{H}_2\text{SO}_4_{10}$ min. e $\text{H}_2\text{SO}_4_{40}$ min., sendo relativamente semelhante, evidenciou-se uma germinação ligeiramente mais precoce na segunda, até ao dia 41, culminando em valores idênticos (com variação de 0,8%).

²⁰ Correlações de Pearson (R).

²¹ Período que compreende a maioria dos tempos de ensaio de germinação considerados pelos autores referenciados na revisão bibliográfica, designadamente, o período habitual de 30 dias.

Não se verificou, então, uma tendência de resposta progressiva da germinação à intensidade de escarificação do tegumento, dado que, em cerca de metade do tempo de ensaio, a amostra H₂SO₄_20 obteve taxas de germinação superiores às das amostras com maior e menor tempo de exposição ao ácido. Analisando a evolução das taxas de germinação nas três amostras sujeitas a escarificação ácida, podemos estabelecer como hipótese explicativa, apesar das diferenças pouco significativas entre os três ensaios, que o tratamento com exposição de 10 minutos não tenha reduzido suficientemente a espessura do tegumento e que, pelo contrário, o tratamento com exposição de 40 minutos possa ter reduzido demasiado a espessura do tegumento de algumas sementes, com penetração na semente e destruição dos embriões, o que poderá justificar a germinação mais precoce das sementes válidas e a paragem na germinação, a partir do dia 41 (possivelmente, devido à presença de sementes inviáveis).

Face ao exposto no parágrafo anterior, constatou-se também uma exceção à tendência apontada, no período entre o dia 41 e o dia 55, em que se observou uma resposta progressiva das taxas de germinação dos três ensaios (na amostra H₂SO₄_10 min. de 17,1% a 25,7%; na H₂SO₄_20 min. de 25,0 a 27,8% e na amostra H₂SO₄_40 min. de 27,8%). Contudo, trata-se de um período curto nos ensaios de germinação, que se localiza para além do limite de tempo considerado na maioria dos ensaios de germinação referenciados, não possuindo, por isso, um significado agronómico apreciável.

Comparando os resultados obtidos com os obtidos por Gonzalez-Andrés e Ortiz (1996), com sementes de *G. tenera* expostas ao ácido (H₂SO₄) durante

40 minutos, num ensaio de germinação desenvolvido num período de apenas 15 a 20 dias, à temperatura de 16°C, podemos constatar que os valores que obtivemos se situaram bastante abaixo da taxa de germinação de 78% obtida por esses autores. Neste sentido, nenhum dos ensaios que realizámos se aproximou do potencial da espécie comprovado nesse estudo, nem das restantes três espécies de *Genista* L. estudadas (com taxas de germinação de 69 a 100%).

Confrontados os nossos resultados com os obtidos no estudo de Papafotiou *et al.* (2000), de germinação da espécie de *G. acanthoclada*, sem tratamento das sementes, no final de inverno-primavera, verificámos que as taxas de germinação que obtivemos nas amostras com escarificação ácida se situaram na faixa de valores (de 20 a 35%) obtidos nesse estudo, realizado em condições, aparentemente, menos favoráveis do que as fornecidas à nossa amostra testemunha, que apenas obteve uma taxa germinação de 5,7%.

Comparando, ainda, os resultados obtidos no nosso estudo, com os obtidos nos dois trabalhos considerados, parece poder afastar-se a hipótese de que a *G. tenera* possua menor capacidade germinativa do que outras espécies do género *Genista* L, ganhando expressão a hipótese de que o lote de sementes que estudámos se diferenciou, significativamente, dos lotes estudados por esses autores, no que respeita às condições de germinação. Todavia, também não devemos excluir a hipótese de ocorrência de erros sistemáticos condicionadores do processo de germinação, tais como a falta de desinfeção das sementes, que poderá ter permitido a sua contaminação com fungos.

No decorrer dos ensaios, foram, também, identificadas e quantificadas as sementes que apresentavam sinais de ataque por fungos, indicadores de deterioração dos cotilédones e do embrião e por consequência, sinais indiciadores da sua incapacidade germinativa. Apresenta-se, no quadro 2, o número de sementes atacadas por fungos, em cada amostra.

Quadro 2 – Taxas de sementes atacadas por fungos nas amostras ensaiadas

Amostras	H ₂ SO ₄ _0min.	H ₂ SO ₄ _10min.	H ₂ SO ₄ _20min.	H ₂ SO ₄ _40min.
N.º sem. inviáveis	5	10	4	2
% sem. inviáveis	13,9%	28,6%	11,1%	5,6%

Verificaram-se perdas relevantes de sementes, acima de 10% na amostra testemunha e nas amostras com exposição de 10 e 20 minutos ao ácido. Na amostra H₂SO₄_10min. perderam-se 28,6% das sementes, valor igual à taxa de germinação máxima obtida nessa amostra. Registrando-se o valor mais baixo de perdas na amostra mais exposta ao ácido (H₂SO₄_40 min.), afastamos, em boa medida, a hipótese de que a exposição excessiva ao ácido possa ter deteriorado parte das sementes. Atendendo ao número considerável de sementes perdidas em cada amostra parece reforçar-se a possibilidade de o lote de sementes objeto de estudo apresentar fraca capacidade germinativa.

Ao confrontarmos os nossos resultados com os obtidos por López *et al.* (1999), confirma-se também a necessidade de em espécies do género *Genista* L. se efetuarem tratamentos de quebra de dormência física das sementes para se promover a germinação. Segundo estes autores, a taxa de germinação máxima (aos 30 dias de ensaio) obtida em espécies de *Genista* L., sem tratamento, foi de cerca de 17%, ocorrendo, na maioria das espécies, valores

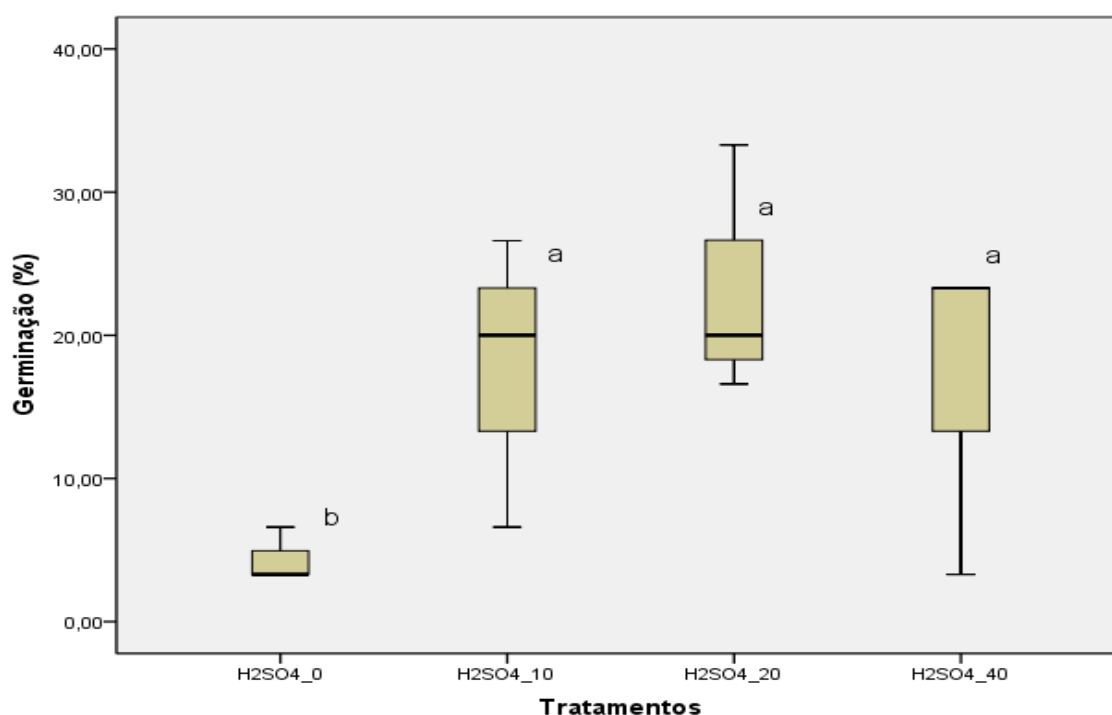
inferiores aos obtidos na nossa amostra testemunha (5,7%). Quanto aos resultados da escarificação ácida apresentados nesse estudo, na maioria das espécies, as taxas de germinação foram superiores às que obtivemos, contudo, resultaram de tempo de exposição ao ácido bastante superior ao que utilizámos (de 60 e 90 minutos), o que nos leva a colocar como hipótese que a digestão ácida que produzimos nos nossos ensaios possa não ter sido suficiente para reduzir a espessura dos tegumentos até ao ponto de germinação eficaz, contudo, paradoxalmente, a nossas melhores taxas de germinação foram obtidas na exposição de 20 minutos e não de 40 minutos. No entanto, a germinação que continuámos a observar, para além dos 30 dias de ensaio, em todas as amostras sujeitas a escarificação ácida, poderá significar que a dormência física das sementes foi, apenas, parcialmente quebrada, sendo as diferenças de germinação entre amostras pouco expressivas e globalmente pouco eficazes.

Comparando os nossos resultados com os apresentados por Aprile *et al.* (2011) para três espécies do género *Genista* L., com diferentes tempos de exposição ao ácido (12, 24, 36, 48 e 60 minutos), verificámos, com exceção da exposição ao ácido de 36 minutos, em que nesse estudo se obtiveram taxas de germinação acima de 50%, haver maior similitude entre as taxas de germinação obtidas na exposição de 60 minutos, entre 10,5-31,5%, sendo que, aos 35 dias de ensaio, obtivemos como resultado taxas de germinação entre 17,1-25,0%. Tal resultado poderá traduzir um período de escarificação ineficaz, levantando-se a hipótese de que o tempo de escarificação ideal para o lote de sementes de *G. tenera* se pudesse situar entre 20 e 40 minutos.

Avaliando estatisticamente a distribuição de resultados nas três amostras, com recurso ao teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, verificámos que a digestão ácida das sementes teve um efeito estatisticamente significativo sobre a taxa de germinação das sementes ($X^2_{KW}(3) = 14,343$; $p = 0,002$ e $n = 36$).

Na figura 9, apresentamos o diagrama de extremos e quartis, em que as distribuições assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Figura 9. Diagrama de extremos e quartis das quatro amostras ensaiadas



Obtido em PASW Statistics (v. 18, SPSS Inc. Chicago, IL)

A linha a negrito representa a mediana enquadrada entre o 1º Quartil (extremo inferior da caixa) e o 3º Quartil (extremo superior da caixa). As barras inferiores e superiores representam, respetivamente, o mínimo e o máximo das distribuições não *outliers*, não se verificando a presença de *outliers* nem de valores extremos.

Pela comparação múltipla de médias, para $\alpha < 0,05$, verificou-se que os tratamentos com ácido apresentaram uma distribuição de percentagens significativamente diferente do tratamento testemunha: H₂SO₄_0 min. ($p = 0,011$); H₂SO₄_10 min. ($p = 0,003$) e H₂SO₄_20 min. ($p = 0,001$). Este é, pois, o resultado mais significativo deste trabalho, dado que confirma a redução da espessura de sementes de *G. tenera* como uma das premissas para a eficácia da sua germinação, corroborando, assim, a experiência dos autores referenciados no capítulo I, quer para a *G. tenera*, quer para outras espécies do género *Genista* L..

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Concluimos a dissertação com uma síntese dos resultados relevantes obtidos na investigação, avaliando o seu valor agronómico, mas também limitações científicas comportadas na sua interpretação e transposição para os contextos produtivos, sugerindo-se, assim, novas linhas de estudo, a considerar em futuros projetos de investigação sobre a germinação na espécie *G. tenera*.

Começamos por concluir sobre a metodologia de investigação aplicada, porque será, em larga medida, a principal limitação ao rigor e valor científico do nosso estudo, relacionando-se em larga medida com o lote de sementes.

A metodologia foi concebida tendo como pressuposto um número muito reduzido de sementes, sobre as quais se desconheciam as condições de colheita e de armazenamento. Nessas circunstâncias tornou-se impossível avaliar com rigor a estabilidade genética do lote de sementes, isto é, a sua representatividade face à população endémica em que teve origem. Porém, mais do que os dois anos de conservação após a colheita, o desconhecimento das condições de conservação poderá ter sido o principal problema deste estudo, pelo condicionamento potencial da faculdade germinativa que essas condições envolvem. O número de sementes perdidas durante o ensaio poderá ser um indicador do processo de degradação das sementes. Nesse sentido, os resultados obtidos poderão ser mais reveladores do efeito do ambiente pós colheita sobre a qualidade das sementes, do que do potencial genético das sementes para germinar em condições favoráveis, tratando-se de um estudo parcial e por isso, parcialmente inconclusivo .

Pelas razões expostas, a cientificidade que envolveu o processo de investigação poderá ter sido condicionada pela dimensão da amostra global, pela impossibilidade de repetir ensaios, pelo reduzido número de sementes utilizado em cada ensaio (35-36 sementes) e pela impossibilidade de realizar mais ensaios, quer no estudo da mesma variável (exposição ao ácido), quer no estudo de outras variáveis correlacionadas, como outros tratamentos da

semente (por exemplo a imersão em água quente), ou outras condições de germinação (luz, temperatura, humidade).

Propusemo-nos, assim, estudar o efeito da escarificação ácida sobre os tegumentos das sementes de *G. tenera*, nesse sentido, foram ensaiadas três modalidades de escarificação, com a exposição da semente ao ácido sulfúrico (H_2SO_4 95-97%), de 10, 20 e 40 minutos.

Os resultados obtidos nos ensaios de germinação permitiram comprovar a eficácia do tratamento de sementes de *G. tenera* por escarificação ácida, ao longo de 73 dias de ensaio, à temperatura constante de 22°C, dado que, nas amostras sujeitas a tratamento, as taxas de germinação se diferenciaram, de forma estatisticamente significativa, das taxas de germinação obtidas na amostra do ensaio em branco. Constatámos, assim, que a dureza do tegumento poderá ter sido um fator condicionante da germinação e por consequência, da viabilidade técnico-económica da operação de sementeira em sementes desta espécie; facto que justifica o tratamento da semente por escarificação ácida do tegumento.

Todavia, verificou-se nas amostras ensaiadas que a taxa de germinação obtida foi inferior a 25%, aos 30 dias de ensaio²², resultado pouco interessante sob o ponto de vista técnico-económico.

Em cerca de metade do tempo de ensaio, verificou-se uma tendência pouco expressiva de taxas de germinação mais elevadas na amostra com exposição de 20 minutos das sementes ao ácido, nesse sentido, podemos considerar plausível que o tratamento com exposição de 10 minutos não tenha reduzido suficientemente a espessura do tegumento e que, pelo contrário, o

²² Valor de referência em ensaios de germinação, considerado pela maioria dos autores.

tratamento com exposição de 40 minutos possa ter reduzido demasiado a espessura do tegumento, com risco de penetração na semente e de ocorrência de lesões. Contudo, esta hipótese explicativa não corrobora resultados obtidos noutros estudos, pelo que sentimos a necessidade de estudar outros tempos de exposição das sementes ao ácido, designadamente entre 20 e 40 minutos e acima de 40 minutos.

Para além da dormência física que estudámos, os resultados obtidos parecem sugerir a possível presença de mecanismos de dormência fisiológica. Assim, há que formular a hipótese complementar de que a dureza da semente não tenha sido o único mecanismo condicionador da germinação de sementes de *G. tenera*. Cabe-nos, pois, sugerir, que em futuros projetos de investigação sobre a germinação da *G. tenera*, se possa estudar, de forma exclusiva e/ou complementar com a escarificação das sementes, o efeito dos tratamentos de quebra da dormência fisiológica das sementes, sobre o processo de germinação.

Tarrega (1992) e Rega (2007) referem a necessidade de utilizar temperaturas elevadas no tratamento das sementes, dado que algumas espécies do género *Genista* L. germinam particularmente bem no seu meio natural, após fogo. Apesar dessa condição não parecer determinante na *G. tenera*, por ser uma espécie endémica adaptada a um clima de verões mais frescos e húmidos, será, ainda assim, provável, que as variações de temperatura entre o verão e o inverno possam ter alguma influência sobre a maturação da semente²³, podendo ser útil o tratamento da semente por

²³ Sendo plausível a existência de mecanismos de dormência fisiológica, que dificultem a germinação no verão – período mais seco do ano – possibilitando a germinação no inverno-primavera com maior humidade no solo.

imersão em água quente (López *et al.*, 1999), ou por estratificação em frio húmido (Piotto e Di Noi, 2001), ou até, pela combinação dos dois tratamentos.

Como já foi referido, o âmbito pontual do nosso estudo sugere, à partida, que se possa repetir sob condições científicas mais favoráveis, designadamente: (1) com maior quantidade de sementes; (2) com sementes colhidas em diferentes plantas-mãe e corretamente conservadas; (3) com diferentes amostras de sementes por cada modalidade de tratamento. Ainda neste capítulo, sugerimos, igualmente, o estudo de diferentes temperaturas nos ensaios de germinação, quer em nível constante, quer de forma combinada (Costa, 1996), precisamente, pelo papel que podem desempenhar nos mecanismos de inibição da germinação.

Finalizamos estas conclusões, acreditando que os resultados obtidos no presente estudo, lidos com a necessária prudência, inspiram o prosseguimento da investigação agronómica das técnicas de germinação na espécie *G. tenera*, possibilitando posteriores estudos na área fitoquímica, que permitam comparar o valor fitofarmacológico de plantas propagadas em diferentes ambientes produtivos com as populações endémicas em que tiveram origem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências e citações respeitam as normas APA 6.^a Edição.

- Aprile, S.; Airó M.; Zizzo G. V.; Lazzara S.; Trapani C.; Giardina G. (2011). *Study of germination characteristics for germplasm protection and exploitation of some brooms present in Sicily (Italy)*. *Acta Hort.*, 898, 77-80.
- Aslan, M.; Orhan D. D.; Orhan N.; Sezik E.; Yesilada E. (2007). In vivo antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum capitulum* in streptozotocin-induced-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 54-59.
- Azzioui, O. (1999). Etude du tegument des graines du genre *Genista* L. (Fabaceae) au Maroc. *Acta Botanica Malacitana*, 24, 43-51.
- Biodiversity Heritage Library - Bibliography for "Genista tenera" by page. (n.d.) Retrieved May 21, 2012, from http://www.biodiversitylibrary.org/name/Genista_tenera.
- Boissier, E. (1839-1845). *Voyage botanique dans le Midi de l'Espagne pendant l'Année 1837*. Paris :
- Borges, C.; Martinho P.; Martins A.; Rauter A. P.; Almoester Ferreira M. A. (2001). Structural characterization of flavonoids and flavonoid-O-glycosides extracted from *Genista tenera* by fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15, 1760-1767.
- Brant, E. R., McKee G. W. and Cleveland R. W. (1971). Effect of chemical and physical treatment on hard seed of penngift crowvetch. *Crop Science*, 11, 1-6.
- Brotero, F. (1804). *Flora Lusitanica* (Vol.2, pp. 86-90). Lisboa: Typographia Regia.
- Câmara Municipal do Funchal (2010) *Plano de Recuperação do Parque Ecológico do Funchal*. Recuperado em 20 janeiro, 2012 de http://www1.cm-funchal.pt/ambiente/images/stories/parque_ecologico/Destaques/2010/12/PlanoRecuperacaoPecof/PECOF_PlanoRecuperacao_Final.pdf.
- Castroviejo, S. (1999). *Flora Iberica* (Vol.2). Madrid: Real Jardín Botánico.
- Costa, E. (1996). *Taxonomia de géneros da tribo Genisteeae*. Tese de doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal.
- Coutinho, A. X. P. (1939). *Flora de Portugal (Plantas vasculares)*. *Disposta em chaves dicotómicas* (2a ed.). Lisboa: Bertrand (Irmãos).
- Cunha, A.P. (2009). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

- De Candolle A. P. (1825). *Prodomus Systematis Naturalis. Regni Vegetabilis* (Vol.1, pp.145-153). Paris: Argentorati et Londini.
- Edwards, E. L.; Rodrigues J. A.; Ferreira, J.; Goodall, D. M.; Rauter, A. P.; Justino, J.; Thomas-Oates, J. (2006). Capillary electrophoresis-mass spectrometry characterisation of secondary metabolites from the anti-hyperglycemic plant *Genista tenera*. *Electrophoresis*, 27, 2164-2170.
- Endlicher, S. (1836-1840). *Genera Plantarum Secundum Ordines Naturales Disposita*, 1266-1267.
- Exner, M.; Hermann M.; Hofbauer R.; Kapiotis S.; Quehenberger P.; Speiser W.; Held I.; Gmeiner B. M. K. (2001). Genistein prevents the glucose autoxidation mediated atherogenic modification of low density lipoprotein. *Free Radical Research*, 34, 101-112.
- Ferreira, F. R. (1996). *Conservação de germoplasma-semente no CENARGEN e interface com os BAGs*. In J. P. Puignau (Ed.) *Diálogo XLV. Conservacion de Germoplasma Vegetal* (pp.69-73). Montevideo, Uruguay: IICA.
- Franco, J. A. (1971). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)* (Vol. 1). Lisboa.
- González-Andrés, F.; Ortiz, J. M. (1996). Potencial of *Cytisus* and allied genera (Genisteae: Fabaceae) as forage shrubs. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 39, 195-204.
- Gonzalez, G. L. (1982). Sobre la correcta identificación de *Genista lusitanica* L. (*Echinopartum lusitanicum* (L.) Rothm.) *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 39, 49-52.
- Guppy, H.B. (1912). *Studies in seeds and fruits*. London: Williams & Norgate.
- Harborne, J. B. (1994). Plants and their constituents. In Harborne, J. B. (Ed.). *Phytochemical Dictionary of Leguminosae* (Vol. 1, pp.313-330). London: Chapman & Hall.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.
- Jardim, R.; Francisco D. (2000). *Flora Endémica da Madeira*. Funchal: Múchia Publicações.
- Ji, H. F.; Zhang, H. Y. (2006) - Theoretical evaluation of flavonoids as multipotent agents to combat Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Structure: Theochem*. Elsevier, 767, 3-9.
- Jung, M.; Park M.; Lee H. C.; Kang, Y. H.; Kang E. S.; Kim, S. K. (2006). Antidiabetic agents from medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry*, 13, 1203-1218.
- Kaur, I. P.; Geetha, T. (2006) - Screening methods for antioxidants. *A review. Mini-Reviews in medicinal Chemistry*, 6, 305-312.
- Kilen, T. C.; Hartwing, E. E. (1978). An inheritance study of impermeable seed in soybeans. *Field Crops Research*, 1, 65-70.

- Lazaro, J. L.; Leopold, A. C. (1988). The Physiology and Genetics of Seed Ageing. In CIMMYT (Ed.) *Recent advances in the conservation and utilization of genetic* by Russel N.; México: Listman G. M. 83.
- Lineu, C. (1753) - *Species plantarum*, 2, 709-711.
- López, J.; Devesa, J. A.; Ruiz, T.; Ortega-Olivencia, A. (1999). Seed germination in Genisteae (Fabaceae) from South-West Spain. *Phyton*, 39, 107-129.
- Mariappan, D.; Winkler, J.; Parthiban, V.; Doss, M. X.; Hescheler, J.; Sachinidis, A. (2006). Dietary small molecules and large-scale gene expression studies: an experimental approach for understanding their beneficial effects on the development of malignant and non-malignant proliferative diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 13, 1481-1489.
- Marôco, J. (2010). *Análise Estatística com o PASW Statistics (ex-SPSS)*. Pêro Pinheiro: ReportNumber, Lda.
- Martins, A.; Wink M.; Tei, A.; Brum-Bousquet, M.; Tillequin, F.; Rauter, A. P. (2005). A phytochemical study of the quinolizidine alkaloids from *Genista tenera* by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 16, 264-266.
- McDonald, B. (1990). *Practical woody plant propagation for nursery growers (Vol.1)*. London: B. T. Batsford Ltd.
- Michael, J. P. (2002). Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Natural Product Reports*, 19, 719-741.
- Omoigui, O. S. (2006). Method of prevention and treatment of aging and age-related disorders e.g. peripheral vascular disease, coronary artery disease, arthritis, Alzheimer disease involves administration of components inhibiting specific interleukin mediated inflammation. Patent nrs. US 2006/0078533.
- Ortega, C. G. (1798). *Novarum aut rariorum plantarum*. *Horti Reg. Botan. Matrit.* 68, 137.
- Papafotiou, M., Triandaphyllou, N., Chronopoulos, J. (1999). Studies on propagation of species of the xerophytic vegetation of Greece with potencial floricultural use. *Acta Horticulturae*, 541, 269-272.
- Peluso, M. R. (2006). Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Experimental Biology and Medicine*, 231, 1287-1299.
- Perez, R. M.; Zavala, M. A.; Perez, S.; Perez, C. (1998). Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. *Phytomedicine*, 5, 55-75.
- Piotto, B.; Di Noi, A. (2001). *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. Itália: Agenzia Nazionale per la protezione dell' Ambiente.
- Quedas, F. (2001). *Apontamentos sobre Melhoramento de Plantas*. Santarém: Escola Superior Agrária de Santarém.

- Rauter, A.P.; Martins, A.; Borges C.; Ferreira, J.; Justino, J.; Bronze, M. R.; Coelho, A. V.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. (2005). Liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycemic flavonoid extract of *Genista tenera* structure elucidation of a flavonoid-C-glycoside. *Journal of Chromatography A* (Elsevier) 1089, 59-64.
- Rauter, A. P. ; Martins, A.; Borges, C.; Mota-Filipe, H.; Pinto, R., Sepodes, B.; Justino, J. (2010). Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 24, 133-138.
- Rauter, A. P.; Martins A.; Lopes, R.; Ferreira, J.; Serralheiro, L. M.; Araújo, M. E.; Borges, C.; Justino, J.; Silva, F. V.; Goulart, M.; Thomas-Oates, J.; Rodrigues, J. A.; Edwards, E.; Noronha, J. P.; Pinto, R.; Mota-Filipe, H. (2009). Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 384-393.
- Rauter, A.P.; Lopes, R. G.; Martins, A. (2007). C-Glycosylflavonoids: Identification, Bioactivity and Synthesis. *Natural Product Communications*, 2, 1175-1196.
- Rega, M. (2007). *Filogenesi del genere Genista L. (Fabaceae): evidenze molecolari e morfologiche*. Tesi di Dottorato in Biologia Avanzata. Napoli: Università Degli Studi di Napoli Federico II.
- Rolston, M. P. (1978). Water impermeable seeds dormancy. *The Botanical Review*, 44, 365-396.
- Russel, N.; Istman G. M. (Ed.) (1988) *Recent Advances in the Conservation and Utilization of Genetic Resources. Proceedings of the global maize germplasm workshop*. México: CIMMYT.
- Sampaio, G. (1990) - *Flora Portuguesa (4a ed.)*. Porto: INIC
- Sonee, M.; Sum, T.; Wang, C.; Mukherjee, S. K. (2004). The soy isoflavone, genistein, protects human cortical neuronal cells from oxidative stress. *NeuroToxicology*. Elsevier, 25, 885-891.
- Song, Y.; Manson, J. E.; Buring, J. E.; Sesso, H. D.; Liu, S. M. (2005). Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *Journal of the American College of Nutrition*, 24, 376-384.
- Tarega, R.; Calvo, L.; Trabaud, L. (1992). Effect of high temperatures on seed germination of two woody leguminosae. *Plant Ecology*, 102, 139-147.
- Vahl, M. (1790-94). *Symbolae botanicae sive plantarum*. N. Muller et filius. pp. 51-52.
- Valois, A. C. C. (1996). Conservação de germoplasma vegetal "ex situ". In J. P. Puignau (Ed.) *Diálogo XLV. Conservacion de Germoplasma Vegetal (pp.7-11)*. Montevideo, Uruguay: IICA.

Vieira, R. (1992). Flora da Madeira. O interesse das plantas endémicas Macaronésicas (Coleção Natureza e Paisagem, 11), Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza.

Vítor, R. F.; Mota-Filipe, H.; Teixeira, G.; Borges, C.; Rodrigues, A. L.; Teixeira, A.; Paulo, A. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum*, showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 363-370.

Wilkinson, D. G; Francis, P. T; Schwam, E.; Payne-Parrish, J.; (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs & Aging*, 21, 453-478.

ANEXOS

Anexo I – Revisão bibliográfica da caracterização taxonómica do género Genista L.

Anexo II – Dados obtidos nos ensaios, expressos em sementes germinadas

Anexo III – Dados obtidos nos ensaios, expressos em taxas de germinação

Anexo I – Revisão bibliográfica da caracterização taxonómica do género *Genista* L.

Caraterização Taxonómica	Autores
Plantas inermes: <i>G. canariense</i> ; <i>G. sagittalis</i> ; <i>G. tridentata</i> ; <i>G. tinctoria</i> e <i>G. pilosa</i> .	Lineu (1753)
Plantas com espinhos: <i>G. anglicana</i> ; <i>G. germânica</i> ; <i>G. hispânica</i> e <i>G. lusitanica</i> .	"Species Plantarum"
Espécies: <i>G. triacanthos</i> ; <i>G. polygalaephylla</i> (posteriormente <i>G. florida</i> L.); <i>G. parviflora</i> ; <i>G. falcata</i> e <i>G. algarbiensis</i> .	Brotero (1804) "Flora Lusitanica"
Espécies: <i>G. parviflora</i> ; <i>G. clavata</i> (Poir); <i>G. canariensis</i> L.; <i>G. mollis</i> ; <i>G. candicans</i> L.; <i>G. patens</i> ; <i>G. linifolia</i> L.; <i>B. biflora</i> ; <i>G. triquetra</i> (Ait); <i>G. bracteolada</i> (Link); <i>G. microphylla</i> ; <i>G. sessilifolia</i> DC.; <i>G. radiata</i> (Scop.); <i>G. horrida</i> (DC.); <i>G. lusitanica</i> L.; <i>G. tridens</i> (Cav.); <i>G. acanthoclada</i> (DC.); <i>G. ephedroides</i> (DC.); <i>G. lobelii</i> (DC.); <i>G. salzmanni</i> (DC.); <i>G. aspalathoides</i> (Lam.); <i>G. ferox</i> (Poir); <i>G. cupani</i> (Guss); <i>G. cuspidosa</i> ; <i>G. tricuspidata</i> (Desf.); <i>G. gibraltarica</i> ; <i>G. sylvestris</i> (Scop.); <i>G. egyptiaca</i> (Spreng); <i>G. aphylla</i> ; <i>G. virgata</i> ; <i>G. falcata</i> (Brot.); <i>G. scarpus</i> (DC.); <i>G. hispanica</i> (L.); <i>G. anglica</i> (L.); <i>G. purgans</i> (L.); <i>G. ramosissima</i> (Poir); <i>G. cinerea</i> (DC.); <i>G. congesta</i> ; <i>G. sericea</i> (Wolf); <i>G. humifusa</i> (L.); <i>G. sphaerocarpa</i> (Lam.); <i>G. aethensis</i> ; <i>G. multicaulis</i> (Lam.); <i>G. tetragona</i> (Besser); <i>G. tenuifolia</i> (Loisel); <i>G. depressa</i> (Bieb.); <i>G. scariosa</i> (Viv.); <i>G. anxantica</i> (Ten.); <i>G. sibirica</i> ; <i>G. florida</i> (L.); <i>G. polygaleifolia</i> ; <i>G. mantica</i> (Pool); <i>G. ovata</i> (Waldst); <i>G. patula</i> (Bieb.); <i>G. triangularis</i> (Willd.); <i>G. sagittalis</i> (L.); <i>G. tridentata</i> (L.); <i>G. diffusa</i> (Willd.); <i>G. prostrata</i> (Lam); <i>G. procumbens</i> (Waldst.); <i>G. albida</i> (Willd.); <i>G. pilosa</i> (L.); <i>G. micrantha</i> (Ort.); <i>G. desiderata</i> ; <i>G. broteri</i> (Poir.); <i>G. pilocarpa</i> (Link); <i>G. heterophylla</i> ; <i>G. angulata</i> (Rafin.); <i>G. scandens</i> (Lour.).	De Candolle (1825) "Prodromus"
Subespécies: <i>G. umbellata</i> ssp. <i>capitata</i> ; <i>G. triacanthos</i> Brot. ssp. <i>interrupta</i> ; <i>G. corsica</i> ssp. <i>pubescens</i> ; <i>G. germanica</i> L. ssp. <i>inermis</i> ; <i>G. monosperma</i> Lam. ssp. <i>rigidula</i> ; <i>G. sagittalis</i> L. ssp. <i>minor</i> , <i>G. tinctoria</i> L.: ssp. <i>latifolia</i> ; ssp. <i>hirsuta</i> ; ssp. <i>pratensis</i> ; <i>G. hirsuta</i> Vahl: ssp. <i>orientalis</i> ; ssp. <i>cuspidata</i> ; ssp. <i>algarbiensis</i> Brot.	

Anexo I – Revisão bibliográfica da caracterização taxonómica do género *Genista* L.

[Continuação]

Caraterização Taxonómica	Autores
<p>Espécies: <i>G. anatolica</i>; <i>G. haenseleri</i>; <i>G. mella</i> e <i>G. libanotica</i>.</p> <p>Subgénero <i>Spartocarpus</i> Spach: Secção <i>Scorpioides</i>; Secção <i>Ephedospartum</i>; Secção <i>Acanthospartum</i>; Secção <i>Echinopartum</i>; Secção <i>Cephalospartum</i>; Secção <i>Leptospartum</i>; Secção <i>Voglera</i>.</p> <p>Subgénero <i>Campitobium</i> Spach: <i>G. falcata</i> Brot.</p> <p>Subgénero <i>Phyllolobys</i> Spach: <i>G. anglica</i> L.; <i>G. ancistrocarpa</i> Spach^a.</p> <p>Subgénero <i>Stenocarpus</i> Spach:</p> <p>Secção <i>Scorpioides</i> Spach: <i>G. ferox</i> Poiret; <i>G. morissi</i> Colla; <i>G. scorpius</i> DC.; <i>G. corsica</i> DC.; <i>G. lucida</i> Cam.</p> <p>Secção <i>Erinacoides</i> Spach: <i>G. aspalathoides</i> Poir.; <i>G. lobelii</i> DC.; <i>G. baetica</i> Spach^a.</p> <p>Secção <i>Spartoides</i> Spach: <i>G. ramosissima</i> Poir.; <i>G. cinerea</i> DC.; <i>G. obtusiramea</i> Gay; <i>G. albidia</i> Willd.; <i>G. armerica</i> Spach; <i>G. godetii</i> Spach^a; <i>G. montbretii</i> Spach^a; <i>G. involucrata</i> Spach^a; <i>G. sericea</i> Wulff; <i>G. polygalaefolia</i> DC.; <i>G. florida</i> L.; <i>G. leptoclada</i> Gay.</p> <p>Secção <i>Genistella</i> (Tourm) Spach: <i>G. sagittalis</i> L.</p> <p>Secção <i>Genistoides</i> (Moench) Spach: <i>G. scariosa</i> Viv.; <i>G. lamprophylla</i>^a; <i>G. pontica</i>^a; <i>G. leptophylla</i>; <i>G. spatulata</i>^a; <i>G. depressa</i> Bieberst.; <i>G. tetragona</i>; <i>G. ptillophylla</i>^a; <i>G. polytricha</i>^a; <i>G. commita</i>^a; <i>G. amantica</i>; <i>G. ovata</i>; <i>G. lasiocarpa</i>^a; <i>G. tinctoria</i>; <i>G. patula</i>; <i>G. elata</i>; <i>G. dracunculoides</i>^a; <i>G. tenuifolia</i>.</p> <p>Secção <i>Chamaespartium</i> Spach: <i>G. pilosa</i> L.</p> <p>Secção <i>Lasiospartum</i> Spach: <i>G. umbellata</i> Desf.; <i>G. equisetiformis</i> Spach^a; <i>G. clavata</i> Poir.</p> <p>Subgénero <i>Pterospartum</i> Spach: <i>G. lasiantha</i>^a; <i>G. scolopendria</i>^a; <i>G. stenoptera</i>^a; <i>G. cantabrica</i>^a; <i>G. tridentata</i> L.</p> <p>Subgénero <i>Teline</i> (Medik) Spach</p>	<p>Boissier (1839-1845)</p> <p>Spach (1844-1845)</p> <p>^a espécies novas adicionadas</p>

Anexo I – Revisão bibliográfica da caracterização taxonómica do género *Genista* L.

[Continuação]

Caraterização Taxonómica	Autores
<p>Secção <i>Spartioides</i> Spach: <i>G. florida</i> L.; <i>G. cinerascens</i> Lange</p> <p>Secção <i>Erinacoides</i> Spach: <i>G. polyanthos</i> Willk ssp. <i>polyanthos</i> e ssp. <i>hystrix</i> (Lange) Franco</p> <p>Secção <i>Phyllospartum</i> Willk.: <i>G. anglica</i> L.; <i>G. falcata</i> Brot.; <i>G. berberidea</i> Lange,</p> <p>Secção <i>Voglera</i> (P. Gaertner, Meyer & Scherb.) Spach: <i>G. micrantha</i> Ortega; <i>G. tournefortii</i> Spach; <i>G. triacanthos</i> Brot.; <i>G. hirsuta</i> Vahl, ssp. <i>algarbiensis</i> (Brot.) Rivas-Martin;</p> <p>Espécies: <i>G. cinerascens</i> Lange; <i>G. majorica</i> Cantó & M. J. Sánchez</p>	<p>Fernandes e Queirós (1978); Gonzalez (1982)</p>
<p>Subespécies: <i>G. cinerea</i> (Vill.) DC.: ssp. <i>cinerea</i>; ssp. <i>speciosa</i> Rivas Goday & T. Losa; ssp. <i>ausetana</i> O. Bolós & J. Vigo; ssp. <i>murcica</i> (Cosson) Cantó & M. J. Sánchez; ssp. <i>valentina</i> (Willd. Ex Sprengel) Rivas Martinez.</p> <p>Espécies: <i>G. lusitânica</i> (Lin.); <i>G. lobellii</i> (D.C.); <i>G. hirsuta</i> (Vahl); <i>G. berberidea</i> (Lge.); <i>G. ancistrocarpa</i> (Spach); <i>G. falcata</i> (Brot.); <i>G. triacantha</i> (Brot.); <i>G. micrantha</i> (Ort.); <i>G. broteri</i> (Poir); <i>G. cinerea</i> (D.C.); <i>G. Florida</i> (Lin); incluindo a espécie <i>G. welwitschii</i>.</p> <p>Espécies: <i>G. tinctoria</i> L.; <i>G. scorpius</i> (L.) DC.; <i>G. carpetana</i> Lange; <i>G. pulchella</i> Vis.; <i>G. legionensis</i> (Pau) M. Lainz; <i>G. polyanthos</i> R. Roem. ex Willk.; <i>G. hystrix</i> Lange; <i>G. versicolor</i> Boiss.; <i>G. ramosissima</i> (Desf.) Poir.; <i>G. ausetana</i> (O Bolós & Vigo) Talavera; <i>G. majorica</i> Cantó & M. J. Sánchez; <i>G. cinerea</i> (Vill.) DC., Lam. & DC.; <i>G. pilosa</i> L.; <i>G. teretifolia</i> Willk.; <i>G. pseudopilosa</i> Coss.; <i>G. florida</i> L.; <i>G. valentina</i> (Willd. ex Spreng.) Steud.; <i>G. Jimenezii</i> Pau; <i>G. Obtusiramea</i> J. Gay ex Spach; <i>G. cinerascens</i> Lange; <i>G. dorycnifolia</i> Font Quer; <i>G. spartioides</i> Spach; <i>G. haenseleri</i> Boiss.; <i>G. sanabrensis</i> Valdés Berm.; <i>G. valdes-bermejoi</i> Talavera & L.; <i>G. anglica</i> L.; <i>G. ancistrocarpa</i> Spach; <i>G. falcata</i> Brot.; <i>G. berberidea</i> Lange; <i>G. micrantha</i> Gómez Ortega; <i>G. tricuspidata</i> Desf.; <i>G. triacanthos</i> Brot.</p> <p>Subespécies: <i>G. tournefortii</i> Spach ssp. <i>tournefortii</i>; <i>G. tridens</i> (Cav.) DC.: ssp. <i>tridens</i>; ssp. <i>juniperina</i> (Spach) Talavera & P. E. Gibbs;</p>	<p>Cantó e Sánchez (1988)</p> <p>Sampaio (191990)</p> <p>“Flora Portuguesa”</p>
<p>Subespécies: <i>G. longipes</i> Pau.: ssp. <i>longipes</i>; ssp. <i>viciosoi</i> Talavera & Cabezudo; <i>G. hispanica</i> L.: ssp. <i>hispanica</i>; ssp. <i>occidentalis</i> Rouy;</p> <p><i>G. pumila</i> (Debeaux & É. Rev. ex Hervier) Vierh.: ssp. <i>pumila</i>; ssp. <i>rigidissima</i> (Vierh.) Talavera & L. Sáez;</p> <p><i>G. umbellata</i> (L’Hér.) Dum.: ssp. <i>umbellata</i>; ssp. <i>equisetiformis</i> (Spach) Rivas Goday & Rivas;</p> <p><i>G. hirsuta</i> Vahl: ssp. <i>hirsuta</i>; ssp. <i>lanuginosa</i> (Spach) Nyman; ssp. <i>eriodclada</i> (Spach) Raynaud.</p>	<p>Castroviejo (1999)</p> <p>“Flora Ibérica”</p>

Anexo II – Dados obtidos nos ensaios, expressos em sementes germinadas

Dias	Data	Tx germ. 10 min	Tx germ. 20 min	Tx germ. 40 min	Tx germ. test.
1	28-Jan	0	0	0	0
3	30-Jan	0	0	0	0
5	1-Fev	0	0	0	0
7	3-Fev	2	1	2	0
9	5-Fev	2	1	2	0
11	7-Fev	2	3	3	0
13	9-Fev	2	3	3	0
15	11-Fev	2	6	3	0
17	13-Fev	2	6	4	0
19	15-Fev	2	7	4	0
21	17-Fev	2	7	4	0
23	19-Fev	3	7	4	0
25	21-Fev	4	8	4	1
27	23-Fev	4	8	5	1
29	25-Fev	4	8	6	1
31	27-Fev	5	8	6	1
33	1-Mar	6	8	7	1
35	3-Mar	6	9	7	1
37	5-Mar	6	9	8	1
39	7-Mar	6	9	8	1
41	9-Mar	6	9	10	1
43	11-Mar	7	9	10	1
45	13-Mar	7	9	10	1
47	15-Mar	7	9	10	1
49	17-Mar	7	9	10	1
51	19-Mar	8	9	10	1
53	21-Mar	8	9	10	2
55	23-Mar	9	10	10	2
57	25-Mar	10	10	10	2
59	27-Mar	10	10	10	2
61	29-Mar	10	10	10	2
63	31-Mar	10	10	10	2
65	2-Abr	10	12	10	2
67	4-Abr	10	12	10	2
69	6-Abr	10	13	10	2
71	8-Abr	10	13	10	2
73	10-Abr	10	13	10	2
TOTAL SEMENTES		35	36	36	35

Anexo III – Dados obtidos nos ensaios, expressos em taxas de germinação

Dias	Data	Tx germ. 10 min	Tx germ. 20 min	Tx germ. 40 min	Tx germ. test.
1	28-Jan	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
3	30-Jan	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
5	1-Fev	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
7	3-Fev	5,71%	2,78%	5,56%	0,00%
9	5-Fev	5,71%	2,78%	5,56%	0,00%
11	7-Fev	5,71%	8,33%	8,33%	0,00%
13	9-Fev	5,71%	8,33%	8,33%	0,00%
15	11-Fev	5,71%	16,67%	8,33%	0,00%
17	13-Fev	5,71%	16,67%	11,11%	0,00%
19	15-Fev	5,71%	19,44%	11,11%	0,00%
21	17-Fev	5,71%	19,44%	11,11%	0,00%
23	19-Fev	8,57%	19,44%	11,11%	0,00%
25	21-Fev	11,43%	22,22%	11,11%	2,86%
27	23-Fev	11,43%	22,22%	13,89%	2,86%
29	25-Fev	11,43%	22,22%	16,67%	2,86%
31	27-Fev	14,29%	22,22%	16,67%	2,86%
33	1-Mar	17,14%	22,22%	19,44%	2,86%
35	3-Mar	17,14%	25,00%	19,44%	2,86%
37	5-Mar	17,14%	25,00%	22,22%	2,86%
39	7-Mar	17,14%	25,00%	22,22%	2,86%
41	9-Mar	17,14%	25,00%	27,78%	2,86%
43	11-Mar	20,00%	25,00%	27,78%	2,86%
45	13-Mar	20,00%	25,00%	27,78%	2,86%
47	15-Mar	20,00%	25,00%	27,78%	2,86%
49	17-Mar	20,00%	25,00%	27,78%	2,86%
51	19-Mar	22,86%	25,00%	27,78%	2,86%
53	21-Mar	22,86%	25,00%	27,78%	5,71%
55	23-Mar	25,71%	27,78%	27,78%	5,71%
57	25-Mar	28,57%	27,78%	27,78%	5,71%
59	27-Mar	28,57%	27,78%	27,78%	5,71%
61	29-Mar	28,57%	27,78%	27,78%	5,71%
63	31-Mar	28,57%	27,78%	27,78%	5,71%
65	2-Abr	28,57%	33,33%	27,78%	5,71%
67	4-Abr	28,57%	33,33%	27,78%	5,71%
69	6-Abr	28,57%	36,11%	27,78%	5,71%
71	8-Abr	28,57%	36,11%	27,78%	5,71%
73	10-Abr	28,57%	36,11%	27,78%	5,71%