

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação

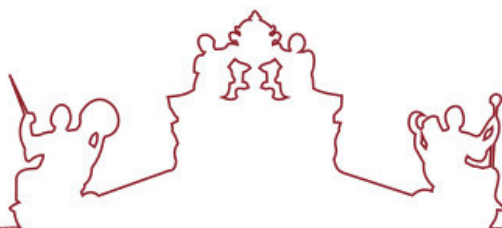
Avaliação da utilização de argila negra na produção de seed balls em contexto climático mediterrânico

Marlene Rodrigues Emídio

Orientador(es) | Anabela Dias Belo

Mariana Pucarinho Fernandes

Évora 2021



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação

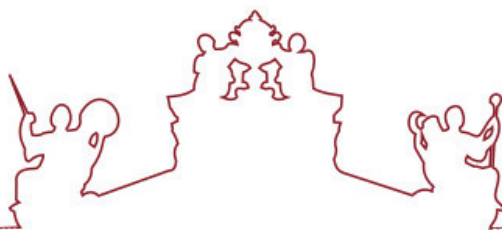
Avaliação da utilização de argila negra na produção de seed balls em contexto climático mediterrânico

Marlene Rodrigues Emídio

Orientador(es) | Anabela Dias Belo
Mariana Pucarinho Fernandes

Évora 2021





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Luiz Carlos Gazarini (Universidade de Évora)

Vogais | Anabela Dias Belo (Universidade de Évora) (Orientador)
Carla Pinto Cruz (Universidade de Évora) (Arguente)

Este documento não segue o novo acordo ortográfico.

Agradecimentos

A presente dissertação de mestrado contou com o apoio e incentivo de várias pessoas muito importantes, sem as quais este processo não teria sido possível e às quais estarei eternamente grata.

Ao projecto LIFE LINES Linear Infrastructure Networks with Ecological Solutions (LIFE14 NAT/PT/001081) que me disponibilizou o material necessário à realização desta dissertação.

À Professora Doutora Anabela Belo por esta oportunidade de realizar a minha dissertação num tema tão interessante, pela orientação, apoio, paciência, incentivo e por ter acreditado em mim.

À Mariana Fernandes que foi incansável em todo este processo, estando sempre disponível para me ajudar fosse no que fosse e que me transmitiu conhecimentos preciosos tanto para a realização desta dissertação como para o meu futuro. Foi sem sombra de dúvida uma pessoa imprescindível para a realização deste trabalho.

À Paula Matono, que foi igualmente imprescindível neste processo, agradeço por toda a sua preciosa ajuda na componente estatística, por todo o conhecimento que me transmitiu e pelas suas palavras de força e incentivo que tanto me ajudaram para alcançar esta meta.

À Erika Almeida por toda a sua amizade, pela calma que sempre me soube transmitir, pelas inúmeras palavras de incentivo e orgulho e pela sua sempre disponibilidade para me ajudar, reconfortar ou apenas ouvir-me.

Ao Nuno Pedroso que, mesmo com excesso de trabalho, se disponibilizou para ler a minha dissertação, sem qualquer obrigação para tal, a fim de dar as suas sugestões para poder melhorar.

Aos meus eternos amigos Carolina Kopf e Rafael Muchaxo, por todas as gargalhadas que tanto aliviaram alguns momentos, por sempre terem acreditado em mim e por toda a preocupação demonstrada ao longo deste processo.

Aos meus pais, irmão e avó pelas palavras de orgulho, por toda a compreensão e por todo o amor. Esta dissertação é também para eles.

Por último, quero agradecer ao André Jesus por todo o amor, amizade, companheirismo, compreensão, paciência nas minhas alturas mais difíceis, pelas palavras de apoio, por acreditar em mim e por se orgulhar de mim.

Avaliação da utilização de argila negra na produção de *seed balls* em contexto climático mediterrânico

Resumo

O restauro ecológico tornou-se imprescindível devido à tendência crescente do uso do solo e constitui um objectivo particularmente desafiador na bacia do Mediterrâneo. As *seed balls* são uma técnica de restauro pouco estudada cientificamente, particularmente em climas áridos.

Pretendeu-se testar o potencial germinativo em *seed balls* produzidas com diferentes percentagens de argila negra (25%-100%), uma argila com elevado teor de matéria orgânica considerada um desperdício da indústria das cerâmicas, em contexto mediterrânico. Avaliou-se a germinação de seis espécies com sementes de volumes diferentes (pequeno, médio e grande) em três regimes de rega (seco, intermédio e húmido). Sementes pequenas e médias germinaram melhor com 25% de argila negra e sementes grandes germinaram melhor com 50-75% de argila negra.

As *seed balls* podem ser usadas em clima mediterrânico e reaproveitando a argila negra de barreiros portugueses. O ajustamento do tamanho das *seed balls* à dimensão das sementes deverá constituir o próximo passo.

Palavras-chave: Restauro ecológico, sementes, revestimento de sementes, sustentabilidade, economia circular

Evaluation of the use of black clay in the production of *seed balls* in a Mediterranean climate context

Abstract

Ecological restoration has become essential due to the growing trend in land use and is a particularly challenging goal in the Mediterranean basin. *Seed balls* are a restoration technique that hasn't been scientifically studied, particularly in arid climates.

It was intended to test the germinative potential in *seed balls* produced with different percentages of black clay (25% -100%), a clay with high content of organic matter considered a waste in ceramics industry, in Mediterranean context. The germination of six species with seeds of different volumes (small, medium and large) was evaluated in three irrigation regimes (dry, intermediate and wet). Small and medium seeds germinated better with 25% black clay and large seeds with 50-75% black clay.

Seed balls can be used in a Mediterranean climate and reusing the black clay of Portuguese clay. Adjusting the size of *seed balls* to the size of the seeds should be the next step.

Key-words: Ecological restoration, seeds, seed coating, sustainability, circular economy

Índice Geral

1.	Enquadramento teórico	1
1.1.	Problemática do uso do solo	1
1.2.	Restauro de habitats	2
1.3.	Revestimento de sementes & <i>seed balls</i>	4
1.4.	Caso de estudo.....	10
2.	Metodologia	12
2.1.	Seleção de espécies.....	12
2.2.	Ensaio de germinação para determinação da viabilidade das sementes	15
2.3.	Ensaio de germinação em <i>seed balls</i>	16
2.4.	Análise de dados.....	19
2.4.1.	Viabilidade das sementes e germinação	19
2.4.2.	Análise dos factores que influenciam a germinação das espécies em <i>seed balls</i>	20
2.4.3.	Seleção da percentagem de argila negra mais adequada ao sucesso germinativo em <i>seed balls</i>	21
3.	Resultados	23
3.1.	Avaliação do ensaio de germinação para determinação da viabilidade das sementes.....	23
3.2.	Avaliação do ensaio de germinação em <i>seed balls</i>	24
3.2.1.	Avaliação da germinação em <i>seed balls</i> por espécie.....	24
3.3.	Avaliação da germinação em <i>seed balls</i> por volume de semente	30
3.4.	Árvore decisória.....	32
4.	Discussão	34
4.1.	Avaliação da viabilidade dos lotes	34
4.2.	Avaliação global da germinação em <i>seed ball</i> e nas referências	34
4.3.	Avaliação da germinação considerando as variáveis em estudo	35
4.3.1.	Regime hídrico e volume das sementes	35
4.3.2.	Percentagem de argila e volume das sementes	38
4.4.	Árvore decisória.....	40
5.	Considerações finais	41
6.	Referências bibliográficas	43
7.	Anexo I - Protocolo para elaboração de <i>seed balls</i> em contexto escolar	49

Índice de figuras

- Figura 1.** Exemplo do aspecto de *seed balls* desenvolvidas no presente estudo; são constituídas por argila negra (75%) e argila branca (25%) e contêm sementes de *Brachypodium distachyon*. 7
- Figura 2.** Utilização das *seed balls* em restauro ecológico promovendo a sua sustentabilidade. Adaptado de *Seed balls/Earthshed Solutions*. 8
- Figura 3.** Lotes de sementes utilizados no estudo (por ordem da esquerda para a direita: *Agrostis castellana*; *Mentha suaveolens*; *Mantisalca salmantica*; *Brachypodium distachyon*, *Bituminaria bituminosa* e *Cynara humilis*)..... 13
- Figura 4.** Fotografia de placa de Petri com vinte e cinco sementes de *Cynara humilis* para teste de viabilidade do lote das mesmas. 15
- Figura 5.** As duas argilas utilizadas (argila branca à esquerda e argila negra à direita). 16
- Figura 6.** Esquema ilustrativo (à direita) e fotografia (à esquerda) dos recipientes e das *seed balls*..... 17
- Figura 7.** Esquema ilustrativo das amostras de referência, vistas de perfil e de cima. . 18
- Figura 8.** Fotografia de referências..... 18
- Figura 9.** Percentagem de viabilidade (ponto: média; caixa: média \pm erro-padrão; bigodes: média \pm desvio-padrão). Os acrónimos usados significam: Ag – *Agrostis castellana*; Ment – *Mentha suaveolens*; Brach – *Brachypodium distachyon*; Mant – *Mantisalca salmantica*; Bit – *Bituminaria bituminosa*; Cyn – *Cynara humilis*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a percentagem de viabilidade das espécies..... 23
- Figura 10.** Percentagem de germinação (média \pm desvio-padrão) nas referências e nas *seed balls*. Os acrónimos usados significam: Ag – *Agrostis castellana*; Ment – *Mentha suaveolens*; Brach – *Brachypodium distachyon*; Mant – *Mantisalca salmantica*; Bit – *Bituminaria bituminosa*; Cyn – *Cynara humilis*. Diferença estatística entre a % germinação em situações de referência e em *seed balls*. *** $P < 0,001$ 24

Figura 11. Tempo médio de germinação (TMG; média ± desvio-padrão) nas referências e nas *seed balls*. Os acrónimos usados significam: Ag – *Agrostis castellana*; Ment – *Mentha suaveolens*; Brach – *Brachypodium distachyon*; Mant – *Mantisalca salmantica*; Bit – *Bituminaria bituminosa*; Cyn – *Cynara humilis*. Diferença estatística entre a % germinação em situações de referência e *seed balls*: * P<0,05; ** 0,001<P≤0,01; *** P≤0,001. A ausência de * significa que não existem diferenças significativas entre o tempo médio de germinação nas referências e nas *seed balls* para essa espécie. 25

Figura 12. Percentagem de germinação (ponto: média; caixa: média±erro-padrão; bigodes: média±desvio-padrão) considerando apenas as classes de regime hídrico (seco, intermédio e húmido) nas referências e nas *seed balls*. Os acrónimos usados significam: Ag – *Agrostis castellana*; Ment – *Mentha suaveolens*; Brach – *Brachypodium distachyon*; Mant – *Mantisalca salmantica*; Bit – *Bituminaria bituminosa*; Cyn – *Cynara humilis*. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) nas percentagens de germinação entre os diferentes regimes hídricos. As letras maiúsculas e minúsculas indicam as diferenças significativas em *seed balls* e nas referências, respectivamente. 27

Figura 13. Percentagem de germinação (ponto: média; caixa: média ± erro-padrão; bigodes: média ± desvio-padrão) considerando apenas as classes de percentagens de argila negra (25%, 50%, 75% e 100%) nas *seed balls*. Os acrónimos usados significam: Ag – *Agrostis castellana*; Ment – *Mentha suaveolens*; Brach – *Brachypodium distachyon*; Mant – *Mantisalca salmantica*; Bit – *Bituminaria bituminosa*; Cyn – *Cynara humilis*. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre percentagem de germinação entre as diferentes percentagens de argila negra. 28

Figura 14. Efeito das variáveis em estudo (regime hídrico, percentagem de argila negra e dimensão da semente) na percentagem de germinação em *seed balls* considerando as espécies agrupadas por classe de dimensão de semente (pequenas, médias e grandes). 31

Figura 15. Árvore decisória tendo em conta o sucesso germinativo das espécies em *seed balls*. As percentagens dizem respeito à percentagem de *seed balls* correspondente a cada uma das categorias da árvore decisória. 33

Figura 16. *Seed ball* completamente quebrada pela germinação das sementes de *Cynara humilis* (à esquerda) e *seed ball* fissurada pela germinação de semente de *Brachypodium distachyon* (à direita). 38

Índice de tabelas

Tabela 1. Informação resumo sobre as seis espécies utilizadas no estudo 14

Tabela 2. Quantidade de água disponibilizada semanalmente a cada conjunto de 6 *seed balls*/modalidade de regime hídrico e ao grupo de amostras de referência, consoante o regime hídrico. Ref – Referência..... 17

Tabela 3. Classes estabelecidas e pontuações atribuídas à percentagem de germinação e semelhança de germinação entre *seed balls* e referências, para o cálculo do sucesso de germinação 22

Tabela 4. Germinação média das espécies nas referências (média \pm desvio-padrão) por regime hídrico (húmido, intermédio e seco). Os acrónimos usados significam: RH - Regime hídrico; H – Húmido; I – Intermédio; S – Seco..... 26

Tabela 5. Germinação das espécies (média \pm desvio-padrão) nas *seed balls* de acordo com o regime hídrico (húmido, intermédio e seco) e percentagem de argila negra (25%, 50%, 75% e 100%). Os acrónimos usados significam: H – regime húmido, I – regime intermédio e S – regime seco; 100, 75, 50 e 25 corresponde às percentagens de argila negra utilizada para a elaboração das *seed balls*..... 29

Tabela 6. Diferença padronizada (semelhança) entre a percentagem de germinação média das espécies testadas nas referências e nas *seed balls*, utilizando diferentes percentagens de argila negra (25%, 50%, 75% e 100%) e nos vários regimes hídricos (húmido, intermédio e seco). O grau de semelhança está classificado em elevado (≥ 50 ; a cinzento escuro), intermédio ($>25 - <50$; a cinzento) e baixo (≤ 25 ; a branco). 30

1. Enquadramento teórico

1.1. Problemática do uso do solo

As práticas de uso do solo, sejam a conversão de paisagens naturais para utilização humana ou a alteração de manejo em terras já utilizadas pelo Homem, transformaram uma grande proporção da superfície terrestre do planeta (Foley et al., 2005). Apesar destas práticas variarem bastante em todo o mundo, o seu resultado final é geralmente igual: a exploração de recursos naturais para necessidades humanas, muitas vezes à custa da degradação das condições ambientais existentes (Foley et al., 2005). Assim, as paisagens de todo o mundo estão a ser alteradas pela acção humana, nomeadamente ao desflorestar, intensificar a produção de terras agrícolas ou expandir centros urbanos (DeFries et al., 2004).

Várias décadas de investigação revelaram os impactos ambientais do uso do solo em todo o mundo, desde mudanças na composição atmosférica a extensas modificações nos ecossistemas do planeta (Wackernagel et al., 2002). As práticas de uso do solo têm desempenhado um papel importante na mudança do ciclo global do carbono: estima-se que, desde 1850, aproximadamente 35% das emissões antropogénicas de CO₂ resultem directamente do uso do solo (Houghton, 2008). Estas práticas também são responsáveis por declínios na biodiversidade através da degradação do solo, da água e da sobre-exploração de espécies nativas, assim como pela perda e modificação de habitats (Pimm & Raven, 2000), traduzida principalmente na sua simplificação e fragmentação.

A simplificação de um habitat é um processo em que se verifica uma diminuição da diversidade vegetal existente, o que conduz a uma homogeneização estrutural da vegetação. A sua simplificação traz consequências negativas para a biodiversidade, visto que habitats estruturalmente menos complexos apresentam menos nichos e recursos, o que provoca a diminuição da diversidade específica e os serviços de ecossistemas prestados (Allouche et al., 2012), colocando em causa o funcionamento e a sustentabilidade dos ecossistemas.

A fragmentação de habitats pode ser definida como uma “quebra” de um habitat contínuo em porções isoladas (Bennett & Saunders, 2010). Este fenómeno inclui perda de habitat, ou seja, uma redução na área total da vegetação original, mas, sobretudo, a subdivisão do contínuo vegetal em fragmentos ou manchas não ligadas entre si. De uma forma mais concreta, a fragmentação de habitat, uma das principais causas de perda de biodiversidade, é a divisão de um habitat homogéneo em fragmentos de progressivamente menores dimensões e maior isolamento, separados por uma matriz transformada pelo homem (Haddad et al., 2015).

Apesar das práticas do uso do solo contribuírem para a degradação das condições ecológicas, a humanidade tornou-se dependente de uma parcela cada vez maior dos recursos da biosfera, sobre a qual recaem grandes pressões à medida que a população, e as conseqüentes necessidades fundamentais e de desenvolvimento tecnológico, aumentam.

1.2. Restauro de habitats

A maneira mais eficiente de preservar um ecossistema saudável, ou seja, um ecossistema em equilíbrio, resistente e resiliente, passa pela adopção de medidas de conservação e gestão. No entanto, a área mundial de ecossistemas que está efectivamente sob protecção é muito reduzida: aproximadamente 15% dos ecossistemas terrestres e 8% dos oceanos (UNEP-WCMC, 2018), deixando grande parte do planeta vulnerável à degradação induzida pelo Homem, o que se verifica actualmente em quase dois terços dos ecossistemas mundiais (Pedrini, 2018), tornando imprescindível e urgente a tomada de medidas com foco na sua recuperação, visto que meras medidas de conservação já não são suficientes.

O termo restauração ou restauro de habitat é comumente utilizado quando se pretende melhorar um habitat, no entanto, em sentido estrito, tem um significado diferente, o qual importa explicar: restauração ou restauro de habitats é o retorno de um ecossistema a uma condição próxima da que existia antes da perturbação (National Research Council, 1992). Nesse sentido, a restauração de um habitat torna-se improvável. Além da dificuldade de recriar as condições exactas que levaram ao desenvolvimento do ecossistema original, é também muito difícil, senão impossível, o conhecimento de todas as espécies desse ecossistema que foram perdidas.

Contrariamente, a reabilitação de habitat é a prática mais exequível, constituindo uma solução alternativa para o problema da restauração de habitats degradados. A reabilitação de um ecossistema consiste em reparar ou substituir as estruturas e funções essenciais, ou primárias, do ecossistema que foram alteradas ou eliminadas por distúrbios, promovendo a melhoria do ecossistema em direcção à restauração (Cooke, 2005). Segundo o mesmo autor, a reabilitação de habitats enfatiza a remoção ou redução de factores de stress e o restabelecimento de espécies, estruturas e funções cruciais do ecossistema, constituindo uma prática mais alcançável que a restauração.

Embora o restauro de habitats não seja referido em sentido estrito, será utilizado em sentido lato de forma a referir-se à recuperação de habitats, tendo em conta que constitui o termo mais usualmente utilizado na literatura científica.

Processos de restauro mais simples envolvem a remoção de uma perturbação e a recuperação do ecossistema através de processos ecológicos naturais. No entanto, o restauro de habitats implica, geralmente, esforços avultados, seja a nível financeiro seja a nível técnico, porque são habitualmente várias as perturbações que levaram os ecossistemas para além da sua capacidade de recuperação natural e, em áreas severamente degradadas com baixa resiliência, o restauro é a principal forma de reverter a degradação da terra e restaurar a composição, o funcionamento e a sustentabilidade dos ecossistemas (Clewell & Winterhalder, 2004). Em alguns casos, quando existe uma necessidade constante de algum nível de manutenção, o processo de restauro nunca termina, como por exemplo, em áreas húmidas dominadas por espécies invasoras (Palmer et al., 2016).

As acções de restauro são particularmente desafiadoras em terras áridas da bacia do Mediterrâneo (Vallejo et al., 2012), que ocupam cerca de 60% desta bacia (White & Nackoney, 2003). Este desafio em particular deve-se à irregularidade e à pouca frequência com que ocorrem condições de temperatura e humidades adequadas à germinação, crescimento e sobrevivência das plantas (Bean et al., 2004). A bacia do Mediterrâneo é caracterizada por invernos suaves e relativamente húmidos que alternam com verões longos, quentes e secos. As estações da Primavera e do Outono são curtas, em comparação, e muito variáveis. Durante grande parte do ano, é frequente a ocorrência de secas com duração de semanas ou até meses, com graves consequências para a biodiversidade, uma vez que a água é o principal factor limitante para o crescimento e o bem-estar de todos os organismos (Vallejo et al., 2012).

A bacia do Mediterrâneo constitui um dos 18 *hotspots* de biodiversidade do mundo (Norman, 2003), onde ocorrem concentrações excepcionais de biodiversidade, muita da qual em declínio ou perigo de extinção, tornando-se por isso um alvo importante de restauro ecológico, mesmo que este seja difícil de concretizar. A prática de restauro mais comumente implementada na região do Mediterrâneo durante a primeira metade do século passado tinha uma abordagem acentuadamente ligada à silvicultura, com a introdução de algumas espécies arbustivas de crescimento rápido. Esta abordagem tinha como objectivo combinar a produtividade florestal com a protecção hidrológica de bacias hidrográficas, além de promover a empregabilidade em áreas rurais remotas. Esta prática tem sido progressivamente substituída por uma abordagem ecologicamente mais abrangente, com diversificação de espécies vegetais e tendo em consideração os solos e a preservação da fauna (Nunes et al., 2016). Presta-se assim, atualmente, uma maior atenção às questões ambientais e económicas da biodiversidade que estão inter-relacionadas, por um lado, e à sustentabilidade, por outro (Vallejo et al., 2006).

Relativamente à forma de restauro, a que melhor relação custo benefício apresenta na reintrodução de espécies vegetais é a sementeira, representando a principal

ferramenta para a restauração de habitats terrestres (Merritt & Dixon, 2011) e constituindo um elemento fundamental para atender às metas globais, como a reabilitação de 150 milhões de hectares de terras degradadas, uma das prioridades do desenvolvimento sustentável das Nações Unidas (Parlamento Europeu, 2018). No entanto, o sucesso no uso de sementes nativas em restauro ecológico é geralmente limitado e menos de 10% das sementes utilizadas conseguem estabelecer-se com sucesso para produzir uma planta adulta (Ceccon et al., 2016). A limitação do sucesso no restauro com uso de sementes tem sido atribuída a factores fisiológicos, logísticos e ecológico-ambientais, incluindo baixa viabilidade de sementes, dormência, dificuldades no manuseamento das sementes e sua distribuição no terreno devido à variação do seu tamanho e morfologia. Além disso, a variabilidade das condições ambientais dos locais a interencionar constituem igualmente uma barreira ao sucesso do restauro (Pedrini et al., 2020).

Na Europa, por exemplo, a produção de material vegetal nativo é limitada pelos custos elevados de produção e pela falta de experiência na sua produção e propagação (Tischew et al., 2011). Apesar de terem sido superados vários problemas relativamente à produção, armazenamento e uso de sementes devido à prática e à experiência adquirida, existem ainda muitas lacunas de conhecimento que exigem mais investigação (Merritt & Dixon, 2011). Consequentemente, têm sido desenvolvidas e melhoradas várias técnicas com o intuito de facilitar o sucesso da revegetação, como por exemplo a aplicação de adubo, a sementeira em faixas e o melhoramento de variedades e/ou espécies (Beggy & Fehmi, 2016). No entanto, existem outras técnicas promissoras que parecem estar a ser utilizadas *ad hoc*, ou seja, usadas apenas quando necessário, por profissionais de restauro ecológico e não necessariamente acompanhadas por investigações significativas (Miller et al., 2017), encontrando-se nesta categoria o revestimento de sementes (Gornish et al., 2019).

1.3. Revestimento de sementes & *seed balls*

Considerando as limitações das técnicas de restauro, verifica-se uma necessidade de melhorar as probabilidades de sucesso das mesmas na promoção de vegetação nativa. No entanto, as tecnologias de aprimoramento de sementes direcionadas ao restauro ecológico têm recebido pouca atenção. Isto deve-se à necessidade de uma extensa investigação e desenvolvimento, de modo a adaptar as tecnologias já existentes das sementes de culturas habituais para tipos de sementes nativas complexas e diversas, e ao elevado custo inicial de equipamento adequado (Pedrini et al., 2020).

Uma das principais abordagens para aumentar as probabilidades de sucesso do restauro consiste no revestimento de sementes (Paparella et al., 2015). O revestimento das sementes consiste, de forma geral, na aplicação de material externo à semente com

o intuito de modificar a forma e o tamanho das sementes facilitando o seu manuseamento (Halmer, 2008), e/ou fornecer compostos que beneficiem a proteção contra predadores, promovam a germinação e/ou que melhorem o crescimento das plantas (Madsen et al., 2012). Estas técnicas são utilizadas para melhorar o sucesso de estabelecimento da vegetação (Liu et al., 2010; Gornish et al., 2019) tendo por base atingir um ou mais dos quatro objectivos seguintes: 1. melhorar a distribuição das sementes, ao homogeneizar a sua forma e/ou aumentar o seu tamanho; 2. aumentar a proteção contra predação; 3. melhorar a taxa de germinação e 4. melhorar a taxa de estabelecimento das plantas (Gornish et al., 2019).

Apesar da nomenclatura utilizada na literatura não ser consistente, a terminologia mais empregue e reconhecida tanto na indústria como no mundo científico baseia-se em diferentes classificações consoante o peso, tamanho e propriedades das sementes revestidas (Pedrini et al., 2017), podendo o revestimento de sementes ser feito de três formas diferentes:

1. **Film coating** (Revestimento de película) – consiste no tratamento mais básico, com a aplicação de uma camada fina de material externo (geralmente menos de 5-10% do peso da semente) (Pedrini et al., 2020).
2. **Encrusting** (Encrustação) – aplicação de uma camada externa que origina um aumento de peso da semente, mas em que ainda é evidente a sua forma original (Pedrini et al., 2020).
3. **Pelleting** (Peletização) – aplicação de uma camada externa que torna impossível perceber a forma original da semente (*pellet*), já que o resultado é geralmente uma forma esférica (Taylor et al., 1998).

Enquanto que as sementes tratadas através de *film coating* e *encrusting* são classificadas tendo em conta o seu peso, as sementes peletizadas são classificadas pelo diâmetro (Pedrini et al., 2017). Estas três abordagens, apesar de terem sido desenvolvidas para espécies agrícolas, têm relevância para a prática do restauro ecológico (Pedrini et al., 2020).

Grande parte dos estudos sobre revestimento de sementes diz respeito à optimização de práticas agrícolas (Taylor et al., 1998), em consequência da sua ampla aplicação na indústria agrícola desde há décadas, maioritariamente em variedades de culturas hortícolas (Pedrini et al., 2020). Esta técnica começou a ser utilizada para restauro em larga escala na década de 1940 (Jordan, 1967), em simultâneo com a mecanização da sementeira (Gornish et al., 2019), no entanto poucos são os trabalhos de investigação que têm como foco a sua utilização no restauro de áreas naturais (Pedrini et al., 2017).

Ainda assim, as técnicas desenvolvidas e os estudos realizados sobre revestimento de sementes, mesmo que focadas numa vertente agrícola, revelam-se úteis para os profissionais do restauro ecológico, desde que se tenha em conta as diferenças de materiais disponíveis e da área a ser semeada. Estas diferenças entre práticas agrícolas e práticas de restauro levam a uma necessidade urgente de adaptar criteriosamente as técnicas de revestimento de sementes às necessidades e especificidades do restauro ecológico (Gornish et al., 2019). Isto é particularmente relevante, porque as técnicas de revestimento, tendo em conta a proteção que conferem às sementes e desde que não reduzam significativamente a germinação e o estabelecimento da planta, são um método viável para melhorar a distribuição das sementes e a eficiência da sementeira (Gornish et al., 2019).

Uma técnica de revestimento de sementes, que se inclui na categoria de peletização de sementes, são as *seed balls*. Esta técnica aparece muito comumente associada a Masanobu Fukuoka, agricultor e filósofo japonês formado em Microbiologia. Fukuoka foi o pioneiro do que ele apelidou de “agricultura natural”, um método agrícola que evita a lavoura, a remoção de ervas daninhas e o uso de fertilizantes, herbicidas ou pesticidas. É um método que tem como objectivo imitar, o máximo possível, os processos naturais (Mach, 2009). Fukuoka também gostava de chamar a este método de “*do nothing*” agriculture, ou seja, uma agricultura “não faça nada”, um nome enganador pela sua falsa simplicidade, uma vez que ele próprio admitiu ter sido um método que levou mais de trinta anos a aperfeiçoar (Fukuoka, 2010).

Fukuoka define a *seed ball* (Figura 1) como uma semente envolta em argila e posteriormente seca de modo a formar um *pellet* com um diâmetro de cerca de 1 cm (Fukuoka, 1985). Esta definição é apenas uma das possíveis, visto que uma *seed ball*, pode ter no seu interior várias sementes, que podem ser sementes da mesma espécie ou de espécies diferentes, o que pode obrigar a diâmetros maiores. Além disso, a *seed ball* pode ser constituída, além de argila, por outros constituintes, como fibra e húmus (Jones et al., 2014) e ainda outros elementos menos usuais, como pó de rocha, fertilizantes, carvão activado ou fungos micorrízicos, entre outros (Gornish et al., 2019).

Não é consensual se Fukuoka inventou esta técnica ou se apenas a recuperou da agricultura japonesa antiga, no entanto, a associação entre *seed balls* e Fukuoka é inegável, visto a defesa da utilização de *seed balls* por parte de Fukuoka ter influenciado os agricultores, a nível mundial, que procuravam técnicas de propagação de plantas que se encaixassem nas filosofias de sementeira directa (Mach, 2009).



Figura 1. Exemplo do aspecto de *seed balls* desenvolvidas no presente estudo; são constituídas por argila negra (75%) e argila branca (25%) e contêm sementes de *Brachypodium distachyon*.

As *seed balls*, tal como as restantes técnicas de revestimento de sementes, visam promover o sucesso de estabelecimento da vegetação. Ao revestir-se as sementes, melhora-se a distribuição das mesmas em campo, em particular no caso de se semearem várias espécies em conjunto, pois a agregação e o aumento do tamanho, peso e textura da superfície do *pellet* asseguram que as sementes sejam distribuídas de forma mais homogénea e sejam mais facilmente manipuladas durante a sua implantação no local de restauro (Hoose et al., 2019). Por outro lado, é conveniente precaver a redistribuição das sementes que pode ser feita pelo vento ou pela água, o que não acontece com as *seed balls* pelo facto de estas serem mais pesadas e ficarem imóveis após a sua distribuição (Pedrini, 2018).

Este tipo de técnica permite também, como já foi referido, aumentar a protecção contra a predação e a deterioração das sementes. A principal ameaça biótica para as sementes são os insectos (especialmente formigas), pequenos mamíferos e aves, no entanto os fungos podem também constituir, em certas situações, uma grande ameaça (Gornish et al., 2019). A diminuição da predação pode ser uma vantagem importante sobretudo quando, por ausência de precipitação, não ocorra germinação, no sentido em que a vida das sementes pode ser prolongada até que surjam as condições óptimas para a germinação (Jones et al., 2014).

Além disso, quando se procede ao revestimento de sementes, existe a possibilidade de incorporar ingredientes activos ou protectores biológicos e químicos benéficos que, quando libertados na semente ou no solo circundante, além de conferirem protecção à semente contra agentes patogénicos, melhoram a germinação, através da retenção da humidade (Jones et al., 2014) e/ou da sobrevivência e o crescimento das plantas (Taylor et al., 1998; Halmer, 2008). Por exemplo, a inclusão de um agente surfactante do solo no revestimento de *Pseudoroegneria spicata* para restauro pós-incêndio no noroeste

dos EUA melhorou a emergência de plântulas e a sua sobrevivência em solo repelente à água (Madsen et al., 2013). No Planalto Tibetano, a incorporação de outros componentes nas *seed balls* – microrganismos inoculados no revestimento das sementes – melhorou a emergência e sobrevivência de plântulas de duas espécies em pastagens degradadas (Liu et al., 2010).

As *seed balls* podem também promover o restauro ecológico contribuindo simultaneamente para um sistema mais sustentável. O material de que são formadas pode incorporar microrganismos benéficos que produzem nutrientes necessários às plantas. Isto promove a germinação e o crescimento das plantas, o que não só favorece a abundância das espécies semeadas como promove a existência de polinizadores, através do fornecimento de alimento e abrigo, aumentando consequentemente a disponibilidade futura de sementes e assim promovendo o restauro ecológico (Figura 2).

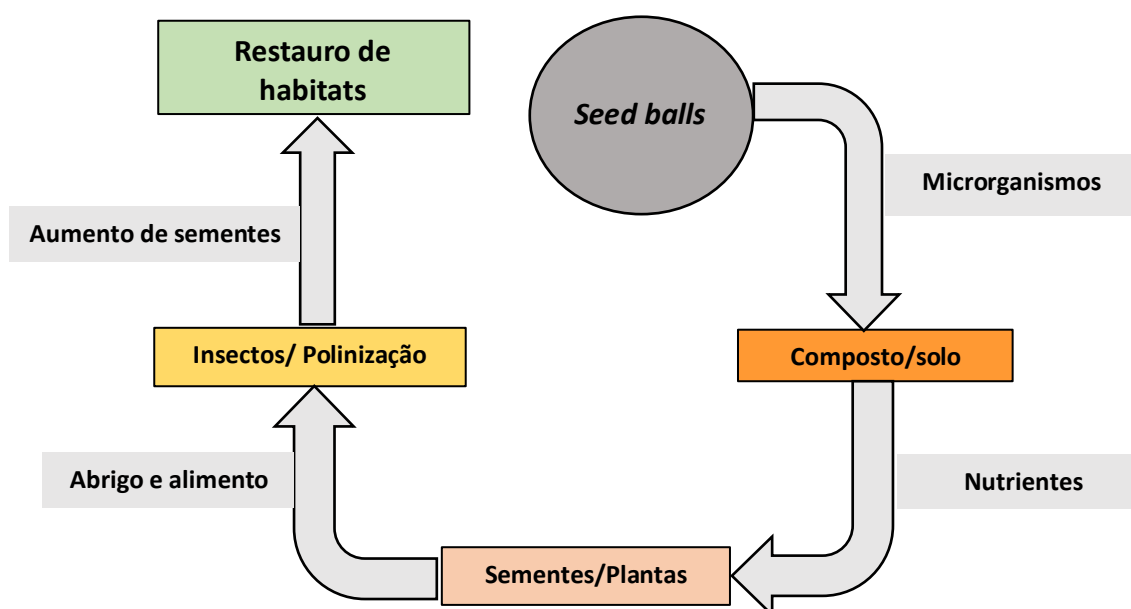


Figura 2. Utilização das *seed balls* em restauro ecológico promovendo a sua sustentabilidade. Adaptado de *Seed balls/Earthshed Solutions*.

Alguns estudos referem potenciais problemas no uso de técnicas de revestimento de sementes que necessitam de solução. Segundo Carvalho & Novembre (2011), o uso de sementes peletizadas pode ter alguns problemas, visto o *pellet* poder afectar o desempenho da semente durante a germinação. Isto porque o arranjo das partículas finas do *pellet* dificulta a emissão da raiz primária e a troca de gases, o que provoca, geralmente, um atraso no processo de germinação (Nascimento et al., 2009). Outros estudos confirmaram que sementes nuas de várias espécies germinaram mais rápido do que as sementes peletizadas (e.g. Franzin et al., 2004; Pires et al., 2004). Embora estes estudos tenham sido realizados com espécies agrícolas, alguma informação pode ser

aproveitada, já que, como referido anteriormente, os estudos com espécies potenciais para o restauro ecológico são muito escassos e requerem mais investigação. Investigadores e outros profissionais desta área necessitam partilhar falhas e desafios associados ao revestimento de sementes de plantas nativas de forma a que os esforços realizados tenham sucesso, e que sejam identificadas as possíveis limitações e melhorado o conhecimento geral dos factores que contribuem para revestimentos bem-sucedidos (Pedrini et al., 2020).

Uma vantagem indirecta das *seed balls* é a sua possível utilização em sensibilização e educação ambiental, com foco especial nas escolas do ensino básico e pré-escolar, devido ao potencial lúdico que lhes pode ser associado.

As escolas constituem um veículo privilegiado para a transmissão de pensamento e para a construção do conhecimento (Spironello et al., 2012). São um espaço importante de socialização e de troca de experiências e, quanto mais cedo se aplicar a educação ambiental no desenvolvimento infantil, maiores as hipóteses de se conseguir uma consciência ambiental efectiva (Cabral et al., 2015). Por outro lado, este processo de sensibilização da comunidade escolar pode incentivar iniciativas que vão para além do ambiente escolar, podendo alcançar tanto o bairro no qual a escola se encontra inserida como comunidades mais afastadas nas quais residam alunos, professores ou funcionários (Effting, 2007). Além disso, as crianças necessitam de contactar com a biodiversidade para se interessarem pela sua protecção (Chawla, 1999).

As *seed balls* podem constituir uma técnica eficaz de sensibilização ambiental em contexto escolar, principalmente em crianças mais novas, porque o processo de formação das *seed balls* assemelha-se em muito a moldar plasticina, constituindo assim uma actividade divertida para os mais novos. Esta vertente lúdica das *seed balls*, que constitui uma grande mais valia desta técnica, deve ser aproveitada para sensibilizar sobre a importância do restauro ecológico de habitats, os contextos em que tal é necessário (ex.: situações de degradação, erosão e desertificação) e formas práticas de o fazer. Nesse sentido, é proposto um protocolo para ser aplicado a escolas do ensino básico, em particular do 1º Ciclo (Anexo I), onde se pretende que as crianças, enquanto aprendem a fazer *seed balls*, sejam simultaneamente sensibilizadas para algumas problemáticas ambientais e que sejam capazes de, posteriormente, transmitir esse conhecimento.

1.4. Caso de estudo

As sementes constituem a melhor relação custo-benefício no restauro ecológico, no entanto, existem diversos factores limitantes da germinação e do estabelecimento das plantas, sejam questões logísticas, barreiras fisiológicas ou ecológicas.

Nesse sentido, têm sido desenvolvidas e melhoradas várias técnicas com o objectivo de aumentar o sucesso da revegetação e, conseqüentemente, o sucesso do restauro ecológico. No entanto, outras técnicas com grande potencial, como é o caso das *seed balls*, têm sido negligenciadas, sendo objecto de pouca investigação, o que resulta num reduzido suporte científico.

Considerando que o restauro ecológico se tem revelado um desafio peculiar na bacia do Mediterrâneo, principalmente devido ao clima que a caracteriza, este estudo pretende testar o comportamento das *seed balls* em contexto climático mediterrânico. Pretende-se também testar a incorporação de argila negra proveniente de barreiros portugueses da Beira Litoral nas *seed balls* e promover deste modo a utilização daquilo que, para a indústria das cerâmicas, é considerado um desperdício por apresentar um teor elevado de matéria orgânica e baixa plasticidade. A incorporação desta argila pode constituir uma mais-valia para as sementes contidas nas *seed balls*, visto que possui a matéria orgânica que é frequentemente adicionada à argila normal utilizada no seu fabrico. Além destes benefícios, a utilização desta argila negra é também uma forma de potenciar a técnica numa óptica de ecologia verde circular e sustentável.

Esta dissertação foi apoiada pelo projeto LIFE Natureza e Biodiversidade LIFE LINES Linear Infrastructure Networks with Ecological Solutions (LIFE14 NAT/PT/001081) co-financiado pela União Europeia, e pelo Banco de Sementes do Departamento de Biologia da Universidade de Évora, que forneceram o apoio logístico e os materiais para a realização deste estudo. O projeto LIFE LINES desenvolve-se no Alentejo Central e tem como principais objectivos a mitigação dos efeitos negativos das infraestruturas lineares e a criação de uma infraestrutura verde demonstrativa que acompanhe a infraestrutura cinzenta para potenciar a conservação da biodiversidade (LIFE LINES, 2018), incluindo a promoção de várias espécies de lepidópteros. Assim, as espécies de flora utilizadas neste estudo são promotoras de lepidópteros considerados espécies-alvo no contexto do projeto LIFE LINES, salientando o importante papel que os lepidópteros apresentam, enquanto polinizadores, no processo de restauro ecológico e no ecossistema. Apesar deste estudo não pretender obter uma conclusão directa sobre o funcionamento das *seed balls* na promoção de polinização por lepidópteros, pode dar uma indicação do potencial desta técnica enquanto promotora de habitat para os mesmos.

Assim, esta dissertação tem como objetivo definir qual a melhor percentagem de argila negra de barreiros portugueses da Beira Litoral a utilizar no fabrico das *seed balls* de forma a potenciar a germinação das sementes em contexto de clima mediterrânico. O funcionamento das *seed balls* será avaliado para as espécies vegetais individualmente, mas pretende-se também perceber se existe algum padrão comportamental ao avaliar as espécies tendo em conta o volume das suas sementes, de forma a permitir a extrapolação dos resultados preliminares para uma maior diversidade de espécies.

Este estudo, tanto quanto foi possível apurar na literatura consultada, é o primeiro do género nestas condições particulares, pelo que irá centrar-se na fase inicial do processo de restauro, nomeadamente na germinação das sementes contidas nas *seed balls* e emergência das plântulas. O desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da planta, bem como a implementação *in situ* desta técnica, não são alvo do âmbito desta dissertação, mas deverão constituir matéria de pesquisa futura.

2. Metodologia

2.1. Seleção de espécies

Para o presente estudo foram selecionadas seis espécies de plantas, *Agrostis castellana* Boiss. & Reut., *Mentha suaveolens* Ehrh., *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv., *Mantisalca salmantica* (L.) Briq. & Cavill., *Bituminaria bituminosa* (L.) C.H. Stirt. e *Cynara humilis* L. Esta selecção assentou nos seguintes critérios:

- espécies atrativas para várias espécies de lepidópteros, por constituírem ou fornecerem alimento, seja na fase larvar ou na fase alada (Stefanescu, 1997; Stefanescu & Traveset, 2009; Maravalhas, 2003; Obregón & Prunier, 2014; Aguado Martín et al., 2015);
- espécies com elevada taxa de germinação (acima de 95%) registada noutros estudos (Royal Botanic Gardens Kew; ENSCONET);
- espécies com condições ótimas de germinação semelhantes (Royal Botanic Gardens Kew; ENSCONET);
- espécies com sementes com volume semelhante (tomando o volume como um indicador da quantidade de endosperma) de forma a constituir 3 classes de dimensão de sementes mais ou menos homogéneas.

A nomenclatura e caracterização das espécies de flora utilizadas está de acordo com a Flora Ibérica (Castroviejo, 1986–2012) para as dicotiledóneas e com a Nova Flora de Portugal (Franco e Rocha Afonso, 1994–2003) para as monocotiledóneas.

As sementes das espécies utilizadas foram recolhidas em áreas de montado situadas no distrito de Évora (Alentejo, Portugal) no final da sua época de amadurecimento, durante as primaveras de 2016, 2017 e 2018, e as coordenadas geográficas (Tabela 1) dos locais de colheita foram registadas com GPS (Garmin Montana 680t). Para evitar danificar a população selvagem e garantir a sua regeneração natural, nunca foram recolhidas mais de 20% das sementes disponíveis, como recomendado por Royal Botanic Gardens Kew. O lote de sementes usado de cada espécie foi o mesmo em todas as etapas da experiência. As sementes foram limpas, desumidificadas a 15% de humidade e armazenadas, à temperatura ambiente, em recipientes de vidro hermeticamente fechados, até à realização dos ensaios de germinação (Novembro de 2018). As sementes visivelmente danificadas foram excluídas da experiência.

As espécies em análise, e respetivos lotes de sementes (Figura 3), foram caracterizados de acordo com a forma de vida da espécie, o lepidóptero beneficiado, peso de 1000 sementes e dimensão das mesmas (Tabela 1). O peso médio de 1000 sementes foi calculado de acordo com as regras do ISTA (ISTA, 2015) através da extrapolação do peso médio de 10 réplicas de 100 sementes aleatoriamente escolhidas. O volume médio de 30 sementes foi calculado para cada espécie, de acordo com Casco e Dias (2008), segundo a fórmula $Vol = \pi L W T / 6$, em que L – comprimento, W – largura e T – espessura. Com base nos volumes obtidos para as espécies em estudo, e nos valores globais de volume de sementes de espécies do Mediterrâneo referidas na base de dados (Ganhão & Dias, 2017), estabeleceram-se as seguintes classes de dimensão de sementes: pequenas ($\leq 1 \text{ mm}^3$), médias ($]1 - 20]$ mm^3) ou grandes ($]20 - 85]$ mm^3). *Brachypodium distachyon*, *M. salmantica* e *B. bituminosa* foram medidos com os respectivos apêndices, respeitando os requisitos de aplicação da fórmula acima. As sementes foram medidas com auxílio de uma craveira digital (POWERFIX – Profi +; IAN 94500) os requisitos de aplicação da fórmula acima. As sementes foram medidas com auxílio de uma craveira digital (POWERFIX – Profi +; IAN 94500).



Figura 3. Lotes de sementes utilizados no estudo (por ordem da esquerda para a direita: *Agrostis castellana*; *Mentha suaveolens*; *Mantisalca salmantica*; *Brachypodium distachyon*, *Bituminaria bituminosa* e *Cynara humilis*)

Tabela 1. Informação resumida sobre as seis espécies utilizadas no estudo.

Espécie	Família	Forma de vida	Peso de 1000 sementes (g)	Volume médio (\pm EP) (mm ³)	Classe de tamanho	Coordenadas	Ano de recolha	Lepidópteros alvo
<i>Agrostis castellana</i>	Gramineae	Hemicriptófito	0,06	0,005 \pm 0,001	Pequeno	38°31'57 °N 8° 01'46 °W	2016	<i>Pyronia tithonus</i>
<i>Mentha suaveolens</i>	Labiatae	Hemicriptófito	0,04	0,009 \pm 0,001	Pequeno	38°31'57 °N 8° 01'05 °W	2016	<i>Pyronia tithonus</i>
<i>Brachypodium distachyon</i>	Gramineae	Terófito	4,69	7,997 \pm 0,337	Médio	38°31'36 °N 8° 00'52 °W	2017	<i>Melanargia ines;</i> <i>Thymelicus acteon;</i> <i>Thymelicus lineola.</i>
<i>Mantisalca salmantica</i>	Compositae	Hemicriptófito	3,94	3,717 \pm 0,182	Médio	38°14'56 °N 7°59'57 °W	2018	<i>Vanessa cardui</i>
<i>Bituminaria bituminosa</i>	Leguminosae	Terófito	19,00	31,964 \pm 0,939	Grande	38°31'57 °N 8° 1'59 °W	2016	<i>Colias croceus;</i> <i>Gonepteryx cleopatra</i> <i>Pieris brassicae;</i> <i>Pieris rapae;</i> <i>Pontia daplidice</i>
<i>Cynara humilis</i>	Compositae	Hemicriptófito	0,95	54,954 \pm 2,424	Grande	38°31'44 °N 8° 01'02 °W	2018	<i>Vanessa cardui</i>

O ensaio de germinação foi dividido em duas etapas complementares: determinação prévia da viabilidade dos lotes utilizados e avaliação da germinação em *seed balls*.

2.2. Ensaio de germinação para determinação da viabilidade das sementes

A fim de determinar a viabilidade dos lotes de sementes utilizados, sementes de cada uma das espécies em análise foram colocadas a germinar em caixas de Petri (9 cm de diâmetro) com agar a 1% como substrato. De cada espécie do ensaio foram usadas 25 sementes por caixa de Petri (Figura 4), com quatro réplicas por espécie, ou seja, 4 caixas de Petri.



Figura 4. Fotografia de placa de Petri com vinte e cinco sementes de *Cynara humilis* para teste de viabilidade do lote das mesmas.

O ensaio foi realizado em câmara de germinação (FITOCLIMA S 600 PLH), com um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a 20°C, durante 31 dias. As sementes germinadas foram contadas diariamente e removidas das placas de Petri. Apesar de se considerar que uma semente germinou quando a radícula emerge do tecido envolvente (Bewley et al., 2013), para garantir uma germinação efetiva, considerou-se uma semente como germinada quando a radícula atingia pelo menos metade do tamanho da semente. A meio do ensaio, por apresentarem um nível de fungos capaz de influenciar a germinação das sementes, as caixas de Petri com agar foram substituídas e as sementes foram imersas durante 5 minutos numa solução de água e lixívia comercial a 10% (1:1) e, depois de bem enxaguadas em água destilada, transferidas para as novas caixas.

As caixas de Petri foram diariamente reorganizadas de forma aleatória, após a contagem, para assegurar que a sua posição não influenciava a germinação (Yang et al., 1999).

No final do ensaio, as sementes não germinadas foram dissecadas para determinar a sua viabilidade, ou seja, foi verificado se tinham ou não um embrião completo, com tecidos firmes e de cor clara, como recomendado por Gosling (2003) e consideradas viáveis apenas quando isso se verificava.

2.3. Ensaio de germinação em *seed balls*

Para produção das *seed balls* utilizaram-se dois tipos de argila fornecidos por uma empresa de extração de barros: uma argila negra, com elevado teor de matéria orgânica (22,9%), considerada um desperdício pela indústria de cerâmica, e uma outra argila, branca, com maior plasticidade, ambas finamente moídas (Figura 5). Utilizaram-se estas argilas em 4 combinações, de tal modo que a percentagem de argila negra utilizada em cada combinação (100%, 75%, 50% e 25%) fosse completada com argila branca (em 0%, 25%, 50% e 75%, respetivamente). Cada *seed ball* possuía um volume aproximado de 15 cm³ e foi produzida adicionando água a cada uma das misturas descritas até que elas se tornassem plásticas, sem se quebrarem. No interior de cada *seed ball* foram colocadas sete sementes da mesma espécie, de forma a que cada espécie fosse testada individualmente.



Figura 5. As duas argilas utilizadas (argila branca à esquerda e argila negra à direita)

As *seed balls* foram distribuídas em recipientes plásticos de 12 cm x 21,5 cm (258 cm²), contendo como substrato 400 cm³ de perlite, com o intuito de estabilizar as *seed balls* e, simultaneamente, manter a humidade nos recipientes. Cada recipiente foi dividido ao meio de forma a comportar seis *seed balls*, três de uma das espécies em estudo numa das metades e três da outra espécie com dimensão aproximada na outra metade. Os recipientes foram colocados na estufa, com rega controlada e com registo

de temperatura diário. A temperatura média da estufa variou entre 13,2 e 17,0 °C durante os 3 meses de ensaio. De forma a tentar simular o clima mediterrâneo, estabeleceram-se três regimes hídricos (seco, intermédio e húmido), conseguidos através de diferentes valores de regas semanais. Para se estimar o que poderia ser actualmente um ano seco, um ano intermédio e um ano húmido, utilizaram-se os dados de precipitação diária registada na Estação Meteorológica da Herdade da Mitra (ICT, 2020) entre Novembro de 1996 e Setembro de 2018. Depois de analisada a variação de precipitação deste período de tempo, convencionou-se 440 mm para um ano seco, 600 mm para um ano intermédio e 800 mm para um ano húmido. De acordo com estes valores e, considerando-se a área dos recipientes, estabeleceram-se os regimes de rega que constam na Tabela 2.

Tabela 2. Quantidade de água disponibilizada semanalmente a cada conjunto de 6 *seed balls*/modalidade de regime hídrico e ao grupo de amostras de referência, consoante o regime hídrico. Ref – Referência.

Regime hídrico	Seco		Intermédio		Húmido	
Recipiente	<i>Seed_balls</i>	Ref	<i>Seed balls</i>	Ref	<i>Seed balls</i>	Ref
Quantidade de água (ml)	55	32	75	41	100	60

Para cada espécie estudada estabeleceram-se doze réplicas (ou seja, doze *seed balls*) para cada uma das combinações das variáveis: percentagem de argila negra e regime hídrico. Os recipientes foram assinalados com um código numérico (número da réplica), com cores (variável % de argila e espécie) e um código de letras (A, B e C), de forma a que cada réplica (ou seja, cada *seed ball* de cada recipiente) fosse facilmente identificada para a contagem posterior da germinação das sementes (

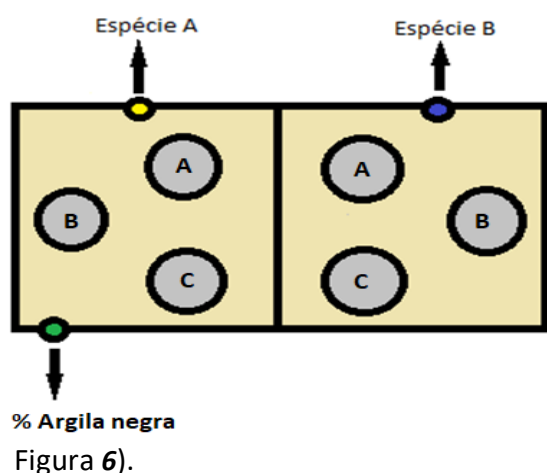


Figura 6. Esquema ilustrativo (à direita) e fotografia (à esquerda) dos recipientes e das *seed balls*. As letras A, B e C correspondem às diferentes réplicas.

Relativamente ao regime hídrico, os recipientes foram agrupados separadamente de forma a que cada grupo de recipientes pertencesse a um regime hídrico. As duas espécies presentes em cada recipiente correspondiam, no seu conjunto, ao grupo de sementes pequenas, médias ou grandes, de forma a simplificar a organização das *seed balls* e facilitar o posterior registo da germinação.

Estabeleceu-se também um grupo de referência (sementeira numa mistura de turfa e areia) constituído por doze réplicas para cada espécie em cada regime hídrico. O substrato usado consistiu em 221 cm³ de perlite na base e 221 cm³ de uma mistura contendo turfa e areia numa proporção de 1:2. Esta mistura foi separada da perlite através de tecido fino e permeável à água, de forma a impedir a passagem das sementes para a perlite. Em cada recipiente foram dispostas sete sementes da mesma espécie e foi também aqui utilizado um código numérico (número da réplica) e de cores (variável regime hídrico e espécie) de forma a que cada réplica (ou seja, cada recipiente) fosse facilmente identificada para a contagem posterior da germinação das sementes (Figura 7 e Figura 8).

Por razões de logística, a área dos recipientes usados para o grupo de referência (142,5 cm²) diferiu da área dos recipientes que contêm as *seed balls*, o que obrigou ao ajustamento das regas à área destes recipientes de forma a garantir a comparabilidade entre o grupo referência e as *seed balls*.

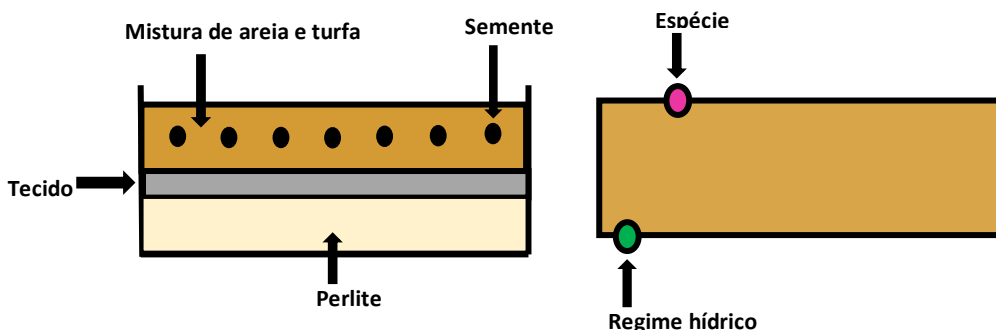


Figura 7. Esquema ilustrativo das amostras de referência, vistas de perfil e de cima.



Figura 8. Fotografia de referências.

Os recipientes, tanto das *seed balls* como do grupo de referência, foram regados uma vez por semana (Tabela 2), mas com quantidades de água diferentes consoante os regimes hídricos e o tipo de recipiente (devido às diferenças de área dos recipientes referidas anteriormente).

As contagens das sementes germinadas foram realizadas em dias alternados. Considerámos uma semente germinada, tanto para as *seed balls* como para o grupo de referência, quando as folhas cotiledonares ficavam visíveis.

O ensaio iniciou-se em Novembro de 2018 e terminou em Janeiro de 2019, contando com 42 dias de registos.

2.4. Análise de dados

A análise de dados foi delineada seguindo uma sequência de complexidade crescente, considerando os resultados obtidos a cada momento e pretendendo não só dar resposta aos objetivos da dissertação, mas também produzir conhecimento em falta sobre as espécies e os processos envolvidos.

Antes das análises, testou-se a normalidade e a homocedasticidade dos dados através dos testes Shapiro-Wilk e de Levine, respectivamente. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 e as análises estatísticas foram realizadas com o *software* IBM SPSS Statistics 24.

2.4.1. Viabilidade das sementes e germinação

Os dados resultantes do ensaio de viabilidade permitiram calcular a percentagem de viabilidade das sementes de cada uma das espécies em estudo, de acordo com a fórmula **Viabilidade (%) = (SV x 100)/NT**, onde SV é o número de sementes viáveis (sementes germinadas mais sementes viáveis que não germinaram) e NT o número total de sementes.

No ensaio de germinação em *seed balls*, foram calculados a percentagem de germinação e o tempo médio de germinação (TMG) em cada *seed ball*, para cada uma das espécies e respectivas referências, com base nas fórmulas abaixo indicadas:

1. **Sementes inviáveis = (NT-N)*(1-V)**, onde NT é o total de sementes semeadas, N é o número de sementes germinadas, e V é o valor de viabilidade calculado no ensaio de viabilidade;

2. **Germinação (%) = $(N \times 100)/(NT-SI)$** , onde N é o número de sementes germinadas, NT é o total de sementes semeadas, e SI é o valor de sementes inviáveis;
3. **Tempo de germinação médio (TGM) = $\sum(n_i * t_i) / \sum n_i$** , onde n_i é o número de sementes germinadas no dia i e t_i é o número de dias de ensaio até ao dia i.

O cálculo da percentagem de germinação foi feito com base na aplicação de um factor de viabilidade, que se expressa pela subtração do número de sementes inviáveis ao total de sementes semeadas. A aplicação do factor de viabilidade permite uma comparação directa entre as espécies e uma correcta interpretação dos resultados. De outro modo, diferentes percentagens de germinação poderiam ser também consequência da viabilidade, dificultando a avaliação da influência dos factores efectivamente em análise.

Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney de forma a ser avaliada a existência de diferenças significativas na viabilidade entre as espécies. O mesmo teste foi também utilizado para detetar diferenças significativas na percentagem e tempo de germinação de cada espécie entre *seed balls* e as referências correspondentes.

2.4.2. **Análise dos factores que influenciam a germinação das espécies em *seed balls***

A influência da percentagem de argila negra e do regime hídrico na percentagem de germinação das espécies foi avaliada através do teste de Mann-Whitney. O efeito do regime hídrico na germinação foi avaliado tanto nas *seed balls* como nas referências, enquanto o efeito da percentagem de argila negra foi analisado apenas na germinação em *seed balls*, visto que a mesma não foi utilizada nas referências.

Uma vez que a germinação das diferentes espécies pode ser naturalmente reduzida ou elevada, a avaliação da germinação nas *seed balls* deverá ter em consideração o comportamento germinativo esperado para cada espécie. A germinação nas condições de referência constitui, assim, a resposta esperada para cada espécie, nas mesmas condições experimentais das *seed balls*. Assim, quanto mais próxima for a germinação nas referências e nas *seed balls*, maior será a adequação das *seed balls* à germinação. Como tal, para um mesmo regime hídrico, foi calculada a percentagem de semelhança entre a germinação registada em cada classe de percentagem de argila negra das *seed balls* e a respetiva referência, para cada espécie. Tratando-se de dados bivariados, e sendo o objectivo comparar quantitativamente a percentagem de germinação nas *seed balls* e nas referências para cada espécie, não foi possível a utilização dos vulgarmente utilizados coeficientes de semelhança para dados multivariados, pelo que a percentagem de semelhança foi calculada de acordo com a fórmula **Semelhança_{wi} = $(PGSB_{wi}/PGR_w)/Máximo(PGSB_{wi}/PGR_{wi}) \times 100$** , onde $PGSB_{wi}$ é a percentagem média de

germinação obtida nas *seed balls* para o regime hídrico w e percentagem de argila negra i , enquanto PGR_w é a percentagem média de germinação registada nas referências para as mesmas condições hídricas. Os valores variam entre 0 e 100 e são tanto mais elevados quanto maior for a semelhança entre a percentagem de germinação nas referências e em *seed balls*.

Os valores de semelhança calculados foram analisados graficamente com base em 3 classes de semelhança estabelecidas: baixa – [0-25%], intermédia –]25-50%[e elevada – [50-100%], para se comparar o padrão de germinação das diferentes espécies nas possíveis combinações de argila negra e regime hídrico, utilizando o Coeficiente de Concordância de Kendall e, simultaneamente, avaliar a concordância no padrão de germinação entre espécies com dimensões de semente mais aproximadas: pequenas (*A. castellana* e *M. suaveolens*), médias (*B. distachyon* e *M. salmantica*), grandes (*B. bituminosa* e *C. humilis*).

Para avaliar a possibilidade de um efeito conjunto da percentagem de argila negra, do regime hídrico e da classe de volume das sementes (fatores) na germinação em *seed balls*, independentemente da espécie (variável dependente), realizou-se uma ANOVA factorial. Foram testados os efeitos de cada variável independente, assim como o efeito conjunto das mesmas, considerando as combinações possíveis, i.e., se o efeito de uma variável independente é o mesmo em todos os níveis das outras variáveis independentes.

2.4.3. Seleção da percentagem de argila negra mais adequada ao sucesso germinativo em *seed balls*

A metodologia CART (*Classification and Regression Trees*) (Breiman et al., 1984) foi utilizada para escolher a melhor percentagem de argila negra a utilizar em *seed balls* (variável dependente), em função das variáveis decisórias (independentes) classe de dimensão das sementes, tipo de regime hídrico e sucesso da germinação. O sucesso da germinação foi quantificado com base na combinação de informação quer da percentagem de germinação nas *seed balls*, quer da semelhança da germinação entre estas e as referências. De facto, a germinação em *seed balls* pode ser baixa, mas se esse for o valor esperado para a espécie, ficará expresso por uma elevada semelhança com as referências. Neste caso, o sucesso germinativo foi alcançado, não se esperando uma melhor combinação destes valores.

Para o cálculo do sucesso germinativo, tanto a percentagem de germinação nas *seed balls* como a sua semelhança com as referências foram transformadas em classes, às quais foram atribuídas pontuações (Tabela 3). O valor final resultou do produto entre as pontuações anteriores, atribuídas a cada *seed ball*, e foi expresso em 4 classes (Tabela 3).

Tabela 3. Classes estabelecidas e pontuações atribuídas à percentagem de germinação e semelhança de germinação entre *seed balls* e referências, para o cálculo do sucesso de germinação

Variáveis	Classes	Pontuação
Percentagem de germinação nas <i>seed balls</i> (PG)	0%	0
	0% a 5%	1
	5% a 10%	2
	Superior a 10%	3
Semelhança de germinação entre <i>seed balls</i> e referências (SG)	inferior ou igual a 25%	1
	25% a 50%	2
	Superior ou igual a 50%	3
Sucesso de germinação (PG x SG)	Nulo	0
	Baixo	1
	Médio	2 a 4
	Elevado	6 a 9

Com este método, foi possível produzir um esquema explicativo (Árvore Decisória) para a variável dependente, considerando a sua possível relação com as variáveis independentes. Na construção da Árvore, o conjunto de dados é submetido a uma divisão binária, de modo que os dados dentro de cada subconjunto sejam mais homogêneos do que no conjunto precedente. Este método recorre a um processo recursivo, no qual cada subconjunto de dados é sucessivamente subdividido, até que o critério da homogeneidade tenha sido alcançado, ou até que um outro critério de paragem seja satisfeito. Este método suporta dados categóricos e métricos, sem necessidade de transformação.

3. Resultados

À semelhança da secção da metodologia, optou-se por estruturar a presente secção em subsecções consoante a tipologia de ensaio.

3.1. Avaliação do ensaio de germinação para determinação da viabilidade das sementes

As percentagens de viabilidade apresentadas abaixo foram obtidas em câmara de germinação, em condições controladas, tal como descrito anteriormente na Metodologia. Os lotes de sementes das espécies em estudo apresentaram uma percentagem de viabilidade superior a 80% (Figura 9), com excepção de *Cynara humilis* que apresentou uma percentagem superior a 70%. Em média apresentaram uma viabilidade de 87% com *Brachypodium distachyon* a apresentar a percentagem de viabilidade mais elevada (98%), enquanto que a *C. humilis* apresentou a mais baixa (73%).

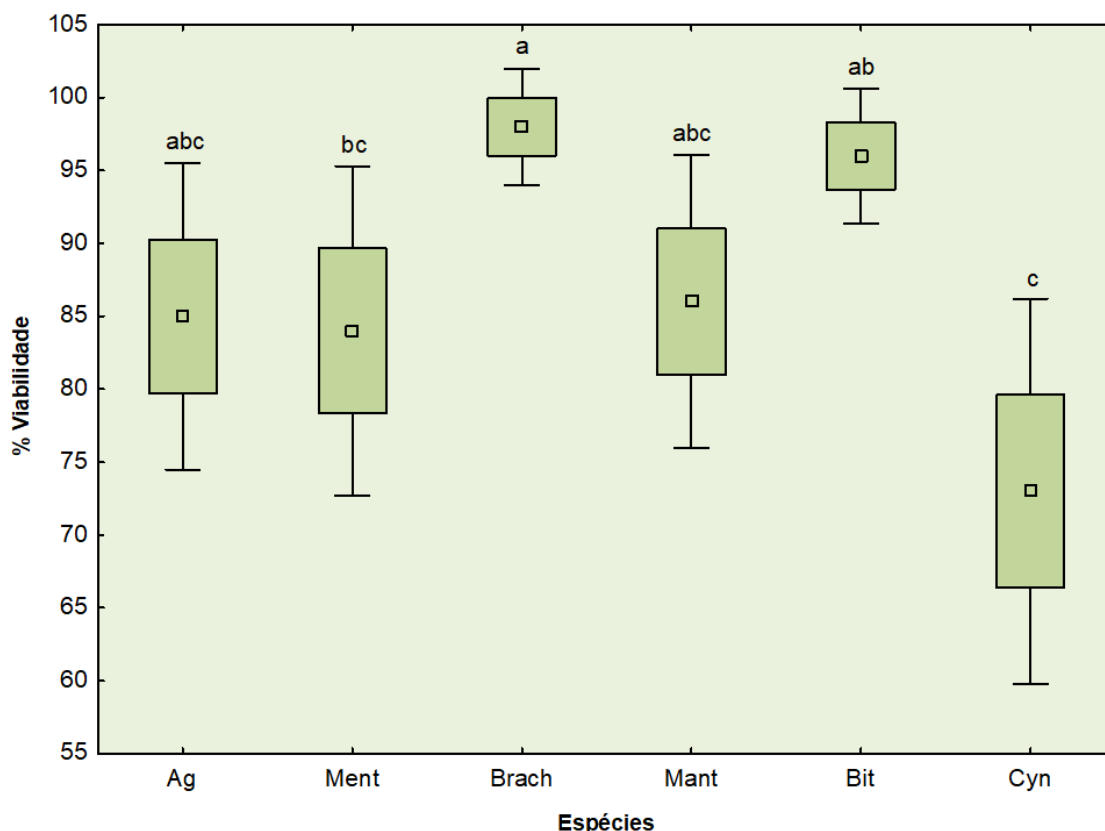


Figura 9. Percentagem de viabilidade (ponto: média; caixa: média \pm erro-padrão; bigodes: média \pm desvio-padrão). Os acrónimos usados significam: Ag – *Agrostis castellana*; Ment – *Mentha suaveolens*; Brach – *Brachypodium distachyon*; Mant – *Mantisalca salmantica*; Bit – *Bituminaria bituminosa*; Cyn – *Cynara humilis*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a percentagem de viabilidade das espécies.

3.2. Avaliação do ensaio de germinação em *seed balls*

3.2.1. Avaliação da germinação em *seed balls* por espécie

Independentemente da percentagem de argila negra e do regime hídrico, todas as espécies apresentaram percentagens de germinação significativamente ($P < 0,001$) mais elevadas nas referências do que nas *seed balls* (Figura 10). Nas referências as taxas de germinação estão compreendidas entre 9% e 82% e nas *seed balls* entre 0% e 17%.

Avaliando as espécies individualmente, verificou-se que *B. distachyon* e *C. humilis* foram as espécies com maior taxa de germinação, tanto nas referências (82% e 46%, respetivamente) como nas *seed balls* (12% e 17%, respetivamente). Por outro lado, *A. castellana* e *M. salmantica* também obtiveram das maiores taxas de germinação nas referências (50% e 36%, respetivamente), mas nas *seed balls* a taxa de germinação foi baixa (aproximadamente 1% para ambas as espécies).

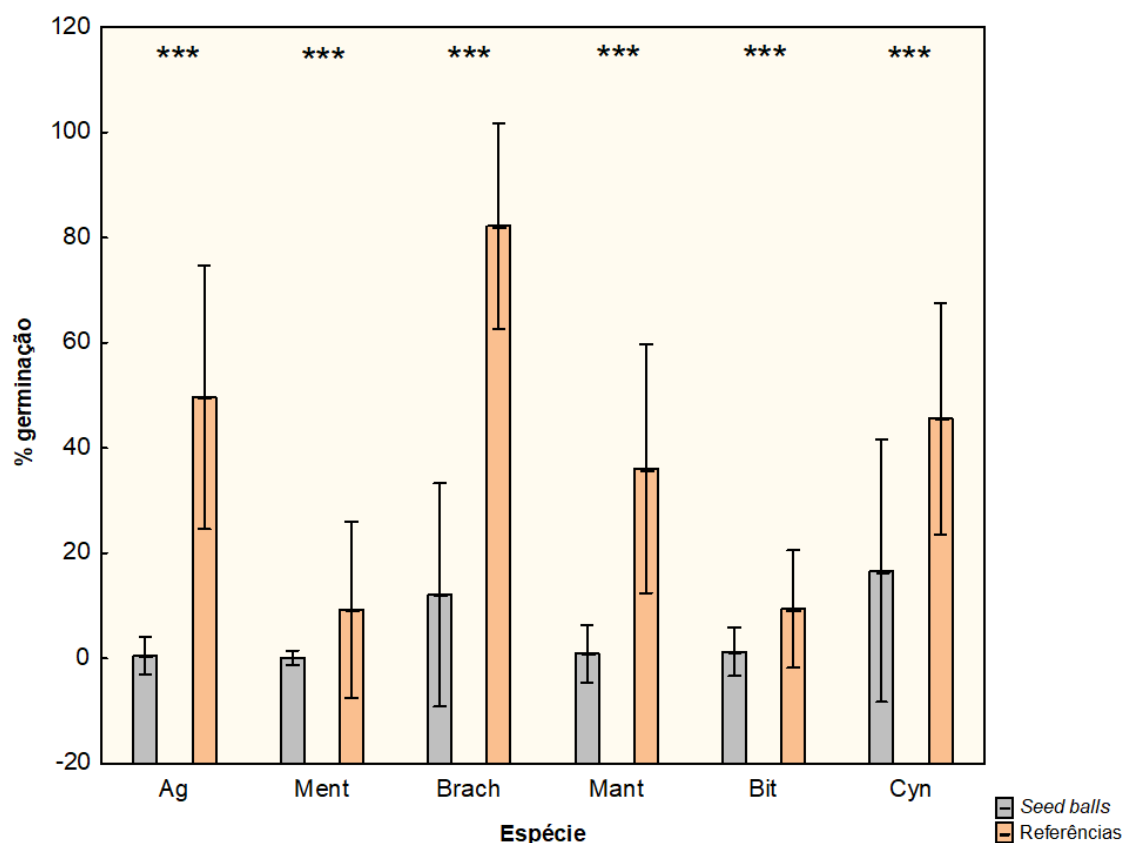


Figura 10. Percentagem de germinação (média \pm desvio-padrão) nas referências e nas *seed balls*. Os acrónimos usados significam: Ag – *Agrostis castellana*; Ment – *Mentha suaveolens*; Brach – *Brachypodium distachyon*; Mant – *Mantisalca salmantica*; Bit – *Bituminaria bituminosa*; Cyn – *Cynara humilis*. Diferença estatística entre a % germinação em situações de referência e em *seed balls*. *** $P < 0,001$.

Em relação ao tempo médio de germinação (Figura 11), observou-se que as espécies em análise (com exceção da *M. suaveolens*) apresentaram um valor de TMG significativamente menor nas situações de referência (entre 12 e 27 dias) quando comparadas com as *seed balls* (entre 25 e 33 dias).

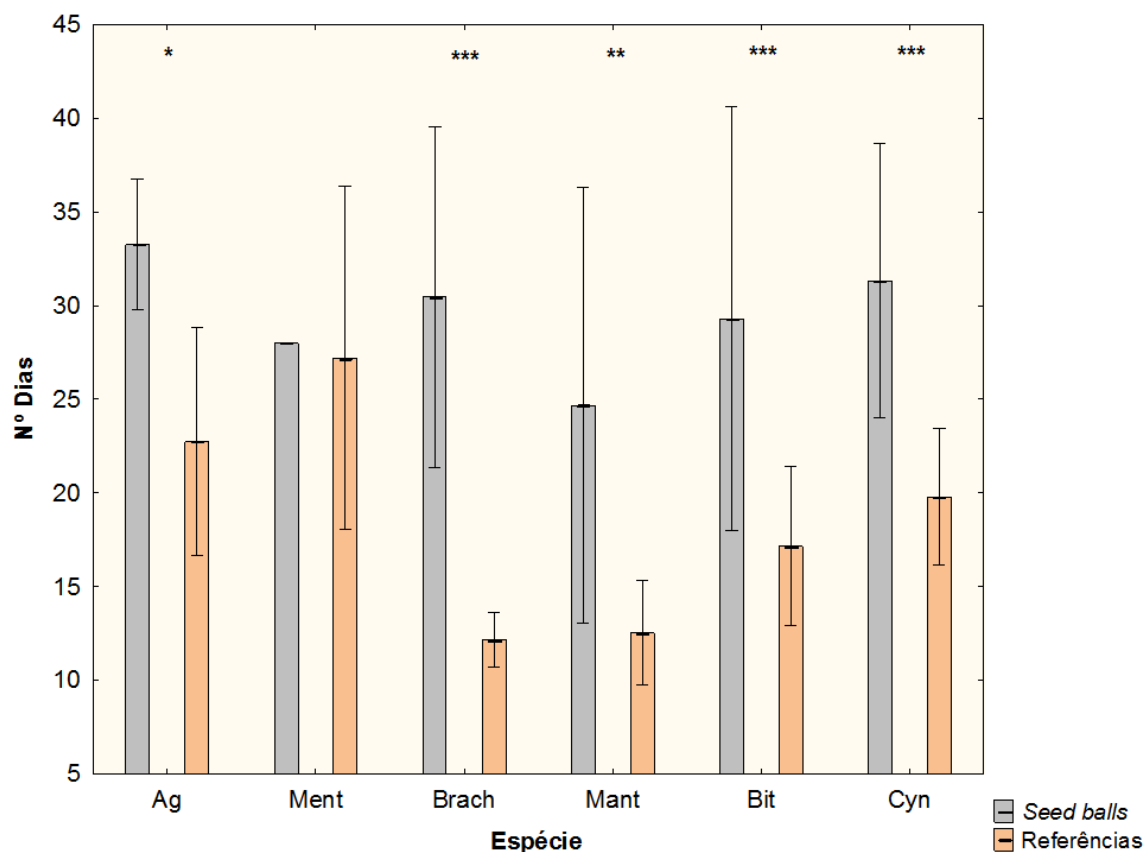


Figura 11. Tempo médio de germinação (TMG; média \pm desvio-padrão) nas referências e nas *seed balls*. Os acrônimos usados significam: Ag – *Agrostis castellana*; Ment – *Mentha suaveolens*; Brach – *Brachypodium distachyon*; Mant – *Mantisalca salmantica*; Bit – *Bituminaria bituminosa*; Cyn – *Cynara humilis*. Diferença estatística entre a % germinação em situações de referência e *seed balls*: * $P < 0,05$; ** $0,001 < P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. A ausência de * significa que não existem diferenças significativas entre o tempo médio de germinação nas referências e nas *seed balls* para essa espécie.

Nas referências verificou-se que as seis espécies em estudo germinaram em todos os regimes hídricos (Tabela 4 e Figura 12). *Brachypodium distachyon* foi a espécie que apresentou taxas de germinação mais elevadas nos três regimes hídricos (entre 73% e 89%), enquanto que as espécies com taxas de germinação mais baixas foram *B. bituminosa* no regime húmido (7%) e *M. suaveolens* nos regimes intermédio e seco (3% e 9%, respetivamente). Apenas se verificaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a percentagem de germinação no regime seco e no regime húmido de *M. suaveolens* e de *M. salmantica*.

Tabela 4. Germinação média das espécies nas referências (média \pm desvio-padrão) por regime hídrico (húmido, intermédio e seco). Os acrónimos usados significam: RH - Regime hídrico; H – Húmido; I – Intermédio; S – Seco.

R	Espécie	Referência	R	Espécie	Referência	R	Espécie	Referência
H		(Média \pm DP)	H		(Média \pm DP)	H		(Média \pm DP)
	<i>A. castellana</i>	54,25 \pm 26,14		<i>A. castellana</i>	50,10 \pm 32,62		<i>A. castellana</i>	44,55 \pm 14,23
	<i>M. suaveolens</i>	16,21 \pm 15,15		<i>M. suaveolens</i>	8,93 \pm 22,74		<i>M. suaveolens</i>	2,66 \pm 7,01
H	<i>B. distachyon</i>	72,87 \pm 28,82	I	<i>B. distachyon</i>	89,46 \pm 10,61	S	<i>B. distachyon</i>	84,16 \pm 10,49
	<i>M. salmantica</i>	25,28 \pm 31,25		<i>M. salmantica</i>	36,35 \pm 17,58		<i>M. salmantica</i>	46,60 \pm 15,55
	<i>B. bituminosa</i>	7,37 \pm 11,74		<i>B. bituminosa</i>	12,28 \pm 12,28		<i>B. bituminosa</i>	8,56 \pm 9,77
	<i>C. humilis</i>	38,34 \pm 28,62		<i>C. humilis</i>	49,15 \pm 22,85		<i>C. humilis</i>	49,17 \pm 10,69

Quando analisada a taxa de germinação em *seed balls*, sem considerar as classes de argila, verificou-se que as espécies em estudo não obtiveram percentagens de germinação significativamente diferentes nos diferentes regimes hídricos testados (Figura 12), exceptuando *Brachypodium distachyon* e *Cynara humilis*. Verificou-se que *B. distachyon* germinou significativamente menos com o regime húmido, enquanto que *C. humilis* germinou mais nos regimes com maior humidade (regime húmido e regime intermédio). *Brachypodium distachyon* e *C. humilis* foram as espécies que apresentaram percentagens de germinação mais elevadas (superiores a 20%), em particular no regime intermédio.

Considerando as *seed balls* agrupadas por classes de volume da semente (pequenas, médias e grandes) verificou-se que, na maior parte dos grupos, o comportamento da germinação face ao regime hídrico foi idêntico entre as espécies com dimensão de semente idêntica (Figura 12). As *seed balls* das espécies de sementes de pequena dimensão (*A. castellana* e *M. suaveolens*) apenas germinaram em regime húmido. As espécies com sementes de dimensão média (*B. distachyon* e *M. salmantica*) apresentaram uma taxa de germinação baixa ou nula no regime húmido. Estas espécies, apesar de não se verificarem diferenças significativas, apresentaram valores de germinação superiores no regime intermédio. As *seed balls* das espécies de sementes de dimensão grande (*B. bituminosa* e *C. humilis*) tiveram um comportamento distinto entre elas, em que *B. bituminosa* apresentou uma percentagem de germinação significativamente mais elevada nos regimes seco e intermédio (1% e 2%, respectivamente), enquanto que *C. humilis* apresentou uma percentagem de germinação significativamente menor no regime seco (4%) do que nos outros regimes (23%) (Figura 12).

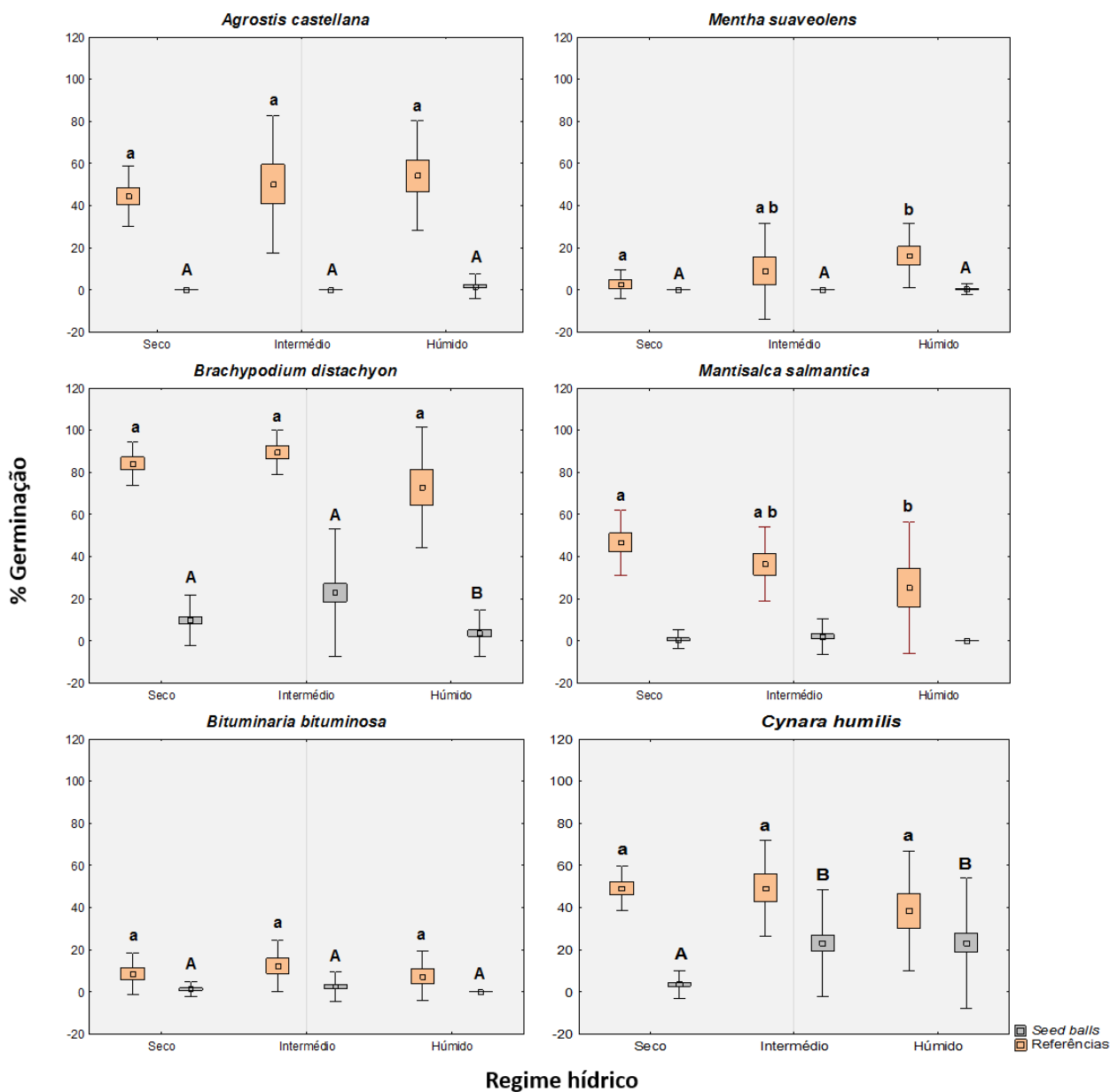


Figura 12. Percentagem de germinação (ponto: média; caixa: média±erro-padrão; bigodes: média±desvio-padrão) considerando apenas as classes de regime hídrico (seco, intermédio e húmido) nas referências e nas *seed balls*. Os acrónimos usados significam: Ag – *Agrostis castellana*; Ment – *Mentha suaveolens*; Brach – *Brachypodium distachyon*; Mant – *Mantisca salmantica*; Bit – *Bituminaria bituminosa*; Cyn – *Cynara humilis*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) nas percentagens de germinação entre os diferentes regimes hídricos. As letras maiúsculas e minúsculas indicam as diferenças significativas em *seed balls* e nas referências, respectivamente.

Excluindo a influência do regime hídrico, todas as espécies apresentaram diferenças significativas entre percentagens de germinação nas diferentes classes de argila ($p < 0,05$), excepto *A. castellana* e *M. suaveolens* (Figura 13). Três espécies germinaram em todas as classes de argila testadas (*B. distachyon*, *M. salmantica* e *C. humilis*) e *B. bituminosa* apenas não germinou na classe 100% de argila negra. Das duas espécies restantes, *A. castellana* e *M. suaveolens*, a primeira germinou apenas com 25% e com 50% de argila e a segunda apenas com 25% de argila. As espécies que germinaram mais foram *B. distachyon* e *C. humilis*, sendo que *B. distachyon* germinou mais em *seed balls* com 25% e 50% de argila (18% e 13%, respectivamente), enquanto que *C. humilis* germinou menos com 25% de argila (6%).

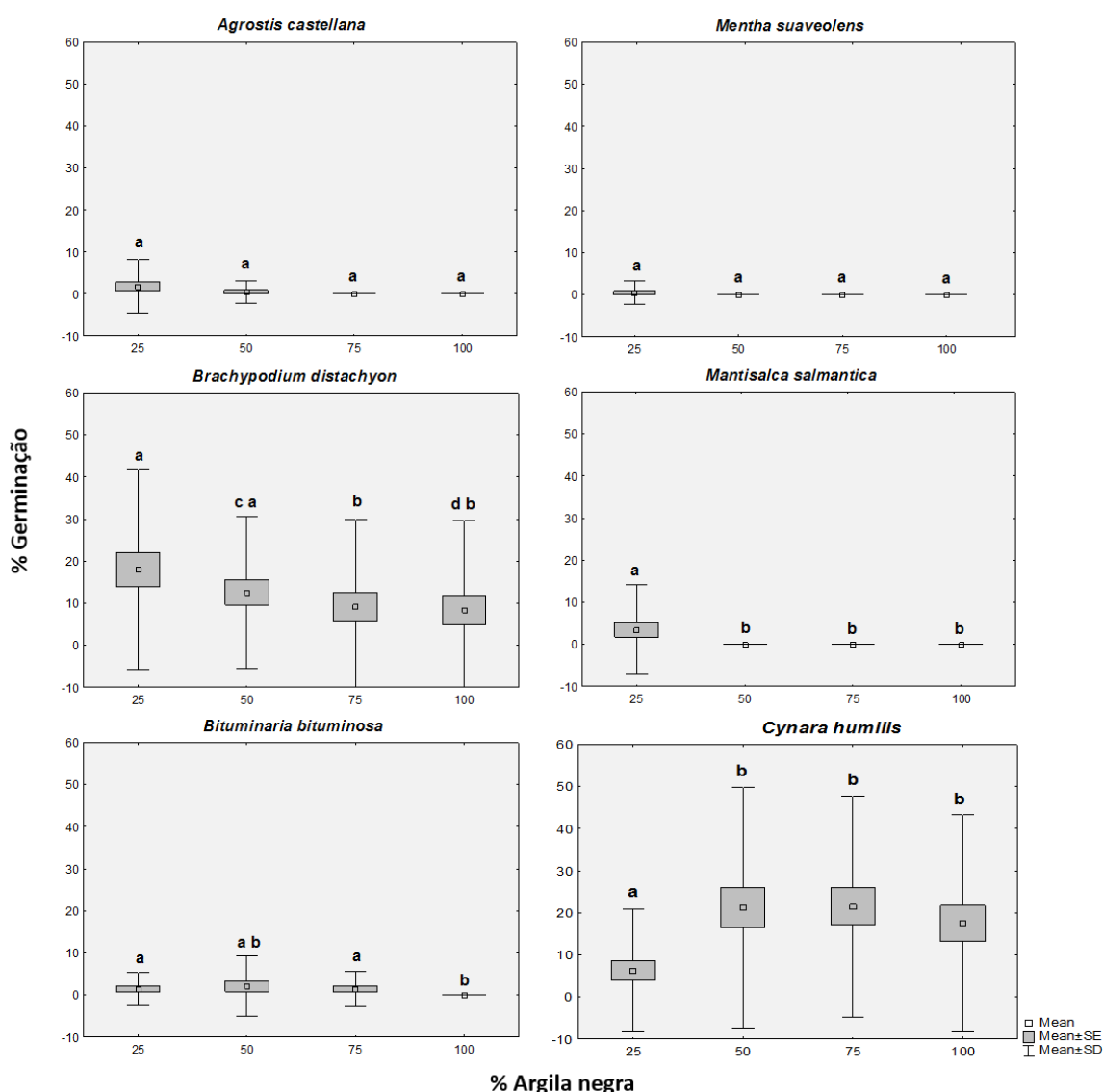


Figura 13. Percentagem de germinação (ponto: média; caixa: média \pm erro-padrão; bigodes: média \pm desvio-padrão) considerando apenas as classes de percentagens de argila negra (25%, 50%, 75% e 100%) nas *seed balls*. Os acrónimos usados significam: Ag – *Agrostis castellana*; Ment – *Mentha suaveolens*; Brach – *Brachypodium distachyon*; Mant – *Mantisalca salmantica*; Bit – *Bituminaria bituminosa*; Cyn – *Cynara humilis*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre percentagem de germinação entre as diferentes percentagens de argila negra.

Nas *seed balls*, e considerando a combinação entre os regimes hídricos e as percentagens de argila negra, verificou-se que nem todas as espécies germinaram em todas as combinações de regime hídrico e percentagem de argila testadas. *Brachypodium distachyon* e *C. humilis* foram as espécies com percentagens de germinação mais elevadas (26% e 45%, respetivamente), considerando todas as combinações de regime hídrico e percentagem de argila negra (Tabela 5).

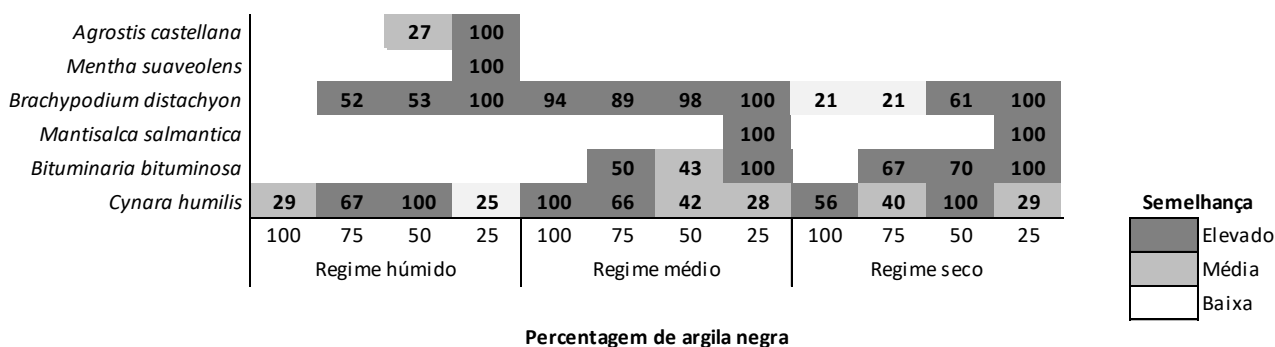
Cynara humilis obteve maiores taxas de germinação para as classes de argila negra de 50% no regime hídrico húmido e de 100% no regime intermédio (42% e 45%, respetivamente). Por sua vez, *B. distachyon* obteve as taxas de germinação mais elevadas com argila negra a 25% e 50% nos regimes hídricos intermédio (26 e 23% de germinação, respetivamente) e seco (21% e 11% de germinação, respetivamente).

Tabela 5. Germinação das espécies (média \pm desvio-padrão) nas *seed balls* de acordo com o regime hídrico (húmido, intermédio e seco) e percentagem de argila negra (25%, 50%, 75% e 100%). Os acrónimos usados significam: H – regime húmido, I – regime intermédio e S – regime seco; 100, 75, 50 e 25 corresponde às percentagens de argila negra utilizada para a elaboração das *seed balls*.

Espécie	Grupo	Germinação (Média \pm DP)	Grupo	Germinação (Média \pm DP)	Grupo	Germinação (Média \pm DP)
<i>A. castellana</i>		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00
<i>M. suaveolens</i>		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00
<i>B. distachyon</i>		0,00 \pm 0,00		21,57 \pm 33,20		3,63 \pm 6,57
<i>M. salmantica</i>	H100	0,00 \pm 0,00	I100	0,00 \pm 0,00	S100	0,00 \pm 0,00
<i>B. bituminosa</i>		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00
<i>C. humilis</i>		4,50 \pm 11,10		44,92 \pm 27,00		3,02 \pm 5,85
<i>A. castellana</i>		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00
<i>M. suaveolens</i>		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00
<i>B. distachyon</i>		3,61 \pm 12,51		20,39 \pm 30,95		3,62 \pm 6,54
<i>M. salmantica</i>	H75	0,00 \pm 0,00	I75	2,47 \pm 5,76	S75	0,00 \pm 0,00
<i>B. bituminosa</i>		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00		1,85 \pm 4,60
<i>C. humilis</i>		34,90 \pm 32,93		25,78 \pm 22,94		3,87 \pm 4,79
<i>A. castellana</i>		1,37 \pm 4,73		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00
<i>M. suaveolens</i>		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00
<i>B. distachyon</i>		3,63 \pm 6,57		22,85 \pm 25,62		11,44 \pm 11,68
<i>M. salmantica</i>	H50	0,00 \pm 0,00	I50	0,00 \pm 0,00	S50	0,00 \pm 0,00
<i>B. bituminosa</i>		0,00 \pm 0,00		4,90 \pm 11,45		1,23 \pm 4,25
<i>C. humilis</i>		42,02 \pm 36,28		15,93 \pm 20,61		5,72 \pm 10,17
<i>A. castellana</i>		5,40 \pm 10,50		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00
<i>M. suaveolens</i>		1,38 \pm 4,78		0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00
<i>B. distachyon</i>	H25	7,23 \pm 16,84	I25	26,37 \pm 33,91	S25	20,45 \pm 12,96
<i>M. salmantica</i>		0,00 \pm 0,00		7,88 \pm 15,66		2,53 \pm 8,77
<i>B. bituminosa</i>		0,00 \pm 0,00		2,47 \pm 5,76		1,85 \pm 3,35
<i>C. humilis</i>		11,28 \pm 21,65		6,05 \pm 11,70		1,55 \pm 3,62

Na germinação das *seed balls* verificou-se que as espécies apresentam, tendencialmente, um padrão de semelhança de germinação entre referências e *seed balls* para a mesma classe de dimensão de semente (Tabela 6). Espécies com sementes pequenas (*A. castellana* e *M. suaveolens*) e médias (*B. distachyon* e *M. salmantica*) apresentaram o máximo de semelhança de germinação entre *seed balls* e referências com 25% de argila em todos os regimes hídricos onde ocorreu germinação. As espécies com sementes de grande dimensão (*B. bituminosa* e *C. humilis*) apresentaram uma maior variabilidade no padrão de germinação, porém observa-se uma tendência para a maior semelhança de germinação entre *seed balls* e referências ocorrer com 50–75% de argila negra.

Tabela 6. Diferença padronizada (semelhança) entre a percentagem de germinação média das espécies testadas nas referências e nas *seed balls*, utilizando diferentes percentagens de argila negra (25%, 50%, 75% e 100%) e nos vários regimes hídricos (húmido, intermédio e seco). O grau de semelhança está classificado em elevado (≥ 50 ; a cinzento escuro), intermédio (>25 - <50 ; a cinzento) e baixo (≤ 25 ; a branco).



3.3. Avaliação da germinação em *seed balls* por volume de semente

Considerando o agrupamento das espécies por classe de dimensão, verificou-se que as variáveis em estudo (regime hídrico, percentagem de argila negra e dimensão da semente) influenciam a germinação das sementes nas *seed balls* (Figura 14). Verificou-se que, quando avaliada individualmente, a percentagem de argila não teve um efeito significativo na germinação, enquanto que as variáveis regime hídrico e dimensão da semente influenciaram, por si só, a taxa de germinação das sementes nas *seed balls*. Quando se avaliaram as variáveis combinadas observou-se que todas as combinações testadas influenciaram a taxa de germinação. A dimensão da semente e o regime hídrico, bem como a combinação dos dois efeitos, foram as variáveis que mais influenciaram a taxa de germinação das sementes nas *seed balls* ($P < 0,001$).

Quando analisadas as taxas de germinação nas *seed balls*, considerando as espécies agrupadas por classe de dimensão, verificou-se que as sementes de dimensão pequena apresentaram baixos valores de germinação. Para esta classe de dimensão de sementes os valores mais elevados (3%) verificaram-se no regime húmido e nas *seed balls* com 25% de argila negra (Figura 13).

Efeito	df	F	P
Regime	2	12,722	0,000
Argila	3	0,562	0,640
Semente	2	28,447	0,000
Regime*Argila	6	2,474	0,022
Regime*Semente	4	8,655	0,000
Argila*Semente	6	3,794	0,001
Regime*Argila*Semente	12	2,077	0,016



Figura 14. Efeito das variáveis em estudo (regime hídrico, percentagem de argila negra e dimensão da semente) na percentagem de germinação em *seed balls* considerando as espécies agrupadas por classe de dimensão de semente (pequenas, médias e grandes).

Relativamente às sementes de dimensão média, a taxa de germinação foi mais elevada no regime intermédio e nas *seed balls* com 25% de argila negra (17%), enquanto que os valores menores se verificaram no regime húmido.

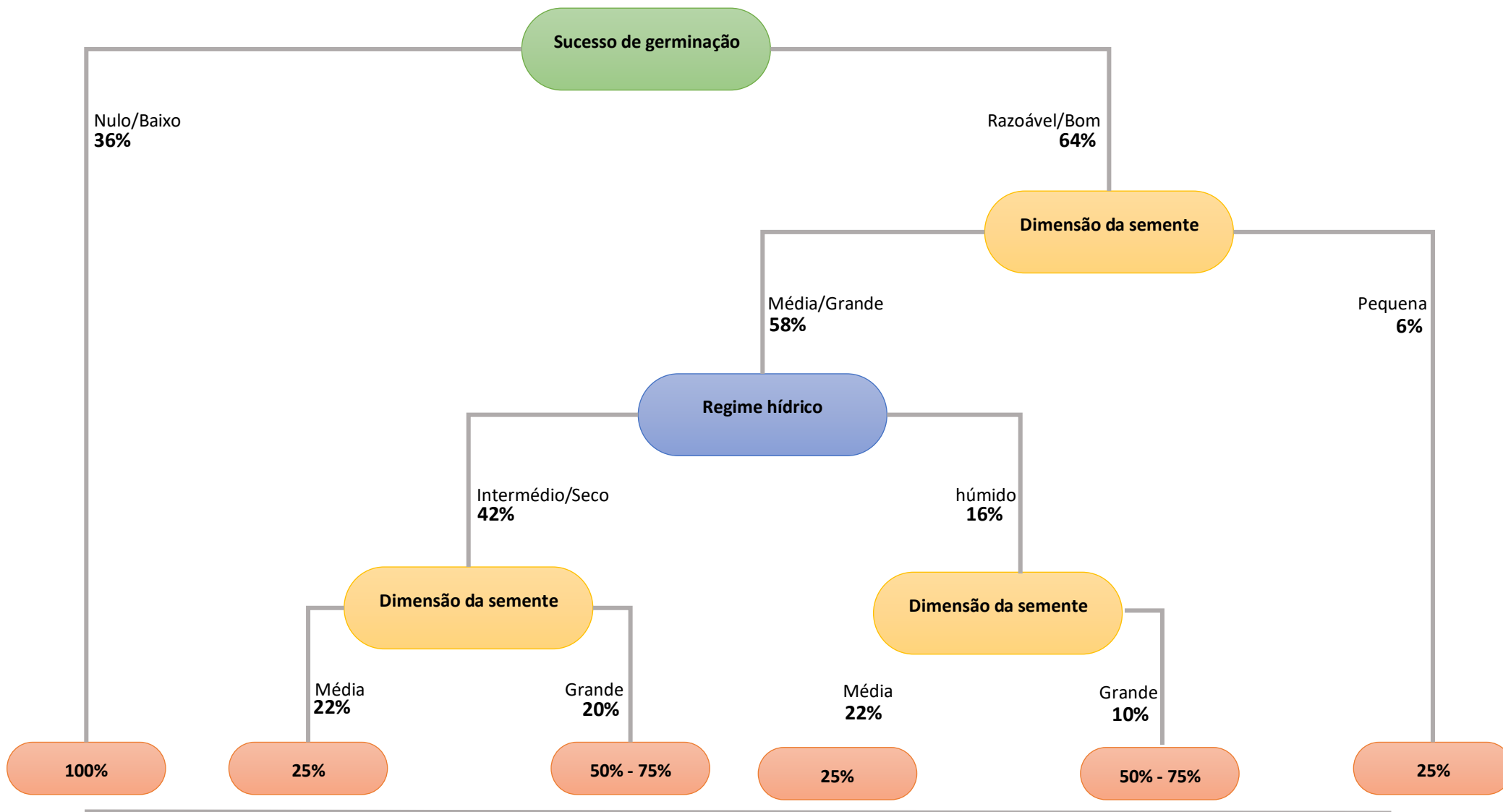
Nas sementes de dimensão grande, foi no regime húmido que se obteve uma taxa de germinação mais elevada para as *seed balls* com 50% e 75% de argila negra (21% e

17%, respetivamente). Os valores de germinação mais elevados – em termos relativos e em termos absolutos – foram obtidos nas *seed balls* com 100% de argila negra e sementes de grande dimensão, sob regime intermédio (22%). O regime seco foi o regime hídrico onde se verificaram os menores valores de germinação para sementes grandes, independentemente da percentagem de argila negra das *seed balls*.

3.4. Árvore decisória

Considerando que o sucesso de germinação pode ser influenciado pela percentagem de germinação e da semelhança de germinação entre *seed balls* e as situações de referência, estabeleceu-se a árvore decisória da Figura 15. Globalmente e, estando em concordância com os resultados anteriores, verificou-se que espécies de pequena e média dimensão têm maior sucesso de germinação em *seed balls* com 25% de argila negra independentemente do regime hídrico, enquanto que espécies com sementes de grande dimensão têm um maior sucesso de germinação com 50–75% de argila negra e germinaram mais em regimes mais húmidos.

Figura 15. Árvore decisória tendo em conta o sucesso germinativo das espécies em *seed balls*. As percentagens dizem respeito à percentagem de *seed balls* correspondente a cada uma das categorias da árvore decisória.



4. Discussão

4.1. Avaliação da viabilidade dos lotes

A percentagem que se obteve para a viabilidade dos seis lotes de sementes utilizados foi sempre superior a 70%, verificando-se que as sementes se encontram em bom estado de conservação e em condições de serem usados no presente estudo. Esta avaliação mostra também que o tempo de armazenamento dos lotes não afectou, substancialmente, a viabilidade das sementes, tendo a espécie (*Cynara humilis*) com menor percentagem de viabilidade sujeita a menor tempo de armazenamento.

Ainda assim, as diferenças de viabilidade registadas entre lotes poderiam influenciar a germinação. Como tal, de forma anular o hipotético efeito deste factor nos resultados obtidos posteriormente, foi aplicado um factor de viabilidade aos resultados de germinação em *seed balls* e referências.

4.2. Avaliação global da germinação em *seed ball* e nas referências

Globalmente as espécies germinaram melhor e mais rapidamente nas referências tal como esperado, visto que já foi verificado em estudos anteriores a existência de limitações quando são usadas sementes peletizadas ao invés de sementes nuas (e.g. Franzin et al., 2004; Pires et al., 2004). É de referir que o tempo médio de germinação não pode ser interpretado individualmente, visto que o facto de uma espécie germinar rapidamente não reflete diretamente a sua taxa de germinação. Por exemplo, *M. suaveolens* demorou aproximadamente o mesmo tempo a germinar nas referências e nas *seed balls*, mas a germinação obtida nas *seed balls* foi muito inferior, enfatizando, nesta situação, a importância da taxa de germinação face ao tempo médio de germinação. Como tal, o tempo médio de germinação foi apenas analisado de uma forma global e não em detalhe.

Segundo Nascimento et al. (2009), estas limitações na rapidez de germinação acontecem porque as características físicas do *pellet* provocam geralmente um atraso na germinação das espécies. Além disso, a textura do substrato de germinação desempenha um papel fundamental na germinação das sementes (Benvenuti, 2003) e as características físicas da argila acabam por funcionar como uma barreira mais difícil de vencer do que o substrato usado nas referências, que não apresenta uma estrutura definida.

A argila é um material que pode dificultar a germinação das sementes, comparativamente ao que sucede nas referências constituídas por um substrato de textura mais arenosa, pelo que, de uma forma geral, solos argilosos, os quais se podem

comparar às *seed balls*, tendem a compactar, dificultando a germinação, por oferecerem maior resistência mecânica à mesma. No entanto, a argila oferece algumas vantagens por comparação com substratos de textura arenosa, na medida em que possui melhor capacidade de retenção de água devido à maior área superficial das partículas e maior capacidade de troca catiónica (Scalon et al., 2003; Bocchese et al., 2008). Portanto, o uso de argila no fabrico de *seed balls* tem potencial para ser um bom substrato para a germinação das sementes.

Assim sendo, o uso de um substrato rico em argila, apesar de poder constituir um obstáculo físico à germinação das sementes, pode, simultaneamente, apresentar vantagens na germinação dada a sua maior capacidade de reter água. Esta capacidade de retenção de água associada a um elevado teor de matéria orgânica (como é o caso da argila negra usada neste estudo), confere a este substrato um elevado potencial de utilização para este fim.

4.3. Avaliação da germinação considerando as variáveis em estudo

As variáveis em estudo – regime hídrico, volume da semente e percentagem de argila negra – têm diferentes influências na percentagem de germinação (Figura 14). Verificou-se que, individualmente, a percentagem de argila negra não influencia significativamente a percentagem de germinação, no entanto a influência desta variável é significativa quando combinada com as demais. Isto significa que ao intervencionar-se uma determinada zona no sentido de se proceder ao seu restauro ecológico utilizando *seed balls*, tem que se ter obrigatoriamente em conta as características climáticas da zona e as características das espécies (particularmente das suas sementes) que se pretende promover. Como tal, só depois de conhecidos pelo menos um destes factores se consegue avaliar criteriosamente a melhor percentagem de argila a utilizar no fabrico de *seed balls*.

4.3.1. Regime hídrico e volume das sementes

O regime hídrico, por si só, influencia a percentagem de germinação das sementes nas *seed balls* e, de forma global, houve uma maior germinação em regimes com maior quantidade de água. Isso deve-se, muito provavelmente, ao facto da *seed ball* constituir uma barreira física entre a água e a semente, sendo necessária uma maior quantidade de água (ou maior regularidade de precipitação) para que a água seja absorvida pela *seed ball* e fique disponível para a semente.

Foi possível analisar conjuntamente o comportamento das espécies com sementes pequenas, visto que tanto *A. castellana* como *M. suaveolens* apresentaram um comportamento muito semelhante face ao regime hídrico e percentagem de argila

negra, bem como devido à semelhança máxima entre a percentagem de germinação média nas *seed balls* e nas referências ocorrer para as mesmas condições (regime húmido, 25% de argila negra).

Agrostis castellana e *M. suaveolens* germinaram apenas em regime húmido, o que, provavelmente, está relacionado com a capacidade de absorção de água pelas sementes, visto se tratarem de espécies com sementes de reduzida dimensão. Como tal, poderá ser necessária uma maior quantidade de água até que esta fique acessível à semente e seja absorvida, desencadeando a germinação. Isto porque um factor limitante para sementes mais pequenas é a profundidade a que estas se encontram no solo, neste caso na *seed ball*. Uma vez que a dimensão das *seed balls* foi semelhante para todas as sementes utilizadas e o número de sementes em cada *seed ball* também foi o mesmo, a distância entre a localização das sementes e o exterior, isto é, a profundidade a que se encontram, é, tendencialmente, maior para sementes mais pequenas que para sementes maiores, o que influencia a germinação, por alterar os factores ambientais que determinam a germinação (luz, oxigénio, temperatura e humidade) ou pela dificuldade de acesso do hipocótilo à superfície (Traba et al., 2004). Grundy et al. (2003) afirma também que sementes pequenas têm menos probabilidade de emergência se germinarem de camadas mais profundas.

Assim sendo, sementes pequenas parecem necessitar de uma maior quantidade de água para que esta consiga embeber a *seed ball* ao ponto de permitir a germinação das mesmas. Tendo em conta o contexto climático no qual nos encontramos, onde a tendência é para uma diminuição da precipitação anual resultando em anos mais secos (de Lima et al., 2013), é importante integrar esta informação no fabrico de *seed balls* para sementes pequenas.

Nesse sentido, uma possível solução para o caso de sementes pequenas seria adaptar o tamanho das *seed balls* para um tamanho menor de forma a diminuir a profundidade a que estas se encontram. Caso contrário, será necessário que a *seed ball* seja desfeita, por exemplo pela acção da água (precipitação), para que as sementes fiquem mais à superfície e lhes seja possível germinarem. Outra possibilidade de resolução deste problema seria manter o tamanho da *seed ball*, mas aumentar o número de sementes. Desse modo, sempre haveria algumas sementes que, por ficarem mais à superfície, germinariam primeiro, provocando fracturas nas *seed balls* que permitiriam que a água infiltrasse a maior profundidade chegando às sementes situadas na zona central da *seed ball*.

Brachypodium distachyon germinou significativamente menos no regime húmido e *M. salmantica*, embora sem diferenças significativas, não germinou neste regime. A dimensão das suas sementes permite provavelmente uma mais fácil absorção de água, não sendo necessário quantidades tão elevadas como no caso de sementes mais pequenas.

As sementes de dimensão média foram também analisadas em conjunto, visto que as duas espécies, *B. distachyon* e *M. salmantica*, apresentaram um padrão de comportamento semelhante ao longo do estudo. A semelhança entre a percentagem de germinação média nas *seed balls* e nas referências apresentou maior variabilidade entre cada uma destas espécies (Tabela 6) do que a verificada para as sementes pequenas. Essa variabilidade deve-se, essencialmente, ao facto de *M. salmantica* ter germinado muito pouco, no entanto o máximo de semelhança foi coincidente entre as duas espécies (regime intermédio – 25%, regime húmido – 25%).

Além disso, a amplitude de volume para cada classe de volume de sementes contribui também para explicar a maior variabilidade de resposta observada no grupo das sementes médias visto que a amplitude de volume das sementes médias ([1,52 – 11,87] mm³) é maior que a amplitude de volume das sementes pequenas ($\leq 0,02$ mm³).

Outro factor a ter em consideração é a morfologia da semente. Segundo Grundy et al. (2003) o peso da semente fornece uma indicação dos recursos da semente, enquanto que a forma da semente está relacionada com a área de superfície em contacto com o ambiente externo, sendo que cada um destes factores provavelmente influenciará a resposta da semente à profundidade de uma maneira diferente. Liu et al. (2007) concluiu no seu estudo que sementes alongadas ou achatadas tiveram maiores percentagens de germinação que sementes com outras formas. Como tal, no caso de *B. distachyon*, a morfologia das suas sementes pode ter contribuído para que esta espécie tenha apresentado maiores percentagens de germinação relativamente a *M. salmantica*.

No caso de *B. bituminosa* e *C. humilis*, também foi possível fazer a análise conjunta da germinação dado o padrão de semelhanças entre a percentagem de germinação média nas *seed balls* e nas referências ter coincidências no regime intermédio e no regime seco. No regime húmido, as semelhanças não foram coincidentes entre as duas espécies, no entanto, *B. bituminosa* não germinou neste regime, não sendo possível a avaliação de semelhanças neste regime. Além disso, assim como nas sementes médias, a amplitude de volume das sementes grandes ([20,59 – 85,09] mm³) é grande, o que poderá justificar uma maior diversidade de resultados.

Embora as diferenças não sejam significativas, *B. bituminosa* não germinou em regime húmido, contrariamente a *C. humilis*, que germinou claramente melhor com maior quantidade de água. Nas referências não se verificaram diferenças de germinação entre os vários regimes hídricos. Dada a dimensão da semente, o acesso à água dentro da *seed ball* também não seria um factor muito limitante, pelo que a germinação de *C. humilis* nas *seed balls* tem de ser, necessariamente, justificada por outros factores, nomeadamente uma combinação entre o regime hídrico e percentagem de argila.

De uma forma global, os regimes hídricos mais húmidos apresentaram, como seria expectável, maiores percentagens de germinação. No entanto, de acordo com este

estudo, as *seed balls* podem e devem ser consideradas também para regimes mais secos, por vários motivos. Desde logo, apesar de o número de espécies considerado para este estudo ter sido pequeno, ficou demonstrado que algumas dessas espécies são capazes de germinar em *seed balls* mesmo com menor disponibilidade hídrica; por outro lado, uma das mais-valias das *seed balls* é fornecerem protecção às sementes, principalmente contra predação, até que surjam as condições ideais para a sua germinação (Gornish et al., 2019). Uma vez que as sementes têm, por norma, uma viabilidade considerável no tempo (Christoffoleti & Caetano 1998), a protecção das sementes é efectivamente uma das grandes vantagens desta técnica, nomeadamente em climas com regime hídrico deficitário e/ou irregular como o mediterrânico.

4.3.2. Percentagem de argila e volume das sementes

Em relação à percentagem de argila negra, os resultados obtidos neste estudo parecem ter como influência a maior ou menor plasticidade que a *seed ball* adquire consoante a menor ou maior percentagem desta argila, respectivamente, e a influência que esse factor tem na germinação da semente consoante a sua dimensão, assim como a pujança das suas primeiras folhas.

Das espécies em estudo, apenas *C. humilis* mostrou uma preferência por *seed balls* com menor grau de plasticidade (75% e 100% de argila negra). Sementes pequenas e médias germinam melhor em *seed balls* mais plásticas (25% e 50% de argila negra), provavelmente porque essa plasticidade torna a *seed ball* mais maleável, permitindo que as plântulas perfurem a *seed ball* abrindo uma fissura em vez de a quebrar totalmente (Figura 16), o que exigiria uma maior robustez física das primeiras folhas da plântula.



Figura 16. *Seed ball* completamente quebrada pela germinação das sementes de *Cynara humilis* (à esquerda) e *seed ball* fissurada pela germinação de semente de *Brachypodium distachyon* (à direita).

As sementes de menores dimensões germinaram melhor em regime húmido e com percentagens de argila negra baixas (25% de argila negra). A combinação destas duas “exigências” por parte das sementes de menor dimensão pode estar relacionada com o facto de a plasticidade da *seed ball* ser maior quando esta está mais húmida, sendo necessária uma baixa quantidade de argila negra e uma elevada quantidade de água para que fique suficientemente plástica para possibilitar a germinação destas sementes. Além disso, sementes mais pequenas concentram as suas reservas de energia em substâncias lipídicas e necessitam de uma maior disponibilidade de oxigénio durante a fase heterotrófica de pré-emergência (Benvenuti et al., 2001), o que poderá ter contribuído para a baixa germinação em *seed balls* com elevada percentagem de argila negra (75% e 100%), visto que as *seed balls* de argila são pouco permeáveis ao oxigénio.

No caso de sementes de maiores dimensões, a robustez das primeiras folhas parece ter um papel mais importante do que a dimensão da semente. Apesar de a dimensão das sementes de *C. humilis* e *B. bituminosa* estar no mesmo intervalo, as espécies não se comportaram da mesma forma. *Bituminaria bituminosa* mostrou preferência por *seed balls* mais maleáveis (25% argila negra) enquanto que *C. humilis* preferiu *seed balls* menos maleáveis (75% argila negra). A diferença existente entre estas duas espécies reside na robustez do hipocótilo e das primeiras folhas. Enquanto que *B. bituminosa* desenvolve plântulas mais débeis e sem força para quebrar a *seed ball*, *C. humilis* desenvolve plântulas muito mais robustas que possuem maior capacidade para quebrar as *seed balls*.

O uso desta argila é importante, não só para a nutrição das plantas que se pretendem semear, mas também por contribuir para uma economia circular, já que actualmente esta argila é um desperdício da extração de argilas para a indústria das cerâmicas.

A economia circular é um conceito promovido actualmente pela União Europeia (Korhonen et al., 2018) e surgiu porque o modelo linear do sistema económico moderno tornou-se insustentável (Frosch & Gallopoulos, 1989) e causando sérios danos ambientais. Contrariamente à reciclagem tradicional, a economia circular enfatiza a reutilização de produtos, componentes e materiais, remanufactura, renovação, reparação e actualização, assim como a utilização de energia solar, eólica e biomassa (Mihelcic et al., 2003; Rashid et al., 2013). Neste sentido, a utilização desta argila negra pode passar a ser um recurso para integrar na economia circular, no sentido que a sua utilização para a elaboração de *seed balls* numa óptica de restauro de habitats transforma algo que é considerado desperdício numa matéria prima.

4.4. Árvore decisória

A árvore decisória apresentada constitui uma ferramenta para a tomada de decisão relativamente à utilização das *seed balls*. Tendo em conta que esta análise foi feita com base no sucesso germinativo das sementes (o que inclui a percentagem de germinação e a semelhança de germinação entre *seed balls* e referências), é a análise mais completa; além disso, é também uma ferramenta muito prática e útil no sentido em que fornece informação directa sobre a percentagem de argila negra mais adequada, consoante o regime hídrico e/ou a dimensão da semente que se quer semear. Pode assim servir eventualmente como um guia de funcionamento prático fornecido às empresas que pretendam semear usando *seed balls*, para restauro ecológico de habitats ou para outros fins.

Na árvore decisória pode observar-se que a percentagem de argila mais adequada por classe de dimensão de semente é a mesma nos vários regimes hídricos analisados. Isto ocorre, pois a árvore decisória tem em conta os resultados mais favoráveis de cada variável. Assim, uma classe de dimensão de semente pode ter diferentes sucessos germinativos entre regimes hídricos, mas, se o sucesso germinativo for mais elevado na mesma percentagem de argila nos diferentes regimes hídricos, a árvore decisória seleciona essa mesma percentagem de argila como a mais adequada.

Este estudo consiste essencialmente numa experiência piloto sobre o potencial da utilização das *seed balls* em contexto mediterrânico. Como tal, o número de espécies utilizadas foi reduzido e, conseqüentemente, a árvore decisória constitui um protótipo de uma ferramenta de conservação. No entanto, a metodologia poderá ser replicada para uma maior diversidade de espécies, assim como diferentes condições experimentais, de forma a se obterem conclusões mais robustas e, uma árvore decisória mais assertiva. Assim, o alargamento desta tipologia de estudo e, principalmente, a árvore decisória resultante, constituirão uma ferramenta útil a ser fornecida às empresas que pretendam proceder ao restauro ecológico de habitats através desta técnica.

5. Considerações finais

Apesar de os regimes mais húmidos terem apresentado, no geral, percentagens de germinação mais elevadas, considera-se que esta técnica de sementeira tem potencial para funcionar em contexto mediterrânico. Isso mesmo ficou demonstrado para algumas espécies, aparentemente para espécies com sementes de maior dimensão, que conseguem germinar nas *seed balls* em regimes com pouca disponibilidade hídrica. Além disso, as *seed balls* fornecem protecção às sementes, principalmente contra predação, até que surjam as condições ideais para a germinação, possibilitando uma amplitude temporal maior para que a técnica de restauro funcione.

Um dos objetivos do estudo foi avaliar o potencial de utilização de argila negra (um desperdício da indústria da cerâmica) no fabrico de *seed balls*. Verificou-se que, para sementes de pequena e média dimensão a percentagem de argila negra a utilizar deve ser preferencialmente baixa (25%), enquanto que para espécies com sementes maiores a percentagem de argila negra deve ser média a elevada (50-75%). Como tal, esta argila negra tem potencial para ser utilizada na elaboração das *seed balls*, ainda que seja necessário ter-se em conta a dimensão da semente e as condições climáticas do local a intervir. Recomendamos investigação futura no sentido de se poder maximizar a incorporação da argila negra, tendo em conta o elevado teor de matéria orgânica que possui, e também no sentido de perceber se e que compostos existem que possam ser adicionados para beneficiar a germinação das sementes em *seed balls*, ou conferir outra vantagem ao estabelecimento da planta.

Além disso, apesar de não se ter avaliado o posterior estabelecimento da planta, a elevada percentagem de matéria orgânica existente nesta argila pode constituir uma mais valia para o desenvolvimento inicial da planta. Isto é particularmente relevante tendo em conta que mais de metade dos solos portugueses apresentam valores extremamente baixos de matéria orgânica, representando uma baixa fertilidade dos mesmos (Carvalho, 2012). Assim, a utilização deste desperdício industrial tem potencial para ser explorado junto do sector de restauro de habitats e poderá, após uma investigação mais alargada, constituir uma oportunidade de desenvolvimento de negócio no âmbito da economia circular.

As *seed balls* podem e, provavelmente, terão de ser adaptadas tendo em conta as características das espécies que se pretendem semear. Essa adaptação poderá ser feita diminuindo o tamanho da *seed ball*, no caso de sementes de pequenas dimensões, ou através da adição de elementos que potenciem ou acelerem o processo de germinação das sementes, visto que as *seed balls* apresentam uma barreira, principalmente física, que outros tipos de sementeira não apresentam. No entanto, tendo em conta a

protecção que as *seed balls* fornecem à semente, os baixos custos envolvidos na sua elaboração, a capacidade de serem utilizadas em locais de difícil acesso e a matéria orgânica que estas fornecem para o posterior estabelecimento da planta, além do potencial sugerido neste estudo, considera-se que esta técnica deve ser cientificamente explorada e desenvolvida a fim de ser aplicada eficazmente em contexto mediterrânico.

Salienta-se que a investigação futura deverá ser feita ampliando a experiência a uma maior diversidade de espécies, incluindo herbáceas e arbóreas. No entanto, considera-se também relevante testar as *seed balls* em contexto real, ou seja, sem o controle dos factores ambientais. É também necessário estudar as últimas fases do crescimento da planta, correspondente ao desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da planta, pois por mais que as sementes germinem, se a planta não se conseguir estabelecer e a polinização não ocorrer, o habitat não será restaurado com sucesso.

Em suma, apesar da necessidade de uma investigação mais aprofundada, existe potencial para a utilização desta técnica de sementeira em contexto mediterrânico, assim como existe potencial na reutilização da argila negra enquanto desperdício industrial para a elaboração das *seed balls*. No entanto, a maior ou menor eficácia das *seed balls* não parece ser linear, dependendo da espécie que se pretende semear e das condições climáticas do local que se pretende intervencionar, o que irá requerer uma adaptação das *seed balls* consoante esses factores.

6. Referências bibliográficas

- Aguado Martín, L. O., Viñuela Sandoval, E., & Fereres Castiel, A. (2015). *Guía de campo de los polinizadores de España*. Ediciones Paraninfo, SA.
- Allouche, O., Kalyuzhny, M., Moreno-Rueda, G., Pizarro, M., & Kadmon, R. (2012). Area–heterogeneity trade-off and the diversity of ecological communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(43), 17495-17500.
- Bean, T. M., Smith, S. E., & Karpiscak, M. M. (2004). Intensive revegetation in Arizona's Hot Desert. The advantages of container stock. *Native Plants Journal*, *5*(2), 173-180.
- Beggy, H. M., & Fehmi, J. S. (2016). Effect of surface roughness and mulch on semi-arid revegetation success, soil chemistry and soil movement. *Catena*, *143*, 215-220.
- Bennett, A. F., & Saunders, D. A. (2010). Habitat fragmentation and landscape change. *Conservation biology for all*, *93*, 1544-1550.
- Benvenuti, S., Macchia, M., & Miele, S. (2001). Quantitative analysis of emergence of seedlings from buried weed seeds with increasing soil depth. *Weed Science*, *49*(4), 528-535.
- Benvenuti, S. (2003). Soil texture involvement in germination and emergence of buried weed seeds. *Agronomy Journal*, *95*(1), 191-198.
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. (2013). *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3rd Edition. New York, NY: Springer New York.
- Bocchese, R. A., de Oliveira, A. K. M., Melotto, A. M., Fernandes, V., & Laura, V. A. (2008). Efeito de diferentes tipos de solos na germinação de sementes de *Tabebuia heptaphylla*, em casa telada. *Cerne*, *14*(1), 62-67.
- Breiman, L. (1984). *Classification and Regression Trees*. New York: Routledge, <https://doi.org/10.1201/9781315139470>
- Cabral, F. F., de Lara Ribeiro, I., & Hrycyk, M. F. (2015). Percepção ambiental de alunos do 6º ano de escolas públicas. *Revista Monografias Ambientais*, *14*(2), 151-161.
- Carvalho, C. D., & Novembre, A. D. L. C. (2011). Avaliação da qualidade de sementes de fumo, nuas e revestidas, pelo teste de condutividade elétrica. *Revista Brasileira de Sementes*, *33*(1), 177-185.
- Carvalho, M. (2012). *O Uso Sustentado do Solo*. Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora.

- Casco, H., & Dias, L. S. (2008). Estimating seed mass and volume from linear dimensions of seeds. *Seed Science and Technology*, 36(1), 230-236.
- Castroviejo, S. (coord. gen.). (1986-2012). Flora Iberica. *Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol VII, XII, XVI CSIC, Madrid.
- Ceccon, E., González, E. J., & Martorell, C. (2016). Is direct seeding a biologically viable strategy for restoring forest ecosystems? Evidences from a Meta-analysis. *Land Degradation & Development*, 27(3), 511-520.
- Chawla, L. (1999). Life paths into effective environmental action. *The journal of environmental education*, 31(1), 15-26.
- Clewell, A., Aronson, J., & Winterhalder, K. (2004). The SER international primer on ecological restoration. *Ecological Management & Restoration*, 14(3), 182-186.
- Cooke, G. D. (2005). Ecosystem rehabilitation. *Lake and Reservoir Management*, 21(2), 218-221.
- Christoffoleti, P. J., & Caetano, R. S. X. (1998). Soil seed banks. *Scientia agricola*, 55(SPE), 74-78.
- DeFries, R. S., Foley, J. A., & Asner, G. P. (2004). Land-use choices: Balancing human needs and ecosystem function. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(5), 249-257.
- de Lima, M. I. P., Santo, F. E., Cunha, S., & Silva, Á. (2013). Tendências nos extremos de precipitação em Portugal Continental em 1941-2012. *Riscos Naturais Antrópicos e Mistos-Homenagem ao Professor Doutor Fernando Rebelo, Departamento de Geografia, Faculdade de Letras, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal*, 325-337.
- Efftig, T. R. (2007). Educação Ambiental nas Escolas Públicas: realidade e desafios. *Monografia (Pós-Graduação em "Latu Sensu" Planejamento Para o Desenvolvimento Sustentável) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste*.
- ENSCONET. European Native Seed Conservation Network. Acedido em 12/07/2020. Disponível em: <http://enscobase.maich.gr/>
- Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., ... & Helkowski, J. H. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309(5734), 570-574.
- Franco J. A., M. L. Rocha Afonso. (1994–2003). Nova Flora de Portugal. Vol. III (II). Escolar Editora. Lisboa, Portugal.

- Franzin, S. M., Menezes, N. L. D., Garcia, D. C., & Roversi, T. (2004). Avaliação do vigor de sementes de alface nuas e peletizadas. *Revista Brasileira de sementes*, 26(2), 114-118.
- Fukuoka, M. (1985). *The natural way of farming*. Tokyo: Japan Publications.
- Fukuoka, M. (2010). *The one-straw revolution: an introduction to natural farming*. New York Review of Books.
- Ganhão, E., Dias, L. S. (2017). Seed Volume Database. Departamento de Biologia, Universidade de Évora. Évora.
- Gornish, E., Arnold, H., & Fehmi, J. (2019). Review of seed pelletizing strategies for arid land restoration. *Restoration Ecology*, 27(6), 1206-1211.
- Gosling PG. (2003). Viability Testing. In: Smith RD, Dickie JB, Linington SH, Pritchard HW, Probert RJ (editors). *Seed Conservation: turning science into practice*. Kew, Great Britain: The Royal Botanic Gardens; p. 445–481.
- Grundy, A. C., Mead, A., & Burston, S. (2003). Modelling the emergence response of weed seeds to burial depth: interactions with seed density, weight and shape. *Journal of Applied Ecology*, 40(4), 757-770.
- Haddad, N. M., Brudvig, L. A., Clobert, J., Davies, K. F., Gonzalez, A., Holt, R. D., ... & Cook, W. M. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science advances*, 1(2), e1500052.
- Halmer, P. (2008). Seed Technology and Seed Enhancement. *Acta Horticulturae* 771, 17–26.
- Hoose, B. W., Call, R. S., Bates, T. H., Anderson, R. M., Roundy, B. A., & Madsen, M. D. (2019). Seed conglomeration: a disruptive innovation to address restoration challenges associated with small-seeded species. *Restoration Ecology*, 27(5), 959-965.
- Houghton, R. A. (2008). Carbon flux to the atmosphere from land-use changes: 1850–2005. *TRENDS: A compendium of data on global change*, 1850-2005.
- ICT. (2020). *Atmospheric Sciences Water and Climate*. Acedido a: 16/07/2020. Disponível em: <http://www.clima.cge.uevora.pt/evora/>.
- ISTA. (2015). *Rules Proposals for the International Rules for Seed Testing 2015 Edition*. ISTA. Bassersdorf, Switzerland.
- Jones, L. C., Schwinning, S., & Esque, T. C. (2014). Seedling ecology and restoration of blackbrush (*Coleogyne ramosissima*) in the Mojave Desert, United States. *Restoration ecology*, 22(5), 692-700.

- Jordan, G. L. (1967). *An evaluation of pelleted seeds for seeding Arizona rangelands*. College of Agriculture, University of Arizona (Tucson, AZ).
- Korhonen, J., Honkasalo, A., & Seppälä, J. (2018). Circular economy: the concept and its limitations. *Ecological economics*, 143, 37-46.
- LIFE LINES (2018). Acedido a: 08/04/2020. Disponível em: <https://lifelines.uevora.pt/>.
- Liu, Y., Horisawa, S., & Mukohata, Y. (2010). Effect of seed coating on plant growth and soil conditions: A preliminary study for restoration of degraded rangeland in the Qinghai–Tibetan Plateau, China. *Grassland science*, 56(3), 145-152.
- Liu, Z., Yan, Q., Li, X., Ma, J., & Ling, X. (2007). Seed mass and shape, germination and plant abundance in a desertified grassland in northeastern Inner Mongolia, China. *Journal of Arid Environments*, 69(2), 198-211.
- Mach, T. (2009). Masanobu Fukuoka's Enduring Influence on New Agrarian Movements Abroad. *Language and Culture: The Journal of the Institute for Language and Culture*, 13, 17-35.
- Madsen, M. D., Davies, K. W., Williams, C. J., & Svejcar, T. J. (2012). Agglomerating seeds to enhance native seedling emergence and growth. *Journal of Applied Ecology*, 49(2), 431-438.
- Madsen, M. D., Kostka, S. J., Hulet, A., Mackey, B. E., Harrison, M. A., & McMillan, M. F. (2013). Surfactant seed coating—a strategy to improve turfgrass establishment on water repellent soils. *Proc. ISAA*, 205.
- Maravalhas, E. (Ed.). (2003). *As borboletas de Portugal*. Distribuidor internacional, Apollo Books.
- Merritt, D. J., & Dixon, K. W. (2011). Restoration seed banks - a matter of scale. *Science*, 332(6028), 424-425.
- Mihelcic, J. R., Crittenden, J. C., Small, M. J., Shonnard, D. R., Hokanson, D. R., Zhang, Q., ... & Schnoor, J. L. (2003). Sustainability science and engineering: the emergence of a new metadiscipline. *Environmental science & technology*, 37(23), 5314-5324.
- Miller, B. P., Sinclair, E. A., Menz, M. H., Elliott, C. P., Bunn, E., Commander, L. E., ... & Golos, P. J. (2017). A framework for the practical science necessary to restore sustainable, resilient, and biodiverse ecosystems. *Restoration Ecology*, 25(4), 605-617.
- Nascimento, W. M., Silva, J. B. C., Santos, P. E., & Carmona, R. (2009). Germinação de sementes de cenoura osmoticamente condicionadas e peletizadas com diversos ingredientes. *Horticultura Brasileira*, 27(1), 12-16.
- Norman, M. (2003). Biodiversity hotspots revisited. *BioScience*, 53(10), 916-917.

- Nunes, A., Oliveira, G., Mexia, T., Valdecantos, A., Zucca, C., Costantini, E. A., ... & Correia, O. (2016). Ecological restoration across the Mediterranean Basin as viewed by practitioners. *Science of the Total Environment*, 566, 722-732.
- Obregón R., Prunier F. (2014). Diversidad y ecología de una comunidad de Papilionoidea (Lepidoptera) en el arroyo Pedroches y su entorno: un paraje natural periurbano a conservar (Córdoba, España). *Revista gatina de Entomología*, 5, 183-201.
- Palmer, M. A., Zedler, J. B., & Falk, D. A. (2016). Ecological theory and restoration ecology. In *Foundations of restoration ecology* (pp. 3-26). Island Press, Washington, DC.
- Paparella, S., Araújo, S. S., Rossi, G., Wijayasinghe, M., Carbonera, D., & Balestrazzi, A. (2015). Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant cell reports*, 34(8), 1281-1293.
- Parlamento Europeu. (2018). Relatório sobre a gestão transparente e responsável dos recursos naturais nos países em desenvolvimento: o caso das florestas. disponível em: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-8-2018-0249_PT.html.
- Pedrini, S., Merritt, D. J., Stevens, J., & Dixon, K. (2017). Seed coating: science or marketing spin?. *Trends in plant science*, 22(2), 106-116.
- Pedrini, S. (2018). *Seed Enhancement Research for Improving Ecological Restoration* (Doctoral dissertation, Curtin University).
- Pedrini, S., Balestrazzi, A., Madsen, M. D., Bhalsing, K., Hardegree, S. P., Dixon, K. W., & Kildisheva, O. A. (2020). Seed enhancement: getting seeds restoration-ready. *Restoration Ecology*.
- Pimm, S. L., & Raven, P. (2000). Extinction by numbers. *Nature*, 403(6772), 843-845.
- Pires, L. L., Bragantini, C., & Costa, J. L. D. S. (2004). Armazenamento de sementes de feijão revestidas com polímeros e tratadas com fungicidas. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 39(7), 709-715.
- Rashid, A., Asif, F. M., Krajnik, P., & Nicolescu, C. M. (2013). Resource conservative manufacturing: An essential change in business and technology paradigm for sustainable manufacturing. *Journal of Cleaner production*, 57, 166-177.
- Royal Botanic Gardens Kew. Seed Information Database (SID). Version 71. Acedido a 15/07/2020. Disponível em: <https://www.kew.org/>.
- Scalon, S. P. Q., Mussury, R. M., Almeida, K. A., & Rigoni, M. R. (2003). Efeito do álcool e substrato na germinação de sementes de sibipiruna (*Caesalpinia pelthophoroides* Benth.) colhidas no chão e retiradas da vagem. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(2), 389-392.

- Seed balls* | Earthshed Solutions. Acedido a 10/06/2020. Disponível em: <https://earthshed.org/projects/seed-balls/>.
- Spironello, R. L., Tavares, F. S., & da Silva, E. P. (2012). Educação Ambiental: Da teoria à prática, em busca da sensibilização e conscientização ambiental. *Revista Geonorte*, 3(6), 140-152.
- Stefanescu C. (1997). Migration patterns and feeding resources of the Painted Lady butterfly, *Cynthia cardui* (L.) (Lepidoptera, Nymphalidae) in the northeast of the Iberian Peninsula. *Miscellanea Zoologica*. 20 (31-48).
- Stefanescu C., Traveset A. (2009). Factors influencing the degree of generalization in flower use by Mediterranean butterflies. *Oikos*. 118 (1109-1117).
- Taylor, A. G., Allen, P. S., Bennett, M. A., Bradford, K. J., Burris, J. S., & Misra, M. K. (1998). Seed enhancements. *Seed science research*, 8(2), 245-256.
- Tischew, S., Youtie, B., Kirmer, A., & Shaw, N. (2011). Farming for restoration: building bridges for native seeds. *Ecological Restoration*, 29(3), 219-222.
- Traba, J., Azcárate, F. M., & Peco, B. (2004). From what depth do seeds emerge? A soil seed bank experiment with Mediterranean grassland species. *Seed Science Research*, 14(3), 297.
- UNEP-WCMC, I. U. C. N. NGS (2018) Protected Planet Report 2018. *Cambridge, Gland, and Washington, DC: UNEP-World Conservation Centre, IUCN and National Geographic Society*.
- Vallejo, R., Aronson, J., Pausas, J. G., & Cortina, J. (2006). Restoration of Mediterranean woodlands. *Restoration ecology: The new frontier*, 193-207.
- Vallejo, V. R., Allen, E. B., Aronson, J., Pausas, J. G., Cortina, J., & Gutiérrez, J. R. (2012). Restoration of Mediterranean-type woodlands and shrublands. *Restoration ecology: the new frontier, 2nd edn. Wiley, Chichester*, 130-144.
- Wackernagel, M., Schulz, N. B., Deumling, D., Linares, A. C., Jenkins, M., Kapos, V., ... & Randers, J. (2002). Tracking the ecological overshoot of the human economy. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 99(14), 9266-9271.
- White, R. P., & Nackoney, J. (2003). Drylands, people, and ecosystem goods and services: a web-based geospatial analysis (PDF version). *World Resources Institute*. Disponível em: <http://pdf.wri.org/drylands>. Acedido em: 30/01/2012.
- Yang J, Lovett-Doust J, Lovett-Doust L. (1999). Seed germination patterns in green dragon (*Arisaema dracontium*, Araceae). *Am J Bot*. 86(8):1160–1167.

7. Anexo I - Protocolo para elaboração de *seed balls* em contexto escolar

O QUE SÃO SEED BALLS E PORQUÊ UTILIZAR?

O que são *seed balls*?

Também chamadas de bola de sementes. São bolas constituídas por argila, água e sementes.



Técnica desenvolvida por Masanobu Fukuoka, um agricultor e filósofo japonês.



Porquê utilizar *seed balls*?

1. Protegem as sementes de animais (como formigas, ratinhos e pássaros), vento e chuvas fortes;



2. Conseguem-se semear em zonas difíceis; em locais com pouco solo disponível ou em mau estado;

3. É barato;

4. Permite sensibilizar a população;

5. Permite criar manchas de vegetação para atrair insectos polinizadores como as borboletas.



6. É DIVERTIDO DE FAZER!!!

COMO VAMOS FAZER?

Material:

- 60 sementes de *Brachypodium distachyon* e 60 sementes de *Cynara humilis*
- 1 kg de argila e 0,5 kg de composto orgânico
- Água
- Três tabuleiros



Procedimento:

1. Misturar a argila e o composto orgânico numa proporção de 75/50 até ficar homogéneo;
2. Acrescentar água até a argila ser moldável como plasticina;
3. Fazer bolinhas de aproximadamente 2 cm de diâmetro (mais ou menos a medida de um berlinde dos maiores);
4. Colocar 4 sementes (de qualquer uma das espécies) dentro das bolinhas (a maneira mais fácil é espalmar a bolinha como se fosse uma bolacha, colocar 4 sementes no meio e moldar outra vez até refazer a bolinha);
5. Repetir este procedimento até se esgotarem as sementes;
6. No total, teremos 30 bolas de sementes feitas com 4 sementes cada;
7. Colocar as bolas de sementes em ou espalhá-las no exterior;
8. Regar as bolas de sementes 3 vezes por semana (mantê-las com alguma humidade)

O QUE ESPERAMOS TER?



Braquípodio-de-duas-espigas (*Brachypodium distachyon*)



Alcachofra-brava (*Cynara humilis*)

CUIDADO QUE ESTA PICA!

1. Que observes várias sementes germinadas nas *seed balls* de *Brachypodium distachyon* e *Cynara humilis*!!!
2. Que vás observando a germinação das sementes nas *seed balls* e o crescimento das plantas
3. Que registes, da forma como preferires (escrito e/ou por fotografia) o que vais observando, como um verdadeiro cientista!

Não desanimes se só vires as folhas e não vires flores! Será uma boa experiência de qualquer forma!



1/2

Notas

- Este protocolo foi elaborado no seguimento de um estudo realizado no âmbito de uma dissertação de mestrado, sendo que as espécies escolhidas vão de acordo com o que melhor funcionou. No entanto, como o objectivo principal desta actividade é a sensibilização para questões ambientais/ecológicas e a interacção com uma técnica de restauro ecológico (*seed balls*), o protocolo poderá ser adaptado aos recursos disponíveis, sendo possível alterar as espécies a utilizar.
- As *seed balls* podem ser usadas no interior (ex: tabuleiro em sala de aula) ou no exterior (ex: jardim/parque da escola). As espécies sugeridas são importantes no ciclo de vida de borboletas e, por isso, podem favorecer o aparecimento destas caso as *seed balls* sejam colocadas no exterior.
- Do lado direito encontra-se um exemplo de uma ficha de registo que pode ser usada para apontar os dados referentes à germinação e ao desenvolvimento das plantas nas *seed balls*, no entanto, pode ser adaptada consoante o grau de escolaridade. O ideal é que cada um faça o registo de pelo menos uma *seed ball* nos dias de rega.

Nome: _____ Turma _____ Nº ____ Ano _____

Data: __/__/____

1. Sementes germinadas? Sim ___ Não ___

2. Quantas sementes germinadas? _____

3. Espécies germinadas:

4. O que observas na *seed ball*?

Esquema ilustrativo ou foto da
seed ball

2/2