

Departamento de Ciências da Vida

Universidade de Coimbra

Micropropagação de clones híbridos de *Castanea sativa* x *C. crenata* e *C. sativa* x *C. mollissima* para estudos de resistência a *Phytophthora cinamomi*

Helen Schimith Beltrame

Orientador

Filomena Gomes



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Coimbra, 01 de Agosto de 2013

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
AGRADECIMENTOS	VII
1 RESUMO	1
2 INTRODUÇÃO	3
2.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA	3
2.2 DISTRIBUIÇÃO E INTERESSE ECONÓMICO	4
2.3 ESPÉCIES DE INTERESSE ECONÓMICO	6
2.4 RESTRIÇÕES A CULTURA DO CASTANHEIRO	7
2.5 IMPORTÂNCIA DOS HÍBRIDOS NO MELHORAMENTO DA FLORA	9
2.6 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA – MICROPROPAGAÇÃO	10
2.7 OBJETIVO	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 MATERIAL VEGETAL	15
3.2 ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS <i>IN VITRO</i>	15
3.3 MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO DAS CULTURAS	16
3.4 ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO	16
3.5 RECOLHA DE DADOS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 ESTABELECIMENTO	21
4.2 MULTIPLICAÇÃO	22
4.2.1 Taxa de sobrevivência	22
4.2.2 Evolução e Crescimento dos clones	24

4.2.3	<i>Capacidade de proliferação das culturas dos diferentes clones</i>	27
4.2.4	<i>Comprimento do maior rebento</i>	29
4.2.5	<i>Número de segmentos utilizados na multiplicação</i>	31
4.2.6	<i>Existência de Callus</i>	32
4.2.7	<i>Existência de Vitrificação</i>	34
4.2.8	<i>Existência de Cloroses</i>	36
4.2.9	<i>Visão Global da Multiplicação</i>	39
4.3	RESULTADOS DO ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO	41
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
6	BIBLIOGRAFIA	45
7	ANEXOS	49
7.1	ANEXO I - MEIO DE ANDERSON	49
7.2	ANEXO II - MEIO FS.....	50
7.3	ANEXO III - MEIO MS	51
7.4	ANEXO IV - MEIO MS/2.....	52
7.5	ANEXO V - MEIO GD	53
7.6	ANEXO VI – MEIO KNOP + CA1%	54
7.7	ANEXO VII – FATOR MEIO DE CULTURA	55
7.8	ANEXO VIII – FATOR CONCENTRAÇÃO DE BAP	60
7.9	ANEXO IX – FATOR CLONE.....	64

Lista de Figuras

Figura 1- <i>Representação de um sistema de micropropagação por gomo axilar, exemplificando dois sistemas alternativos de enraizamento, in vitro e ex vitro. No enraizamento ex vitro, a expressão e desenvolvimento radicular ocorre em condições autotróficas, podendo considerar-se as plantas em pré-aclimatização.</i>	13
Figura 2 - <i>Indução de raízes ex vitro</i>	17
Figura 3 - <i>Análise da influência das variáveis estudadas.</i>	40
Figura 4 - <i>Influência das variáveis estudadas.</i>	41
Figura 5 - <i>Resultado do enraizamento e aclimatização ex vitro (A) e do enraizamento e aclimatização in vitro (B)</i>	42

Lista de Tabelas

Tabela 1- Área ocupada pelo cultivo do castanheiro e caraterização da produção de fruto em Portugal.	5
Tabela 2- Valores observados da variável CNS* em função do fator Meio de cultura.	23
Tabela 3- Valores observados da variável CNS* em função da concentração de BAP.	23
Tabela 4 - Valores observados da variável CNS* em função do fator Clone.	24
Tabela 5 – Valores observados da variável NAPB* em função do fator Meio de cultura.	25
Tabela 6 – Valores observados da variável NAPB* em função da concentração de BAP.	25
Tabela 7 - Valores observados da variável NAPB* em função do fator Clone.	26
Tabela 8 – Valores observados da variável NR (número de rebento) em função do fator Meio de cultura.	27
Tabela 9- Valores observados da variável NR (número de rebentos) em função da concentração de BAP.	28
Tabela 10 - Valores observados da variável NR (número de rebentos) em função do fator Clone.	28
Tabela 11 – Valores observados da variável CM em função do fator Meio de cultura.	29
Tabela 12 – Valores observados da variável CM em função da concentração de BAP.	30
Tabela 13 - Valores observados da variável CM em função do fator Clone.	30
Tabela 14 – Valores observados da variável NS em função do fator Meio.	31
Tabela 15 – Valores observados da variável NS em função da concentração de BAP.	31
Tabela 16 - Valores observados da variável NS em função do fator Clone.	32
Tabela 17 – Valores observados da variável <i>callus</i> em função do fator Meio.	33
Tabela 18 – Valores observados da variável <i>callus</i> em função da concentração de BAP.	33
Tabela 19 - Valores observados da variável <i>callus</i> em função do fator Clone.	34
Tabela 20 – Valores observados da variável vitrificação em função do fator Meio.	35

Tabela 21 - Valores observados da variável vitrificação em função da concentração de BAP.	35
Tabela 22 - Valores observados da variável vitrificação em função do fator Clone.	36
Tabela 23 - Valores observados da variável clorose em função do fator Meio.	37
Tabela 24 - Valores observados da variável clorose em função da concentração de BAP.	37
Tabela 25 - Valores observados da variável clorose em função do fator Clone.	38
Tabela 26 - Análise fatorial dos componentes principais para as variáveis na multiplicação dos clones.	39
Tabela 27 - Valores observados das condições testadas.	42

Lista de Abreviaturas

AND – Meio de cultura de Anderson (Anderson, 1984)

BAP 0,45 µM – N-6-benzilaminopurina 0,45 µM

BAP 0,89 µM – N-6-benzilaminopurina 0,89 µM

BAP 2,22 µM – N-6-benzilaminopurina 2,22 µM

CA 1% – Carvão ativado 1%

CM – comprimento do maior rebento por explante inicial em milímetros

CNS – número de explante contaminado, necrosado ou sobrevivente

DIPPING – Imersão da base do rebento

FS – meio de cultura de Fossard (1978)

GD – meio de cultura de Greshoff and Doy (1972)

IBA – Ácido Indol-3-butirico

KNOP – Meio de cultura de Gautheret (1959)

MS – meio de cultura de Murashige and Skoog (1962)

MS/2 – meio de cultura MS com macronutriente reduzidos a metade (Murashige e Skoog, 1962)

NAPB – número de explante que apresentam comportamento de: nenhuma manifestação, alongamento, proliferação ou ambas as situações anterior.

NR – número de rebentos por explante inicial

NS – número de segmentos que podem ser utilizados na multiplicação

UTAD – Universidade Trás os Montes e Alto Douro

Agradecimentos

Um agradecimento geral a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e deste relatório.

O meu agradecimento super especial é dirigido à minha orientadora e Professora Filomena Gomes e também ao Professor José Maia.

À Professora Filomena, agradeço o acolhimento, assim como a transmissão de conhecimentos, o incentivo, e a enorme paciência e carinho com que me tratou ao longo de todo o tempo que tivemos contato. Agradeço-lhe imensamente por esta oportunidade de trabalho que me permitiu alargar horizontes, e que assim me ajudou a decidir o rumo a seguir na minha futura carreira na área de biotecnologia.

Ao professor Maia, agradeço os conselhos e incentivos que me permitiram fazer um trabalho bem feito e concluir a minha licenciatura dentro dos prazos previstos. Agradeço a disponibilidade e a ajuda que me prestou.

Quero agradecer à Prof. Doutora Rita Costa pelas dicas e pelo reconhecimento do meu trabalho. Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto financiado pela FCT.

Aos meus colegas, que partilharam o laboratório comigo, que ajudaram a cuidar dos meus castanheiros quando necessário.

Um agradecimento cheio de carinho às minhas queridas amigas Sandra Correia e Raquel Saavedra, pela paciência que sempre tiveram comigo e por me terem ajudado a concluir este relatório, lendo e relendo inúmeras vezes sem nunca concordarem comigo.

Agradeço aos meus pais pela oportunidade que me deram de investir continuamente na minha formação e na área que escolhi. Sem vocês eu nunca seria o que sou, obrigada por tudo!

1 RESUMO

A *Castanea sativa* é uma espécie economicamente relevante para os países europeus, pela produção de madeira e fruto. No entanto a sua produção tem vindo a reduzir devido a suscetibilidade a determinados fungos. Medidas mitigadoras foram implementadas em 1945. Em 1957 iniciou-se o melhoramento genético através da hibridação com *C. crenata*. Em 2006 foram estabelecidos cruzamentos entre *C. sativa* x *C. crenata* e *C. sativa* x *C. molíssima*.

O trabalho experimental desta tese teve como objetivo de micropropagação de 44 clones híbridos desses cruzamentos. Na fase de estabelecimento e multiplicação onde foram testados macronutrientes dos diferentes meios de cultura: Murashige&Skoog (MS); MS com macronutrientes reduzidos a metade (MS/2); Greshoff and Doy (GD); e Fossard (FS). Aos meios testados foram adicionados micronutrientes de Murashige and Skoog, vitaminas de Fossard e 0,087M de açúcar. Foi testada a adição de benzilaminopurina (BAP) nas concentrações: 0,45; 0,89 e 2,22 μM .

No enraizamento e aclimatização testaram-se os seguintes métodos: 1) *ex vitro* – indução de enraizamento é por “*Dipping*” (imersão da base do rebento) (4,9 mM IBA; durante 15’’) em simultâneo com aclimatização; 2) *in vitro two steps* – indução de enraizamento *in vitro* em meio de cultura Knop (14,8 μM IBA; durante 7 dias), com posterior transferência para o mesmo meio base Knop adicionado CA 1% (durante 30 dias); 3) *in vitro dipping* – indução de enraizamento *in vitro* por “*Dipping*” (4,9 mM IBA; durante 15’’), com posterior transferência para o mesmo meio base Knop adicionado CA 1% (durante 30 dias). A aclimatização foi realizada em caixas de polietileno de plástico transparente contendo perlite. Após quatro semanas as plantas foram transferidas para vasos.

Os melhores resultados observados durante a fase de estabelecimento foram obtidos com BAP 0,89 μM . De 44 clones híbridos foram estabelecidos 30 clones. Os meios FS e MS/2 com BAP 0,45 μM mostraram melhores resultados na fase de multiplicação. A formação de *callus*, vitrificação e clorose mostraram ser consequências do fator genótipo Clone. O enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a aclimatização mostrou ser o mais eficaz dos procedimentos.

Palavras Chave: castanheiro, enraizamento, meios de cultura, aclimatização.

ABSTRACT

The production of fruit and wood sets *Castanea sativa* as an economically important species for the European countries. However, its production has been decreasing due to the susceptibility to certain fungi. Mitigating measures were implemented in 1945. Later, in 1957, genetic breeding was initiated through hybridization with *C. Crenata*. In 2006, crosses between *C. sativa* x *C. crenata* e *C. sativa* x *C. Molíssima* were established. The experimental work of this thesis aimed to start the micropropagation of 44 hybrid clones of these crossings.

At the stage of establishment and multiplication, the following macronutrients of different culture media were tested: Murashige&Skoog (MS); MS with half of the macronutrients (MS/2); Greshoff and Doy (GD); and Fossard (FS). Murashige and Skoog micronutrients, Fossard vitamins and 0.087M sugar were added to the tested media. Benzilaminopurin (BAP) addition was tested in three different concentrations: 0,45; 0,89 and 2,22 μM .

In the rooting and acclimatization phases the following methods were tested: 1) *ex vitro* - rooting by dipping induction (immersion of the shoot base) (IBA 4.9 mM; during 15") simultaneously with acclimatization, 2) *in vitro two steps* – *in vitro* rooting induction with culture medium Knop (14.8 mM IBA, for 7 days) followed by the same basal medium Knop with addition of CA 1% (30 days) 3) *in vitro dipping* - rooting induction by *in vitro* dipping (IBA 4.9 mM; during 15"), and subsequent transfer to the same basal medium Knop with 1% CA (for 30 days). Acclimatization was carried out in transparent polyethylene plastic boxes containing perlite. Four weeks later the plants were transferred to pots.

The most positive results were observed during the establishment phase using 0.89 mM BAP. 30 of the 44 hybrid clones were established. MS and MS/2 culture media with 0.45 mM BAP showed better results in the multiplication phase. The formation of callus, glazing and chlorosis shown to be consequences of the Clone genotype factor. The *ex vitro* rooting with the acclimatization proved to be the most effective procedures.

Key-words: Chestnut, rooting, culture media, acclimatization.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Caracterização Botânica

O castanheiro é uma angiospérmica dicotiledónea, árvore monóica que pode atingir grandes dimensões, pertencente a família das *Fagaceae*. Dentro da família das *Fagaceae* são conhecidas 900 espécies distintas, distribuídas por 9 géneros. As espécies dessa família são nativas de zonas temperadas e sub-tropicais do hemisfério norte, e como características gerais, apresentam folhas perenes ou caducifólias com margem inteira, dentada ou lobada (Kubitzki *et al.*, 1993).

O castanheiro é uma árvore de grande porte com folhas caducas, verdes e brilhantes, oblongo-lanceoladas (em forma de bico de lança) e dentada (a margem possui pequenos dentes), que estão dispostas alternadamente sobre os ramos. O comprimento das folhas é variável dentro das espécies, mas é comum atingir 20 cm de comprimento e 5 cm de largura. Desenvolve uma copa larga e semi-esférica, mais ou menos alongada, que pode chegar aos 30-40 m de diâmetro, com altura média de 10-20 m, podendo alcançar uma altura total de 45m, dependendo da espécie (Fenaroli, 1945; Bergougnoux *et al.*, 1978). O tronco é liso nos primeiros 10-15 anos tendo a casca uma coloração castanha-rosada que rapidamente se fendilha criando linhas pouco profundas que com o envelhecimento das árvores faz com que o tronco pareça estar torcido ganhando uma cor acinzentada e mais escura. Nos exemplares que são cultivados para obter fruto, o tronco é grosso e curto, e mais finos e compridos nos exemplares cultivados para madeira. O cepo quando cortado origina rebentos compridos e retos, característica de um crescimento rápido (Paiva, 1990). O castanheiro possui um sistema radicular constituído por raízes grandes e robustas, que penetra em profundidade se o solo permitir, caso contrário, desenvolve abundantes e longas raízes no sentido horizontal (Gonçalves, 1991)

O castanheiro tem um ciclo vegetativo dividido em quatro fenofases: a foliação, a floração, a frutificação e a desfoliação. Essas quatro fenofases são dependentes das condições climáticas (Bergougnoux *et al.*, 1978). Pode-se dizer que em Portugal o abrolhamento começa normalmente na segunda quinzena de Março e a florescência começa quando a temperatura média atinge os 15 – 18 °C. Sendo uma planta monóica, as flores masculinas têm amentilhos eretos, axilares e amarelados, que podem medir entre 25-30 cm de comprimento e são repletos de flores que aparecem entre Maio e Junho. As flores femininas aparecem na

base e tem amentilhos pequenos, chegam a medir entre 5-6 cm de comprimento, são menos numerosas, e aparecem cerca de um mês depois das masculinas. O repouso vegetativo inicia-se no mês de Novembro e dura até o mês de Março (Gomes, 1982; FCUP, s.d.).

O fruto do castanheiro é conhecido por castanha. As castanhas possuem um pericarpo delgado e os cotilédones são bastante grandes. São protegidos por cúpulas frutíferas espinhosas (ouriços), sendo possível encontrar de 1-3 castanhas por cúpula (Anjos, 2003). Os ouriços têm dimensões variáveis, são geralmente pequenos nos castanheiros florestais e de maiores dimensões nos castanheiros para produção de frutos instalados em sotos a uma densidade menor comparativa aos povoamentos de castanheiro para produção de madeira, designados por castinçais. Localizam-se nas partes terminais e subterminais dos ramos do ano e possuem espinhos retos e firmes, com ramificações intrincadas que marcam a parede externa constituída por quatro válvulas (Gonçalves, 1991). Os ouriços são deiscentes durante a maturação e deixam cair as castanhas entre Outubro e Novembro. O castanheiro começa por dar frutos entre os 8-10 anos de idade, mas a produção intensifica-se aos 20 anos de idade (Paiva, 1990).

2.2 Distribuição e Interesse económico

Estudos desenvolvidos mostram que o castanheiro surgiu a muitos anos, desenvolvendo uma evolução em que se verificou um aumento da variabilidade genética por mutação e do fluxo gênico e uma redução gênica por seleção natural e deriva genética (Villani *et al.*, 1994). A origem concreta do castanheiro ainda hoje é desconhecida mas, há estudos que indicam a sua presença na Europa data desde o final da Era Mesozóica – princípio da Era Cenozóica, época na qual começou a sua expansão (Anjos, 2003).

Segundo Abreu (1996), o castanheiro é uma espécie que se expandiu pela Europa e a Ásia, difundida pelos romanos no Mediterrâneo Ocidental e Central como uma cultivar: primeiramente na Grécia, depois na Itália, França e Península Ibérica. O objetivo de cultivar o castanheiro era pelo seu fruto calórico, pequeno e fácil de transportar.

Durante a idade média na Europa Ocidental, as civilizações dos países mediterrânicos dedicaram-se ao cultivo do castanheiro pela sua dupla aptidão: alimentação humana e dos animais, e aproveitamento do lenho de excelente qualidade para o mobiliário. Mais tarde com a introdução de cultivares como a batata, o milho, a oliveira e vinha, o cultivo da castanha declinou, perdendo o seu posto de alimento quotidiano. Ainda nos finais do século XIX,

houve um grande interesse económico na extração da madeira dos castanheiros, o que resultou na redução significativa da área de soutos, visto não se ter tido o cuidado com o repovoamento (Abreu, 1992).

Atualmente, as zonas onde se registam maiores áreas de cultivo de castanheiros são: o Sudeste dos Estados Unidos da América, a Europa Mediterrânica e em conjunto, alguns países orientais como Japão, China e Coreia. De acordo com os dados da FAO (2006), a produção mundial de castanha é de cerca de 1,1 milhões de toneladas e a superfície total cultivada não atinge os 340 mil hectares. A China é o maior produtor mundial, com uma produção anual de cerca de 800 mil toneladas, o que representa 70% da produção mundial. A Europa tem uma percentagem de 12% na produção total, onde se destacam: Portugal responsável por 3% na produção mundial e Itália com 4%.

Em Portugal, ao longo dos anos, o castanheiro vem apresentando uma expansão da área de cultivo (INE, 2006). Verifica-se um aumento da área arborizada devido ao incentivo monetário que o governo oferece aos agricultores que modificam o uso das suas terras, passando de agrícola para florestal (Seabra *et al.*, 2001).

As áreas de maior produtividade de castanha em Portugal, situam-se com 85% das cultivares no Nordeste Transmontano (Bragança, Chaves, Guarda), Portalegre, e algumas zonas da Beira Interior. Na TABELA 1 é possível observar a informação relativa à área de cultivo e produção de fruto do ano de 2008 (INE, 2008). A cultura do castanheiro tem uma área de mais de 30.000 hectares em Portugal e produz cerca de 21.000 toneladas de castanhas por ano. A castanha ocupa o segundo lugar de produtos agrícolas mais exportados em Portugal (INE,2002).

Tabela 1- Área ocupada pelo cultivo do castanheiro e caracterização da produção de fruto em Portugal.

	<i>Superfície (ha)</i>	<i>Produção (ton/ha)</i>
Norte	26.444	18.508
Centro	3.145	2.459
Lisboa	5	3
Alentejo	533	672
Algarve	6	5

Fonte: INE (2008)

2.3 Espécies de Interesse Económico

Os castanheiros podem ser cultivados para o consumo dos seus frutos, extração de madeira e até para efeitos ornamentais. O castanheiro europeu - *Castanea sativa*, cuja designação científica de *sativa* quer dizer “cultivada”, é cultivado pela sua dupla aptidão. O castanheiro americano - *Castanea dentata* é um exemplo de uma espécie cultivada pela sua grandiosidade e elegância, sendo considerada uma árvore ornamental. Já o castanheiro japonês - *Castanea crenata* e o castanheiro chinês - *Castanea mollissima* têm sido cultivados pelos seus frutos e pela resistência a determinadas doenças. Essas quatro espécies dentro do género *Castanea*, são as que apresentam maior importância económica a nível mundial (Anjo, 2003).

O castanheiro europeu (*Castanea sativa*) é cultivado essencialmente na zona mediterrânica da Europa, podendo ser encontrado desde o nível do mar, até mil metros de altitude. Necesita de uma precipitação média anual superior aos 600 milímetros, conseguindo suportar uma estação de seca por três meses. (Costa *et al.*, 2011).

O castanheiro americano (*Castanea dentata*) é característico da região do sudeste do Estados Unidos da América. Semelhante ao castanheiro europeu, o castanheiro americano chega a atingir uma altura de 30 m, possui um caule liso com uma coloração que varia entre o cinzento-escuro ao acastanhado, e com a idade tem tendência para ganhar fissuras, tal como o castanheiro europeu. A maior diferença do castanheiro americano para com as outras espécies do mesmo género está relacionada com a reprodução. Enquanto as outras são polinizadas pelo vento, o castanheiro americano necessita dos insetos para que haja uma polinização cruzada, e dessa forma ocorra a produção de frutos (Meireles *et al.*, 2005).

O castanheiro japonês (*Castanea crenata*) é originário do Japão, e atualmente bastante cultivado na China. Comparando com a espécie europeia, o castanheiro japonês alcança menor porte, uma média de 15 m de altura. As suas folhas são também menores, apresentando um comprimento de 8-19 cm (Santos *et al.*, 2009).

O castanheiro Chinês (*Castanea mollissima*) surgiu nas regiões do norte e oeste da China, representando menor porte de árvore das quatro espécies apresentadas como sendo economicamente rentáveis. Crescem em média até 12 m de altura, embora as suas folhas sejam maiores que a do castanheiro japonês, com cerca de 12-22 cm de comprimento. O castanheiro chinês é cultivado em áreas com uma altitude superior à 1200 m acima do nível do mar (Santos *et al.*, 2009).

2.4 Restrições a cultura do Castanheiro

É possível encontrar o castanheiro em diversos tipos de solo, embora prefiram terrenos com solos ligeiros, frescos e bem drenados, tendo como base areias siliciosas: de saibros graníticos ou de decomposição de xistos e terras vulcânicas. O castanheiro tem preferência por solos levemente ácidos (pH abaixo de 6-6,5) onde tenha baixo teor de argila e sem calcário (Gonçalves, 1991). É uma espécie de altitude que pode ser cultivada até aos 1200-1300 m de altitude caso o intuito seja explorar madeira; para a exploração do fruto, a altitude deve ser até aos 800 m acima do mar. A cultura do castanheiro pode ocupar áreas como vales e encostas montanhosas (Anjos, 2003; Gonçalves, 1991).

O castanheiro é uma espécie rara em bosques mistos, principalmente onde os *Quercus* aparecem como espécie principal (Anjos, 2003). O seu cultivo tem-se expandido essencialmente por plantações mono específicas destinadas à produção de madeira. Tem-se registado nos últimos 20 anos um aumento da população de castanheiro por regeneração natural. Isso deve-se ao facto de haver cada vez menos pastoreio e uma diminuição de cultivo nos terrenos agrícolas, principalmente nas regiões de clima atlântico (López *et al.*, 2000).

Além das terras para cultivo de castanheiro, existe outro grande entrave para a expansão dos castanheiros: doenças. Estão identificadas várias doenças que atacam o castanheiro e que também são comuns a outras espécies florestais, mas devido ao carácter epidémico, sobressaem o cancro do castanheiro causado pelo fungo *Cryphonectria parasítica* (Murril) Barr (*Endothia parasítica*) e a doença da tinta causada pelos fungos *Phytophthora cinnamomi* Rands e raramente pelo *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis (Gonçalves, 1991).

Nos Estados Unidos da América, durante os finais do século XX, o castanheiro americano foi infetado numa área superior a 3,9 milhões de hectares pelo cancro do castanheiro (Abreu, 1992). Segundo Gonçalves (1991), supõe-se que a doença do cancro tenha sido introduzida na Europa nos finais da 1ª Guerra Mundial. Os primeiros danos na Europa foram registados no norte de Itália afetando cerca de 125 mil hectares. Em França foi detetado depois da 2ª Guerra Mundial, seguidamente alastrou-se por Espanha, e logo depois em Portugal. O primeiro foco infeccioso foi descoberto na região de Braga em 1989. O castanheiro europeu desenvolveu uma maior tolerância ao carácter virulento da doença devido ao fenómeno de hipovirulência exclusiva contagiosa (Bragança *et al.*, 2005; Gonçalves, 1991).

A doença do cancro foi introduzida nos Estados Unidos da América por importações de espécies de castanheiros asiáticos. Foram realizadas análises genéticas que comprovam que o fungo teve origem no Japão. Das espécies de castanheiros mencionadas até então, o americano é o que demonstra ter maior suscetibilidade ao carácter de virulência deste fungo (Huang *et al.*, 1998).

O principal sintoma do cancro do castanheiro são as manchas avermelhadas nos ramos e tronco das plantas jovens, a casca fica fendilhada, as folhas caem e os ramos ficam secos na copa. Também é possível observar a presença de micélios amarelados em forma de leque na casca. O modo de dispersão do fungo são os agentes naturais como a chuva, vento, insetos e aves. Os esporos infetam as feridas das árvores causadas por causas naturais ou por intervenção do homem (DRATM, 2003a).

A doença da tinta do castanheiro é a que tem causado maiores prejuízos em Portugal. O primeiro caso em Portugal remonta para o ano de 1838, mas estudos realizados afirmam que a doença já existia na Europa antes disso (Portela *et al.*, 1998).

O fungo ataca a planta em qualquer idade e o sistema radicular é onde se inicia o foco da infeção. Atacando as extremidades das radículas, progride em direção ao colo limitando gradualmente a circulação da seiva, em casos extremos, impedindo mesmo a sua circulação (Anjos, 2003; Gonçalves, 1991). A casca torna-se fendilhada o que causa a perda de translocados floémicos tornando-se cada vez mais difícil de fornecer nutrientes a parte aérea da planta. Lentamente as folhas murcham, caem e a copa da árvore começa a morrer (Gonçalves, 1991).

Os principais sintomas da doença da tinta podem ser observados na parte aérea, colo e parte subterrânea. Em pleno período vegetativo, observa-se o emurchecimento e clorose das folhas das extremidades dos ramos. Os ouriços podem vir a ficar agarrados à planta durante o inverno e raramente dão frutos e, os que conseguem dar, não atingem as dimensões normais. O colo da árvore apresenta podridão, a casca separa-se facilmente e observa-se uma cor violeta escura no tronco. As raízes decompõem-se e libertam um líquido quase negro, origem do nome vulgar da doença (Carvalho, 2005).

O fungo *Phytophthora cinnamomi* tem o ciclo de vida no solo, possui um micélio hialino e hifas irregulares. A propagação faz-se através da água da rega, chuva, terra e material vegetativo contaminado. Solos com má drenagem, baixo teor de matéria orgânica e pobre em nutrientes favorecem o desenvolvimento do fungo e posterior infeção das plantas.

Tem ainda a capacidade de permanecer no solo devido a formação de estruturas de resistências que origina quando as condições são desfavoráveis ao seu crescimento (Carvalho, 2005).

2.5 Importância dos híbridos no melhoramento da flora

As espécies do género *Castanea* têm todas o mesmo número de cromossomas ($2n=24$), o que indica que pode haver cruzamentos inter-espécies resultando em híbridos (Gonçalves, 1991). Os castanheiros híbridos são aqueles em que há duas ou mais espécies na sua ascendência.

Nos principais países asiáticos produtores de castanheiros, é cultivado a espécie *Castanea mollissima* que apresenta resistência à doença da tinta e do cancro. Os fungos responsáveis por essas doenças estão naturalmente presentes nos solos asiáticos. Quanto maior for a permanência das espécies numa dada região, maior é a probabilidade de se conferir uma resistência às doenças que prevalecem nessa região, por seleção natural. Acredita-se que essa seja a explicação que explica a resistência dos castanheiros *Castanea mollissima* e *Castanea crenata*, que evoluíram em equilíbrio na presença dos agentes patogénicos (Abreu, 1992).

Foram realizados estudos que mostraram que o castanheiro americano é descendente do castanheiro chinês. Supõem que a não existência da resistência a essas doenças deve-se ao facto de quando a espécie foi introduzida na América, se verificava a ausência do fungo (Huang *et al.*, 1998).

Alguns exemplares desses castanheiros resistentes foram aproveitados em programas de melhoramento genético. A estratégia de utilizar uma espécie resistente na reconstituição de novos sotos foi iniciada por Guerreiro (1957). Realizou a tentativa de hibridação do castanheiro europeu com o castanheiro japonês, tendo antes constatado que as espécies resistentes não podiam substituir a autóctone, sendo estas exigentes na preferência climática, assim não proporcionando o objetivo previsto.

Quando se estabelece um programa de melhoramento genético para castanheiros, tenta-se ter em conta dois fatores: melhoramento das características produtivas de fruto e lenho; e obtenção de híbridos resistentes às doenças. O segundo fator é o objetivo principal, embora um pouco mais complicado. Em Portugal, assim como em outros países europeus,

para tentar obter espécies resistentes com o vigor híbrido, recorre-se a hibridação entre a espécie autóctone e espécies exóticas resistentes (Gonçalves, 1991).

Para conseguir um híbrido com tais características, executaram-se retrocruzamentos sucessivos a fim de aumentar a incorporação de genes do progenitor europeu, bem como os genes de características importantes do dador (Gonçalves, 1991). Gomes (1982) afirmou que no futuro, deveriam apostar no desenvolvimento de polinizações controladas com cruzamentos entre os clones do castanheiro europeu possuidores de ótimas características e retrocruzamentos de híbridos com os clones do castanheiro europeu, de forma a aumentar a “pool” genética, bem como os genes associados quer à produção de fruto e madeira quer a resistência à doença.

O método clássico de propagação vegetativa não se obteve o sucesso desejado na multiplicação de clones híbridos de castanheiro. A biotecnologia, com o desenvolvimento da cultura de tecidos vegetais *in vitro* aplicada à propagação de plantas, demonstra ser o caminho alternativo eficaz às metodologias clássicas (Gonçalves, 1991).

2.6 Propagação vegetativa – Micropropagação

A multiplicação de castanheiros é possível de se realizar através de dois métodos: propagação por via sexuada ou seminal e a propagação por via assexuada ou vegetativa. Como métodos de propagação vegetativa há-de referir: estacaria, enxertia, mergulhia, alporquia e micropropagação. A micropropagação tem por base um mecanismo de reprodução iniciada por estruturas vegetativas da planta original que contém toda a informação genética necessária para regenerar uma planta completa, sendo esse fenómeno explicado pela totipotencialidade das células (Coelho, 1999).

A teoria da totipotencialidade formulada por Matthias Schleiden e Theodor Schwann em 1838, é o princípio fundamental que suporta a possibilidade de cultivar tecidos vegetais em condições artificiais. A célula tem a capacidade de autonomia e, como tal, contém o potencial necessário para se regenerar até originar um novo organismo completo (Moreira, 2009).

Um filósofo vegetal austro-húngaro, Haberlandt em 1902, tentou pela primeira vez o cultivo de células e tecidos vegetais, tentando estabelecer e consolidar o primeiro sistema de micropropagação (Gonçalves, 1991; Moreira, 2009). Numerosos ensaios foram realizados a

fim de identificar as substâncias que promoviam o crescimento celular. Ensaios de associação de auxinas e citocininas, e combinações de micro e macronutrientes, mostraram-se adaptar às necessidades fisiológicas das células vegetais, permitindo que uma maior diversidade de células, tecidos e órgãos de diferentes espécies fossem estabelecidos *in vitro* (Gonçalves, 1991).

A primeira propagação *in vitro* realizada com sucesso foi feita por Morel (1960, 1964) na qual obteve clones isentos de vírus e pode verificar o sistema de regeneração na propagação clonal de orquídeas.

Existem diferentes sistemas de cultura de tecidos. Os sistemas de cultura podem ser classificados em sistemas de cultura desorganizados (cultura de protoplastos, cultura de antera e/ou pólen, cultura de células em suspensão) em que as “células passam por uma fase de dediferenciação aumentando o volume tecidual com total ausência de estruturas organizadas, contendo apenas um limitado número de diferentes células especializadas”. O sistema de cultura organizada (cultura de embriões, cultura de órgãos determinados) baseia-se “na continuidade do crescimento e preservação das estruturas histológicas já existentes, dependendo exclusivamente do tipo de estrutura em cultura e do tipo de pré-determinação genética que as células receberam” (Gonçalves, 1991).

A cultura de órgãos que possuem tamanho e formas definidas (folha, flores e frutos) permitem estudar os efeitos dos reguladores de crescimento, mas os órgãos com maiores aplicações e impacto na propagação vegetativa são os órgãos de crescimento indeterminado (meristemas apicais de caules ou de raízes), cujo crescimento é ilimitado (Gonçalves, 1991).

Os meristemas e ápices caulinares são os mais utilizados na propagação vegetativa, pois permitem uma regeneração de plantas completas e apresentam baixos níveis de variabilidade genética podendo assim garantir a estabilidade genotípica dos clones. As culturas de meristemas e ápices caulinares são as mais utilizadas para a desenvolver sistemas de criopreservação que são preservados nos bancos de germoplasmas (Gonçalves, 1991; Galli *et al.*, 1992).

A Associação Internacional de Cultura de Tecidos define micropropagação por “propagação de plantas em meios de cultura de formulação definida, mantidas em ambiente artificial controlado, utilizando contentores de plástico ou vidro, com manipulações em condições assépticas” (Gonçalves, 1991). É a propagação fiel de um genótipo selecionado destinado a produção em larga escala em curto período de tempo.

Os estudos de Murashige (1974) e mais tarde adaptados por Debergh e Maene (1981), estabeleceram os princípios gerais para a realização de um sistema de micropropagação, sendo definidas 5 fases:

Fase 0. Selecionar planta matriz e desinfecção do explante

Envolve toda a fase de manipulação do material vegetal, desde a recolha até ao estabelecimento *in vitro*. Nesta fase incluem-se os pré-tratamentos do material vegetal e desinfecção, tornando-se fundamental o controlo dos fatores como a idade e o estado fisiológico e sanitário da planta mãe, idade e posição do tecido ou órgão na planta, constituição genética, entre outros.

Fase 1. Estabelecimento de uma cultura asséptica.

Inclui o isolamento do explante e o seu estabelecimento em condições assépticas no meio de cultura adequado à espécie.

Fase 2. Multiplicação.

O principal objetivo dessa fase é conseguir propagar sem perda de estabilidade genética. Nesta fase é importante a escolha da formulação do meio de cultura bem como as condições físicas do ambiente de crescimento.

Fase 3. Enraizamento e preparação para o crescimento em ambiente natural.

Inclui a formação de raízes adventícias, quer *in vitro* quer *ex vitro*, podendo haver necessidade de uma fase prévia de alongamento dos rebentos obtidos na fase dois.

Fase 4. Aclimatização das plantas.

Necessidade das plantas desenvolvidas em heterotrofia se adaptarem e sobreviverem em condições autotróficas. Nesta fase, são determinantes todo um conjunto de fatores físicos, tais como luz, humidade e temperatura, que deve ser gradualmente alterados a fim de permitir à planta a sua adaptação às condições ambientais naturais, garantindo-lhe auto-suficiência fotossintética.

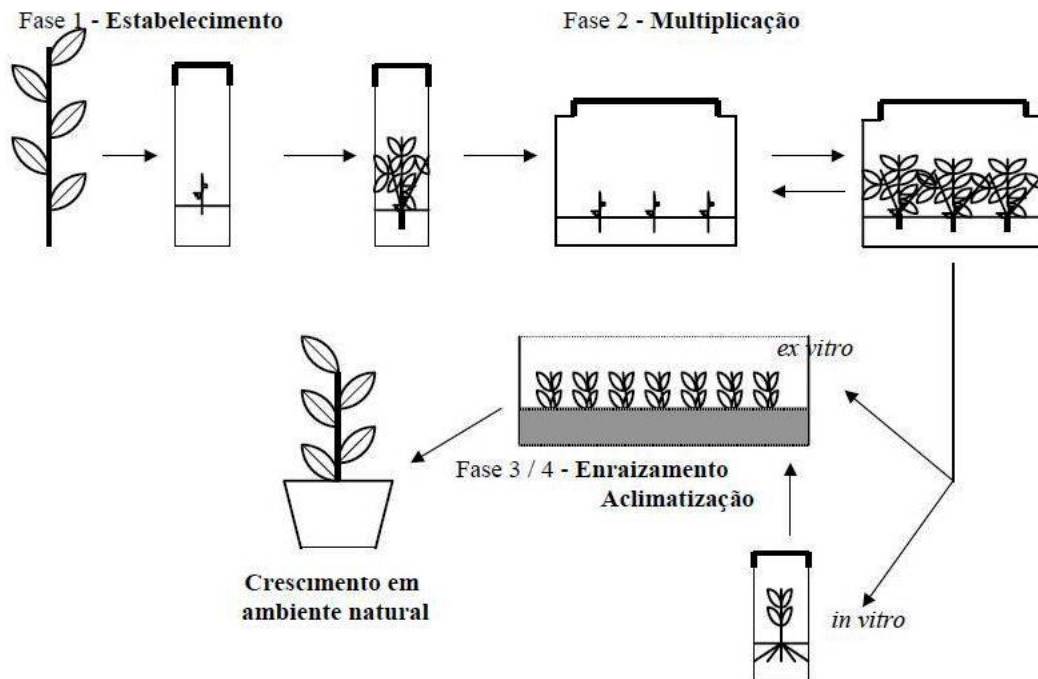


Figura 1- Representação de um sistema de micropropagação por gomo axilar, exemplificando dois sistemas alternativos de enraizamento, *in vitro* e *ex vitro*. No enraizamento *ex vitro*, a expressão e desenvolvimento radicular ocorre em condições autotróficas, podendo considerar-se as plantas em pré-aclimatização.

2.7 OBJETIVO

O declínio no cultivo de castanheiros tornou necessário uma solução para o combate as doenças que os afetam. Estudos desenvolvidos no âmbito do projeto _____ entre *Castanea sativa* e dois genótipos resistentes à doença da tinta *C. crenata* e *C. molíssima*.

A cultura de tecidos pode ser empregada para a multiplicação desses híbridos através da micropropagação. A micropropagação permite um trabalho contínuo ao longo do ano, que acelera a propagação comparado com outros métodos convencionais. Permite ainda fazer ensaios e testes de estudos em raízes de plântulas jovens antecipando assim a seleção de genótipos pela sua resistência a doença da tinta.

Este trabalho teve como objetivo otimizar os protocolos de micropropagação por multiplicação de gomos axilares de híbridos de *Castanea* para a produção de plantas e posterior desenvolvimento de testes de resistência a *Phytophthora cinamomi*.

Durante os períodos de estabelecimento e multiplicação foram testados quatro meios de cultura base (macronutrientes): Murashige&Skoog (MS); MS com macronutrientes reduzidos a metade (MS/2); Greshoff and Doy (GD); e Fossard (FS). Também foi analisado o

efeito do regulador de crescimento a benzilaminopurina (BAP), nas seguintes concentrações: 0,45; 0,89 e 2,22 μM para um total de 30 clones híbridos de *Castanea*. No período de enraizamento foram testados três protocolos diferentes: enraizamento *ex vitro* em simultâneo com o processo de aclimatização; enraizamento *in vitro two steps*, caracterizado por duas etapas distintas de indução de enraizamento com auxinas, seguida pelo desenvolvimento das raízes num meio de cultura sem reguladores de crescimento; neste caso, comparou-se a indução num período curto de tempo com a indução em meio sólido, com menor concentração de auxina, durante um período maior de tempo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Para a realização dos ensaios foram utilizados híbridos de *Castanea sativa* X *Castanea crenata* e híbridos de *C. sativa* X *Castanea mollissima*, obtidos por ponilização controlada na UTAD.

O material selecionado para estabelecimento das culturas *in vitro* foram gomos axilares e terminais. A obtenção do material foi realizada pela manhã, enquanto o material vegetal se encontrava ainda bastante turgido, evitando o risco de desidratação. O estabelecimento *in vitro* foi realizado de acordo com as metodologias resumidamente descritas abaixo e foram baseadas em trabalhos anteriormente publicados (Gonçalves *et al.*, s.d.; Coelho, 1999).

O material vegetal com características herbáceas colhido nos pés-mães destinava-se a: macropropagação por estacaria e micropropagação *in vitro*.

3.2 Estabelecimento das culturas *in vitro*

Durante vários dias do mês de Agosto, foram recolhidas estacas com cerca de 20 a 25 cm de comprimento para propagação de castanheiros por estacaria, onde se rejeitava a região apical. A região apical herbácea rejeitada com cerca de 3 cm continha de 2 a 3 gomos axilares e o gomo apical. Estes jovens rebentos foram armazenados de frascos de plástico identificados por clones e guardados dentro de uma caixa térmica com gelo, de forma a serem transportados causando o mínimo de desidratação possível da amostra recolhida.

As amostras foram passadas por água destilada e as folhas foram retiradas com o auxílio de um bisturi e cautela de forma a não danificar os gomos. Dentro da câmara de fluxo laminar, a desinfeção inicialmente foi feita imergindo os rebentos em etanol a 70% durante 2 min, lavaram-se os rebentos por 3 vezes com água esterilizada e de seguida imergiram-se os rebentos em uma solução de lixívia a 20% com algumas gotas de teepol durante 5 min. A remoção do desinfetante foi feita passando os rebentos por água esterilizadas 3 vezes consecutivas. O processo de desinfeção com o decorrer do tempo foi alterado consoante os resultados que se foram obtendo (quando se obtinham taxas de contaminação maiores o

tempo de exposição aos agentes desinfetantes era maior; quando ocorriam necroses, o tempo de exposição aos desinfetantes era menor).

Para o estabelecimento foram utilizados os segmentos nodais e os ápices. Introduziu-se um explante em cada tubo de ensaio contendo meio nutritivo de Anderson (1984) (ANEXO 1), mais tarde sendo substituído pelo meio Fossard (FS) (ANEXO 2). A fim de diminuir a emissão de fenóis durante os primeiros dias de estabelecimento, as culturas eram mantidas em ambiente escuro, sendo depois transferidas gradualmente para o regime normal de fotoperíodo. Na fase de estabelecimento os explantes foram repicados para novos meios de cultura em intervalos de 2 à 3 semanas.

3.3 Multiplicação e alongamento das culturas

A multiplicação e manutenção das culturas foram realizadas com intervalos de 3 a 4 semanas. Quando os segmentos nodais alcançavam tamanho médio de 1cm eram separados do explante principal. Os meios de cultura utilizados na fase de multiplicação e alongamento foram sofrendo alterações ao longo do trabalho consoante as respostas dos clones. Os meios testados foram: Murashige and Skoog (MS), Murashige and Skoog com nutrientes reduzidos a metade (MS/2), Forssard (FS) e Greshoff and Doy (GD). A composição dos meios está descrita nos ANEXOS 3, 4, 5.

As culturas foram mantidas em todas as fases de micropropagação em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8 h, sob lâmpadas fluorescente branca, a uma temperatura média de 25/20°C respetivamente.

3.4 Enraizamento e Aclimatização

Os rebentos utilizados foram obtidos a partir de culturas de 6 meses de idade, após o estabelecimento *in vitro*. No momento em que os clones atingiram altura média de 5cm, estes clones eram selecionados para o processo de enraizamento e posterior aclimatização. Foram testados 3 protocolos diferentes para induzir o enraizamento:

- 1) *ex vitro* – a base do rebento foi cortada na diagonal de forma a maximizar a área de contacto e mergulhada em solução de 4,9 mM de ácido indol 3-butírico (IBA) durante um período de 15 segundos (*Dipping*). Imediatamente após, eram transferidos para caixas plásticas contendo perlite. Os clones eram identificados e colocados em linha (Fig. 2). As caixas foram fechadas com uma tampa transparente para manter a humidade relativa elevada e transferida para a câmara de crescimento (16/8h a 25/20°C).



Figura 2 - Indução de raízes *ex vitro*.

- 2) *In vitro two steps* – os rebentos foram repicados para o meio de cultura Knop contendo 14,8 µM de IBA durante um período de 7 dias. Após o tempo de indução, ao rebento foi transferido para um meio de desenvolvimento das raízes Knop adicionado de CA 1% durante 30 dias. A aclimatização foi realizada em caixas plásticas contendo perlite conforme previamente descrito.
- 3) *In vitro dipping* - a base do rebento foi cortada na diagonal de forma a maximizar a área de contacto e mergulhada em solução de 4,9 mM de IBA durante um período de 15 segundos (*Dipping*). Após indução *in vitro* o rebento foi transferido para um meio de desenvolvimento Knop e CA 1% durante 30 dias. A aclimatização foi realizada em caixas plásticas contendo perlite conforme previamente descrito.

3.5 Recolha de dados e Tratamento estatístico

A fase de estabelecimento teve como objetivo estabelecer *in vitro* o maior número de clones. Os métodos de desinfeção utilizados foram em função das características observada do material vegetal e da época do ano. Foram quantificados o número total de clones estabelecidos.

Durante a fase de multiplicação pretendeu-se identificar o meio de cultura base de macronutrientes e a concentração de BAP, mais favoráveis à multiplicação das culturas. Para estudar o efeito do meio de cultura base e concentração de BAP na multiplicação das culturas

foram observados diversos parâmetros como: taxa de sobrevivência, comprimento do maior rebento, número de rebentos, presença de *callus*, presença de vitrificação, presença de clorose, evolução e crescimento, e número de segmentos viáveis.

Para interpretação dos resultados observados na fase de multiplicação foram observadas diferentes variáveis com o objetivo de avaliar a resposta dos genótipos às condições testadas:

- 1) Para avaliar a taxa de sobrevivência, foi utilizado um sistema de avaliação a que foi dado o nome de **CNS**. Este sistema permite avaliar as observações efetuadas quanto à taxa de contaminação (representada pela letra C e à qual é atribuída o valor 0), taxa de necroses (representada pela letra N e à qual é atribuída o valor 1) e taxa de sobreviventes (representada pela letra S e à qual é atribuída o valor 2). Foram observados os explantes e foi anotado um valor consoante o estado físico dos mesmos (0 = Contaminado; 1 = Necrosado; 2 = Sobrevivente). De seguida foi calculada a média entre os valores observados para os diferentes **meios de cultura** e para as diferentes **concentrações de BAP**. Valores superiores deste parâmetro indicam uma taxa de sobrevivência maior.

- 2) Para avaliar a taxa de evolução e proliferação dos clones, foi utilizado um parâmetro de avaliação a que foi designado por **NAPB**. Este sistema permite avaliar as observações efetuadas quanto à evolução e crescimento dos explantes sendo que quando não se observa nenhuma modificação no explante designamos por “nada” (representada pela letra N e à qual é atribuída o valor 0), quando se observa um alongamento representa-se pela letra A (à qual é atribuída o valor 1), quando se observa uma proliferação de rebentos no explante representamos pela letra P (à qual é atribuída o valor 2) e quando é observado tanto uma proliferação como alongamento representamos a letra B (à qual é atribuída o valor 3). Foram observados os explantes e foi anotado um valor consoante o estado físico dos mesmos (0 = Nada; 1 = Alongamento; 2 = Proliferação; 3 = Both). De seguida foi calculada a média entre os valores observados para os diferentes **meios de cultura** e para as diferentes **concentrações de BAP**. Valores superiores deste parâmetro indicam uma maior taxa de proliferação das culturas.

- 3) O número de rebento **NR** foi registado a partir do momento em que surgia um gomo axilar no explante principal. Foram observados os explantes e contabilizados os gomos independentemente do tamanho que possuíam. A média foi calculada entre os valores observados para os diferentes **meios de cultura** e para as diferentes **concentrações de BAP**.
- 4) O comprimento do maior rebento **CM** por explante inicial foi medido em milímetros, selecionado entre os gomos existente no explante principal. Foram observados os explantes e medidos com recurso a papel milimétrico os gomos axilares. A média foi calculada entre os valores observados para os diferentes **meios de cultura** e para as diferentes **concentrações de BAP**.
- 5) O número de segmento **NS** utilizado na multiplicação analisa a quantidade de segmentos com dimensões superiores a 10mm que podem ser utilizados na multiplicação seguinte. Foram observados os explantes e medidos com papel milimétrico os gomos axilares, apenas foram contabilizados aqueles que possuíam dimensões adequada. Essa variável está diretamente ligada a variável **CM** e **NAPB**, em função do comportamento do clone. Assim caso estes se multipliquem devido ao alongamento do rebento ou a proliferação das culturas, a variável **NS** estará associada ao **CM** ou **NAPB** respectivamente. A média foi calculada entre os valores observados para os diferentes **meios de cultura** e para as diferentes **concentrações de BAP**.
- 6) Para avaliar a existência de *callus*, foi utilizado um parâmetro de avaliação visual que permite avaliar as observações efetuadas quanto à presença de *callus* no explante. A análise foi feita quanto à ausência de *callus* no explante (à qual é atribuído o valor 0), presença de *callus* apenas na base (à qual é atribuído o valor 1), *callus* com diâmetro de aproximadamente 1cm (é atribuído o valor 2), *callus* presente acima do meio de cultura na região do caule (é atribuído o valor 3), *callus* presente nas folhas do explante (é atribuído o valor 4) e morte do explante por estar coberto de *callus* (é atribuído o valor 5). Foram observados os explantes e foi anotado um valor consoante o estado físico dos mesmos. De seguida foi calculada a média entre os valores observados para os diferentes **meios de cultura** e para as diferentes **concentrações de BAP**.

- 7) Para avaliar a existência de vitrificação, foi utilizado um sistema de avaliação visual que permite avaliar as observações efetuadas quanto à presença de vitrificação no explante. A análise foi feita quanto à ausência de vitrificação no explante (à qual é atribuído o valor 0), presença vitrificação suave nas folhas (à qual é atribuído o valor 1), vitrificação em cerca de 50% do explante (é atribuído o valor 2) e vitrificação acima de 75% do explante (é atribuído o valor 3). Foram observados os explantes e foi anotado um valor consoante o estado físico dos mesmos. De seguida foi calculada a média entre os valores observados para os diferentes **meios de cultura** e para as diferentes **concentrações de BAP**.
- 8) Para avaliar a existência de cloroses, foi utilizado um parâmetro de avaliação visual que permite avaliar as observações efetuadas quanto à presença de clorose no explante. A análise foi feita quanto à ausência de clorose no explante (à qual é atribuído o valor 0), presença clorose suave nas folhas (à qual é atribuído o valor 1), clorose em cerca de 50% do explante (é atribuído o valor 2) e clorose acima de 75% do explante (é atribuído o valor 3). Foram observados os explantes e foi anotado um valor consoante o estado físico dos mesmos. De seguida foi calculada a média entre os valores observados para os diferentes **meios de cultura** e para as diferentes **concentrações de BAP**.

Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão em forma de tabela.

A análise estatística dos dados foi efetuada por um programa estatístico (STATISTICA V6), sendo que a significância estatística dos fatores **Meio de cultura**, **Concentração de BAP** e **Genótipo Clone** foi efetuada por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de médias *Duncan*, no caso de existirem diferenças significativas entre tratamentos, de forma a identificar as condições mais favoráveis à micropropagação. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento

Nesta fase tínhamos como objectivo estabelecer o maior número possível de clones das plantas existentes nas estufas da Escola Superior Agrária de Coimbra e obter boas taxas de sucesso de explantes colocados pela primeira vez em condições *in vitro*.

Desta forma tentou-se estabelecer um total de 44 clones de híbridos. No total dos 44 clones híbridos, foram estabelecidos *in vitro* 30 clones híbridos.

Para obter sucesso no estabelecimento teríamos que utilizar essencialmente um processo eficaz de desinfeção.

Dependendo das condições dos rebentos teríamos que utilizar dois tipos de processo de desinfeção. No caso de os rebentos se apresentarem mais lenhificados, o risco de contaminações era maior, como tal o tempo de exposição aos desinfectantes teria de ser maior – etanol a 70% durante 2 min e solução de lixívia durante 7,5 min. No caso de os rebentos serem demasiado jovens e herbáceos ocorriam, com maior frequência, necroses, sendo assim nesse caso o tempo de exposição era menor – etanol a 70% durante 1 min e solução de lixívia durante 5 min.

As últimas tentativas de estabelecer os clones ocorreram no final do mês de Setembro. Nessa época do ano, o material vegetal já está mais lenhificado e com maior presença de fungos e insetos do viveiro, por outro lado prepara-se para entrar em período de dormência, causando dificuldades no processo de estabelecimento. Também foi nessa altura que ocorreram maiores taxas de contaminações, obrigando a haver maior tempo de desinfeção, conseqüentemente a maior taxa de necroses. Para reduzir a taxa de necrose e produção de fenóis nos meios recorreu-se à utilização de ácido ascórbico como antioxidante, por meio de imersão após a desinfeção e, durante os primeiros dias de estabelecimento as culturas passavam mais tempo em períodos em regime de obscuridade.

A micropropagação não oferece tão bons resultados em espécies florestais quando comparado com espécies herbáceas. Para reduzir as dificuldades de estabelecimento deve-se seleccionar material fisiologicamente juvenil ou fazer um resgate de matrizes recorrendo a técnicas de estacaria ou enxertia (Alfenas *et al.*, 2004). Outra dificuldade em estabelecer plantas lenhosas é a frequência de ocorrerem contaminações. Explantes provenientes de

enxertia ou estacaria auxiliam no sucesso da desinfecção por permanecerem em ambientes protegidos e controlados (Fick, 2007).

Depois dos explantes serem desinfetados, o isolamento é realizado em uma câmara de fluxo laminar para garantir que a manipulação seja feita em condições assépticas. A manipulação exige perícia e rapidez para evitar a desidratação do explante. Em espécies lenhosas é comum haver oxidação nos explantes após repicagem, isso se deve a acumulação de fenóis na zona do corte. Os fenóis modificam a composição do meio de cultura e dificultam a absorção de nutrientes. Substâncias como o ácido ascórbico ou ácido cítrico e carvão ativado são adicionados aos meios de cultura de forma a reduzir a liberação de fenóis. A concentração dessas substâncias varia com a espécie (Grattapaglia *et al.*, 1998).

A liberação de fenóis pode levar à oxidação dos explantes e posterior necrose. Para reduzir este efeito podem ser utilizados diferentes métodos: adição de anti-oxidantes ao meio de cultura; adição de carvão ativado e ainda repicagens frequentes e colocar os explantes em regime de obscuridade por curto período (Chawa, 2009).

4.2 Multiplicação

O segundo objetivo deste trabalho consistiu em identificar as composições nutritivas e concentrações hormonais mais favoráveis ao desenvolvimento dos clones. Foi analisada a capacidade de multiplicação *in vitro* dos clones estabelecidos através da avaliação do efeito dos fatores ou variáveis independentes: meio de cultura e concentração de BAP nos variáveis dependentes, observados através dos seguintes parâmetros: taxa de sobrevivência; comprimento do maior rebento; número de rebentos; presença de *callus*; presença de vitrificação; presença de clorose; evolução e crescimento; número de segmentos viáveis. Foi também estudado o efeito do fator genótipo Clone na multiplicação das culturas, através dos parâmetros referidos.

De seguida apresentam-se os resultados obtidos para cada um destes fatores.

4.2.1 Taxa de sobrevivência

A Anova mostra a não existência de diferenças significativas, isto é, que a variável CNS não é dependente do meio de cultura testado (Anexo 7; Tabela 1). Os valores médios CNS dos três diferentes meios (Tabela 2), apresentam valores muito próximos de 2 (indicador

de sobrevivência), e, estatisticamente, não existem diferenças significativas entre eles. Assim, verificou-se que **a taxa de sobrevivência do clone não depende do meio de cultura em que está inserido.**

Tabela 2- Valores observados da variável CNS* em função do fator Meio de cultura.

<i>Meio</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
GD	1,989	\pm	0,0059 ^a	523
MS	1,986	\pm	0,0040 ^a	850
MS/2	1,988	\pm	0,0054 ^a	406

*Variável CNS (C – contaminado – 0; N – necrosado – 1; S – sobrevivente – 2)

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável CNS é dependente da concentração de citocinina BAP testada (Aenxo 8; Tabela 1). Os valores médios CNS para as três diferentes concentrações de BAP (Tabela 3), apresentam valores próximos de 2. No entanto, a concentração BAP 2,22 μM é estatisticamente diferente das BAP 0,45 μM e BAP 0,89 μM . Verificou-se que a uma concentração de 2,22 μM de BAP os explantes apresentam uma taxa de sobrevivência menor. Em relação às concentrações de 0,45 μM e de 0,89 μM , com diferenças significativas.

Tabela 3- Valores observados da variável CNS* em função da concentração de BAP.

<i>Meio μM</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
BAP 0,45	1,984	\pm	0,0079 ^a	250
BAP 0,89	1,988	\pm	0,0028 ^a	1493
BAP 2,22	1,876	\pm	0,0584 ^b	36

*Variável CNS (C – contaminado – 0; N – necrosado – 1; S – sobrevivente – 2)

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável CNS é dependente do fator genético Clone (Anexo 9; Tabela 1). Os valores médios CNS dos trinta diferentes clones (Tabela 4), apresentam valores muito próximos de 2 (indicador de sobrevivência), e, estatisticamente, existem diferenças significativas entre eles. Assim verifica-se que para os trinta clones testados os genótipos SC41 e SC22 apresentaram resultados significativamente diferentes, isto é, com uma maior presença de necroses.

Tabela 4 - Valores observados da variável CNS* em função do fator Clone.

Clone	Média	±	Erro Padrão	N	Clone	Média	±	Erro Padrão	N
SC41	1,600	±	0,1309 ^c	15	SM919	2,000	±	0,0000 ^a	103
SC22	1,853	±	0,0616 ^b	34	SC19	2,000	±	0,0000 ^a	83
SC55	1,925	±	0,0422 ^a	40	SC903	2,000	±	0,0000 ^a	23
SC57	1,938	±	0,0435 ^a	32	SM30	2,000	±	0,0000 ^a	50
SC43	1,941	±	0,0588 ^a	17	SM37	2,000	±	0,0000 ^a	8
SC01	1,969	±	0,0219 ^a	64	SM906	2,000	±	0,0000 ^a	100
SC51	1,982	±	0,0181 ^a	55	SM21	2,000	±	0,0000 ^a	33
SM901	1,983	±	0,0169 ^a	59	SM908	2,000	±	0,0000 ^a	10
SC919	1,984	±	0,0092 ^a	191	SC46	2,000	±	0,0000 ^a	42
SM904	1,984	±	0,0109 ^a	129	SC918	2,000	±	0,0000 ^a	65
SC24	1,994	±	0,0058 ^a	170	SC914	2,000	±	0,0000 ^a	196
SC915	2,000	±	0,0000 ^a	4	SC09	2,000	±	0,0000 ^a	24
SM16	2,000	±	0,0000 ^a	12	SC912	2,000	±	0,0000 ^a	34
SC36	2,000	±	0,0000 ^a	9	SC32	2,000	±	0,0000 ^a	95
SC916	2,000	±	0,0000 ^a	34	SC904	2,000	±	0,0000 ^a	48

*Variável CNS (C – contaminado – 0; N – necrosado – 1; S – sobrevivente – 2)

Valores (média ± SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

4.2.2 Evolução e Crescimento dos clones

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável NAPB é dependente do meio de cultura (Anexo 7; Tabela 2). O meio GD é estatisticamente diferente dos meios MS e MS/2. Verificou-se que no meio GD os explantes apresentam uma taxa de evolução e crescimento maior, isto é, observa-se um maior número de explantes em proliferação. Em relação aos meios MS e MS/2, não existem diferenças estatisticamente significativas. Os valores médios indicam que os explantes nestes meios de cultura tanto manifestam alongamento como a proliferação dos rebentos (Tabela 4).

Tabela 5 – Valores observados da variável NAPB* em função do fator Meio de cultura.

<i>Meio</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
GD	1,876	\pm	0,0463 ^a	523
MS	1,592	\pm	0,0304 ^b	850
MS/2	1,548	\pm	0,0415 ^b	406

*Variável NAPB (N – nenhum desenvolvimento – 0; A – alongamento – 1; P – proliferou – 2; B – ambos - 3)

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável NAPB é dependente da Concentração da citocinina BAP testada (Anexo 8; Tabela 2). A concentração BAP 2,22 μM é estatisticamente diferente das BAP 0,45 μM e BAP 0,89 μM . Verificou-se que a uma concentração de 2,22 μM de BAP os explantes apresentam uma taxa evolução e crescimento muito baixa. Em relação às concentrações de 0,45 μM e de 0,89 μM , também apresentam diferenças estatisticamente significativas, sendo que BAP 0,89 μM proporciona aos clones um maior alongamento e proliferação do que BAP 0,45 μM (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores observados da variável NAPB* em função da concentração de BAP.

<i>Meio μM</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
BAP 0,45	1,240	\pm	0,0412 ^b	250
BAP 0,89	1,764	\pm	0,0244 ^a	1493
BAP 2,22	0,500	\pm	0,1464 ^c	36

*Variável NAPB (N – nenhum desenvolvimento – 0; A – alongamento – 1; P – proliferou – 2; B – ambos - 3)

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável NAPB é dependente do fator Clone (Anexo 9; Tabela 2). Os clones são todos estatisticamente diferentes entre si. Verificou-se que o clone SC912 apresenta explantes com uma taxa de evolução e um crescimento maior, isto é, observa-se maior quantidade de explantes em

proliferação. Em relação aos restantes clones, existem ainda diferenças estatisticamente significativas, sendo que o clone que apresenta menor taxa de proliferação é o clone SC41. Os valores médios indicam que os clones tanto manifestam alongamento como a proliferação dos rebentos (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores observados da variável NAPB* em função do fator Clone.

<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>	<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
SC41	0,000	\pm	0,0000 ^h	15	SC19	1,614	\pm	0,0763 ^{a-e}	83
SC22	0,735	\pm	0,1651 ^g	34	SC46	1,619	\pm	0,1522 ^{a-e}	42
SC57	0,937	\pm	0,1735 ^{fg}	32	SC36	1,666	\pm	0,2886 ^{a-e}	9
SC01	1,250	\pm	0,1044 ^{e-g}	64	SC43	1,705	\pm	0,2679 ^{a-e}	17
SM37	1,375	\pm	0,1829 ^{d-f}	8	SC09	1,791	\pm	0,1994 ^{a-e}	24
SC51	1,418	\pm	0,1236 ^{d-f}	55	SC919	1,837	\pm	0,0655 ^{a-e}	191
SC916	1,470	\pm	0,1535 ^{c-f}	34	SM30	1,840	\pm	0,0826 ^{a-e}	50
SC55	1,475	\pm	0,1600 ^{c-f}	40	SM908	1,900	\pm	0,1000 ^{a-d}	10
SM906	1,480	\pm	0,8224 ^{c-f}	100	SC918	1,907	\pm	0,1195 ^{a-d}	65
SC915	1,500	\pm	0,5000 ^{c-f}	4	SM904	1,914	\pm	0,0866 ^{a-d}	129
SM16	1,500	\pm	0,2302 ^{c-f}	12	SC904	2,062	\pm	0,1377 ^{a-c}	48
SC32	1,505	\pm	0,0817 ^{c-f}	95	SM21	2,090	\pm	0,1467 ^{a-c}	33
SM901	1,559	\pm	0,1061 ^{b-e}	59	SC903	2,173	\pm	0,1739 ^{ab}	23
SC914	1,581	\pm	0,0646 ^{b-e}	196	SM919	2,174	\pm	0,0919 ^{ab}	103
SC24	1,605	\pm	0,0695 ^{a-e}	170	SC912	2,205	\pm	0,1677 ^a	34

*Variável NAPB (N – nenhum desenvolvimento – 0; A – alongamento – 1; P – proliferou – 2; B – ambos - 3)

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Os clones apresentam maior taxa de multiplicação do que seu valor de **NAPB** for próximo de 1 por alongamento ou de 3 por alongamento e proliferação dos rebentos.

4.2.3 Capacidade de proliferação das culturas dos diferentes clones

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável NR é dependente do meio de cultura testado (Anexo 7; Tabela 3). Os valores médios consoante ao número de rebentos registados nos três diferentes meios, estão representadas na Tabela 8. O meio MS/2 é estatisticamente diferente dos meios MS e GD, apresentando resultados mais baixos. Verificou-se que no meio GD os explantes apresentam a maior taxa de rebentos, mas em relação ao meio MS, não existem diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 8 – Valores observados da variável NR (número de rebento) em função do fator Meio de cultura.

<i>Meio</i>	<i>Media</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
GD	1,291	\pm	0,0690 ^b	523
MS	1,173	\pm	0,0496 ^b	850
MS/2	0,938	\pm	0,0967 ^a	406

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável NR é dependente da concentração da citocinina BAP (Anexo 8; Tabela 3). Os valores médios consoante ao número de rebentos registados para as três diferentes concentrações de BAP, representadas na Tabela 9, apresentam valores distintos. A concentração BAP 2,22 μM é estatisticamente diferente das BAP 0,45 μM e BAP 0,89 μM . Verificou-se que a uma concentração de 2,22 μM de BAP os explantes apresentam um número de rebentos muito baixo, podendo ser justificada pelo facto de haver menor número de amostra estudada. Em relação às concentrações de 0,45 μM e de 0,89 μM , não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 9- Valores observados da variável NR (número de rebentos) em função da concentração de BAP.

<i>Meio μM</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
BAP 0,45	0,828	\pm	0,0663 ^a	250
BAP 0,89	1,232	\pm	0,0438 ^a	1493
BAP 2,22	0,194	\pm	0,1040 ^b	36

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável NR é dependente do fator Clone (Anexo 9; Tabela 3). O valor médio relativo ao número de rebentos registados nos trinta diferentes clones é apresentado na Tabela 10. O clone SM919 é estatisticamente diferente de diversos clones, apresentando os melhores resultados. Verificou-se que os clones SC41 e SC915 são os clones que apresentam menor número de rebentos.

Tabela 10 - Valores observados da variável NR (número de rebentos) em função do fator Clone.

<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>	<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
SC41	0,000	\pm	0,0000 ⁱ	15	SC914	0,941	\pm	0,0977 ^{c-i}	196
SC915	0,000	\pm	0,0000 ⁱ	4	SC918	1,000	\pm	0,2111 ^{c-i}	65
SM37	0,250	\pm	0,2500 ^{hi}	8	SC51	1,036	\pm	0,1681 ^{c-i}	55
SC57	0,281	\pm	0,1207 ^{hi}	32	SC55	1,050	\pm	0,2023 ^{c-h}	40
SC22	0,294	\pm	0,1233 ^{hi}	34	SC46	1,086	\pm	0,2203 ^{c-h}	42
SM16	0,333	\pm	0,2562 ^{g-i}	12	SM904	1,095	\pm	0,1308 ^{b-h}	129
SM901	0,390	\pm	0,1601 ^{f-i}	59	SC01	1,230	\pm	0,1212 ^{a-h}	64
SC19	0,554	\pm	0,0988 ^{e-i}	83	SC904	1,333	\pm	0,2154 ^{a-g}	48
SC36	0,666	\pm	0,3726 ^{e-i}	9	SC912	1,382	\pm	0,1889 ^{a-g}	34
SC09	0,673	\pm	0,2624 ^{e-i}	24	SC903	1,434	\pm	0,3003 ^{a-f}	23
SC32	0,673	\pm	0,1283 ^{e-i}	95	SM908	1,500	\pm	0,4281 ^{a-e}	10
SC916	0,676	\pm	0,1726 ^{e-i}	34	SC919	1,822	\pm	0,1967 ^{a-d}	191
SM906	0,710	\pm	0,1085 ^{d-i}	100	SM30	2,020	\pm	0,2109 ^{a-c}	50
SC24	0,905	\pm	0,0945 ^{d-i}	170	SM21	2,212	\pm	0,3220 ^{ab}	33
SC43	0,941	\pm	0,3147 ^{c-i}	17	SM919	2,300	\pm	0,1766 ^a	103

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

4.2.4 Comprimento do maior rebento

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável CM é dependente do meio de cultura testado (Anexo 7; Tabela 4). Os valores médios expressas em milímetro medidas nos três diferentes meios, estão representadas na Tabela 11. O meio MS/2 é estatisticamente diferente dos meios MS e GD, apresentando os melhores resultados. Verificou-se que no meio GD os explantes apresentam os rebentos de menor comprimento, e mesmo em relação ao meio MS, existem diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 11 – Valores observados da variável CM em função do fator Meio de cultura.

<i>Meio</i>	<i>Média (mm)</i>	<i>±</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
GD	9,773	±	0,2677 ^c	523
MS	15,315	±	0,2828 ^b	850
MS/2	23,374	±	0,6256 ^a	406

Valores (média ± SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável CM depende da concentração da citocinina BAP (Anexo 8; Tabela 4). Os valores médios do comprimento do maior rebento obtido para as três diferentes concentrações de BAP, são apresentadas na Tabela 12. A concentração BAP 2,22 μM é estatisticamente diferente das BAP 0,45 μM e BAP 0,89 μM . Verificou-se que a uma concentração de 2,22 μM de BAP os explantes apresentam uma taxa de crescimento demasiado baixa. Em relação às concentrações de 0,45 μM e de 0,89 μM , são apresentadas diferenças estatisticamente significativas, sendo BAP 0,45 μM o que apresenta o maior crescimento dos rebentos.

Tabela 12 – Valores observados da variável CM em função da concentração de BAP.

<i>Meio μM</i>	<i>Média (mm) \pm Erro Padrão</i>	<i>N</i>
BAP 0,45	24,356 \pm 0,7466 ^a	250
BAP 0,89	14,341 \pm 0,2343 ^b	1493
BAP 2,22	3,333 \pm 0,2182 ^c	36

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável CM é dependente do fator Clone (Anexo 9; Tabela 4). Os valores médios expressas em milímetro, medidas nos três diferentes meios, estão representadas na Tabela 13. O clone SC24 foi o que apresentou o melhor valor médio, com diferenças significativas de diversos clones. Verificou-se que o clone SC41 apresentou rebentos de comprimento com diferenças significativa a diversos clones.

Tabela 13 - Valores observados da variável CM em função do fator Clone.

<i>Clone</i>	<i>Média \pm Erro Padrão</i>	<i>N</i>	<i>Clone</i>	<i>Média \pm Erro Padrão</i>	<i>N</i>
SC41	2,000 \pm 0,4253 ^o	15	SM37	13,125 \pm 2,4233 ^{d-l}	8
SC915	4,500 \pm 0,6454 ^{no}	4	SM919	13,126 \pm 0,7962 ^{d-l}	103
SM16	4,750 \pm 0,3916 ^{m-o}	12	SC43	13,529 \pm 2,1644 ^{c-k}	17
SC36	6,888 \pm 0,6549 ^{l-o}	9	SM901	15,000 \pm 0,8457 ^{b-j}	59
SC22	7,264 \pm 1,7384 ^{k-o}	34	SM906	15,260 \pm 0,9510 ^{a-i}	100
SM908	8,100 \pm 0,9363 ^{k-n}	10	SC46	15,880 \pm 1,1841 ^{a-h}	42
SM30	8,680 \pm 0,3837 ^{j-n}	50	SC55	17,525 \pm 2,5737 ^{a-g}	40
SC57	9,062 \pm 1,5026 ⁱ⁻ⁿ	32	SC904	17,729 \pm 1,4853 ^{a-g}	48
SM21	9,939 \pm 0,7083 ^{h-n}	33	SC918	18,446 \pm 1,4672 ^{a-f}	65
SC916	10,117 \pm 0,8993 ^{h-n}	34	SC32	18,810 \pm 1,0022 ^{a-e}	95
SC01	10,890 \pm 0,9444 ^{h-m}	64	SC09	19,041 \pm 2,0390 ^{a-d}	24
SC19	11,951 \pm 0,6750 ^{g-l}	83	SC51	19,245 \pm 1,5515 ^{a-d}	55
SC903	12,217 \pm 0,8912 ^{f-l}	23	SC914	19,647 \pm 0,8230 ^{a-c}	196
SC919	12,570 \pm 0,3743 ^{e-l}	191	SM904	20,023 \pm 1,0272 ^{ab}	129
SC912	13,088 \pm 0,6707 ^{d-l}	34	SC24	21,529 \pm 0,8625 ^a	170

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

4.2.5 Número de segmentos utilizados na multiplicação

A Anova apresenta diferenças significativas, isto é, que a variável NS é dependente do meio de cultura testado (Anexo 7; Tabela 5). Os valores médios observadas quanto ao número de segmentos nos três diferentes meios, estão representadas na Tabela 14. O meio MS/2 é estatisticamente diferente dos meios MS e GD, apresentando resultados superiores. Verificou-se que no meio MS os explantes apresentam menos segmentos, embora em relação ao meio GD, não existem diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 14 – Valores observados da variável NS em função do fator Meio.

<i>Meio</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
GD	1,434	\pm	0,0373 ^b	523
MS	1,420	\pm	0,0264 ^b	850
MS/2	1,583	\pm	0,0461 ^a	406

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável NS é dependente da concentração da citocinina BAP (Anexo 8; Tabela 5). Os valores médios dos segmentos com dimensões suficiente para serem multiplicados foram registrados para as três diferentes concentrações de BAP e, estão representadas na Tabela 15. A concentração BAP 2,22 μM é estatisticamente inferior aos observados em BAP 0,45 μM e BAP 0,89 μM . Em relação às concentrações de 0,45 μM e de 0,89 μM , não são apresentadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 15 – Valores observados da variável NS em função da concentração de BAP.

<i>Meio μM</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
BAP 0,45	1,336	\pm	0,0453 ^a	250
BAP 0,89	1,494	\pm	0,0222 ^a	1493
BAP 2,22	0,972	\pm	0,0485 ^b	36

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova apresenta diferenças significativas, isto é, que a variável NS é dependente do fator Clone (Anexo 9; Tabela 5). Os valores médios observadas quanto ao número de segmentos nos trinta clones, estão representadas na Tabela 16. O clone SM30 é estatisticamente diferente de diversos clones, apresentando resultados mais satisfatórios. Verificou-se que no clone SC41 os explantes apresentam menos segmentos, apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação a diversos clones.

Tabela 16 - Valores observados da variável NS em função do fator Clone.

<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>	<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
SC41	0,600	\pm	0,1309 ^h	15	SM901	1,440	\pm	0,1033 ^{a-g}	59
SC22	0,970	\pm	0,0989 ^{gh}	34	SC24	1,458	\pm	0,0584 ^{a-g}	170
SC915	1,000	\pm	0,0000 ^{f-h}	4	SC46	1,500	\pm	0,1415 ^{a-g}	42
SM16	1,000	\pm	0,0000 ^{f-h}	12	SC914	1,500	\pm	0,0598 ^{a-g}	196
SC36	1,111	\pm	0,1111 ^{e-h}	9	SC918	1,523	\pm	0,1183 ^{a-g}	65
SM37	1,125	\pm	0,1250 ^{e-g}	8	SC43	1,529	\pm	0,3105 ^{a-g}	17
SC57	1,156	\pm	0,1014 ^{d-g}	32	SC912	1,529	\pm	0,1054 ^{a-g}	34
SC19	1,156	\pm	0,0401 ^{d-g}	83	SC55	1,575	\pm	0,1596 ^{a-f}	40
SC916	1,176	\pm	0,0663 ^{d-g}	34	SC903	1,652	\pm	0,1734 ^{a-e}	23
SC01	1,234	\pm	0,0825 ^{c-g}	64	SC904	1,687	\pm	0,1493 ^{a-e}	48
SM906	1,300	\pm	0,0659 ^{b-g}	100	SC09	1,708	\pm	0,2126 ^{a-d}	24
SM908	1,300	\pm	0,1527 ^{b-g}	10	SM904	1,728	\pm	0,0939 ^{a-d}	129
SC32	1,336	\pm	0,0757 ^{a-g}	95	SM21	1,787	\pm	0,1833 ^{a-c}	33
SC51	1,400	\pm	0,1148 ^{a-g}	55	SM919	1,834	\pm	0,0986 ^{ab}	103
SC919	1,408	\pm	0,0493 ^{a-g}	191	SM30	1,880	\pm	0,1359 ^a	50

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

4.2.6 Existência de *Callus*

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável *callus* é dependente do meio de cultura testado (Anexo 7; Tabela 6). Os valores médios da presença de *callus* dos três diferentes meios estão representadas na Tabela 17. Observa-se que o meio GD é estatisticamente diferente dos meios MS e MS/2, por apresentar a média significativamente mais alta entre os meios testados, isto é, com maior formação de *callus*. Em relação aos meios MS e MS/2, existem diferenças estatisticamente significativas, sendo o meio MS/2 o que apresenta menor presença de *callus*.

Tabela 17 – Valores observados da variável *callus* em função do fator Meio.

<i>Meio</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
GD	1,087	\pm	0,0615 ^c	523
MS	0,385	\pm	0,0241 ^b	850
MS/2	0,256	\pm	0,0255 ^a	406

Presença de *Callus* 0-5.

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável *callus* é dependente da concentração da citocinina BAP testada (Anexo 8; Tabela 6). Os valores médios de presença de *callus* para as três diferentes concentrações de BAP estão representadas na Tabela 18. A concentração BAP 0,45 μM é estatisticamente diferente das BAP 2,22 μM e BAP 0,89 μM . Verificou-se que a uma concentração de 0,45 μM de BAP os explantes apresentam uma menor taxa de presença de *callus*. Em relação às concentrações de 2,22 μM e de 0,89 μM , não são apresentadas diferenças estatisticamente significativas, mas observa-se que em BAP 0,89 μM os clones apresentam menor taxa de *callus* do que em BAP 2,2 μM .

Tabela 18 – Valores observados da variável *callus* em função da concentração de BAP.

<i>Meio</i> μM	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
BAP 0,45	0,340	\pm	0,0330 ^a	250
BAP 0,89	0,525	\pm	0,0232 ^b	1493
BAP 2,22	3,638	\pm	0,2617 ^b	36

Presença de *Callus* 0-5.

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável *callus* é dependente do fator Clone (Anexo 9; Tabela 6). Os valores médios da presença de *callus* nos trinta diferentes clones estão representadas na Tabela 19. Observa-se que os clones SC41

e SC22 são estatisticamente diferente dos restantes clones por apresentar a média significativamente mais alta entre os clones, isto é, com maior formação de *callus*. Comparando o clone SC919 com os restantes clones, pode-se referir que existem diferenças estatisticamente significativas, sendo o Clone SC919 o que apresentou uma menor presença de *callus*.

Tabela 19 - Valores observados da variável *callus* em função do fator Clone.

<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>	<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
SC919	0,0052	\pm	0,0052 ¹	191	SC46	0,5476	\pm	0,1141 ^{c-1}	42
SC36	0,1111	\pm	0,1111 ^{hi}	9	SM904	0,5969	\pm	0,0665 ^{c-h}	129
SC912	0,1176	\pm	0,0561 ^{hi}	34	SM37	0,6250	\pm	0,2631 ^{c-h}	8
SC09	0,1667	\pm	0,0777 ^{hi}	24	SC19	0,6265	\pm	0,0742 ^{c-h}	83
SC914	0,1786	\pm	0,0318 ^{g-i}	196	SC57	0,7188	\pm	0,2020 ^{c-g}	32
SC32	0,1895	\pm	0,0456 ^{g-i}	95	SC915	0,7500	\pm	0,7500 ^{c-f}	4
SC904	0,2083	\pm	0,0592 ^{g-i}	48	SM908	0,8000	\pm	0,1333 ^{c-e}	10
SC916	0,2353	\pm	0,0950 ^{f-i}	34	SC01	0,8281	\pm	0,1615 ^{c-d}	64
SC918	0,2615	\pm	0,0631 ^{e-i}	65	SC51	0,9818	\pm	0,1310 ^c	55
SM906	0,3200	\pm	0,0566 ^{d-i}	100	SM30	1,7200	\pm	0,1341 ^b	50
SC903	0,3478	\pm	0,1350 ^{d-i}	23	SM16	1,8333	\pm	0,1667 ^b	12
SC43	0,3529	\pm	0,1195 ^{d-i}	17	SM21	2,0909	\pm	0,2588 ^b	33
SM901	0,4068	\pm	0,0645 ^{d-i}	59	SC55	2,1000	\pm	0,2552 ^b	40
SM919	0,4951	\pm	0,0754 ^{c-i}	103	SC22	2,7059	\pm	0,3495 ^a	34
SC24	0,5176	\pm	0,0549 ^{c-i}	170	SC41	2,8667	\pm	0,5333 ^a	15

Presença de *Callus* 0-5.

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

4.2.7 Existência de Vitrificação

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável vitrificação é dependente do meio de cultura testado (Anexo 7; Tabela 7). Os valores médios da presença vitrificação dos três diferentes meios estão representadas na Tabela 20. Observa-se que o meio MS/2 é estatisticamente diferente dos meios MS e GD, por apresentar a média significativamente mais alta entre os meios. Em relação aos meios MS e GD, existem diferenças estatisticamente significativas, sendo o meio GD o que apresenta uma menor presença de vitrificação.

Tabela 20 – Valores observados da variável vitrificação em função do fator Meio.

<i>Meio</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
GD	0,063	\pm	0,0125 ^a	523
MS	0,291	\pm	0,0193 ^b	850
MS/2	0,371	\pm	0,0304 ^c	406

Presença de vitrificação 0-3

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável vitrificação é dependente da concentração da citocinina BAP (Anexo 8; Tabela 7). Os valores médios de presença de vitrificação para as três diferentes concentrações de BAP estão representadas na Tabela 21. A concentração BAP 0,45 μM é estatisticamente diferente das BAP 2,22 μM e BAP 0,89 μM . Verificou-se que a uma concentração de 0,45 μM de BAP os explantes apresentam uma maior taxa de vitrificação. Em relação às concentrações de 2,22 μM e de 0,89 μM , são apresentadas diferenças estatisticamente significativas, uma vez que em BAP 2,22 μM os clones não apresentaram sinais de vitrificação.

Tabela 21 - Valores observados da variável vitrificação em função da concentração de BAP.

<i>Meio μM</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
BAP 0,45	0,408	\pm	0,0393 ^c	250
BAP 0,89	0,221	\pm	0,0131 ^b	1493
BAP 2,22	0,000	\pm	0,0000 ^a	36

Presença de vitrificação 0-3

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável vitrificação é dependente do fator clone (Anexo 9; Tabela 7). Os valores médios da presença de vitrificação nos trinta diferentes clones estão representados na Tabela 22. Observa-se

que os clones SM37 e SM21 são estatisticamente diferente por apresentar a média significativamente mais alta entre os clones. Em relação aos clones SC41, SC915, SM16, SC36, SC09 e SC43 existem diferenças estatisticamente significativas, sendo que nestes clones nunca foi observada a presença de vitrificação. No entanto, pela formação de grupos homogêneos sem diferenças significativas entre si. Verifica-se que a presença de *callus* foi muito mais impeditiva a multiplicação das culturas do que a Vitrificação.

Tabela 22 - Valores observados da variável vitrificação em função do fator Clone.

<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>	<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
SC41	0,000	\pm	0,0000 ^f	15	SM901	0,118	\pm	0,0425 ^{d-f}	59
SC915	0,000	\pm	0,0000 ^f	4	SC32	0,126	\pm	0,0403 ^{d-f}	95
SM16	0,000	\pm	0,0000 ^f	12	SC19	0,156	\pm	0,0499 ^{d-f}	83
SC36	0,000	\pm	0,0000 ^f	9	SC912	0,176	\pm	0,0664 ^{d-f}	34
SC09	0,000	\pm	0,0000 ^f	24	SC919	0,235	\pm	0,0342 ^{d-f}	191
SC43	0,000	\pm	0,0000 ^f	17	SM904	0,302	\pm	0,0523 ^{d-f}	129
SC01	0,015	\pm	0,0156 ^f	64	SC914	0,316	\pm	0,0410 ^{d-f}	196
SC22	0,029	\pm	0,0294 ^f	34	SM30	0,320	\pm	0,0779 ^{d-f}	50
SC57	0,031	\pm	0,0313 ^f	32	SC24	0,347	\pm	0,0495 ^{d-f}	170
SC55	0,075	\pm	0,0422 ^{ef}	40	SM906	0,350	\pm	0,0575 ^{d-f}	100
SC904	0,083	\pm	0,0403 ^{d-f}	48	SM919	0,388	\pm	0,0573 ^{de}	103
SC903	0,087	\pm	0,0601 ^{d-f}	23	SC918	0,430	\pm	0,0820 ^{cd}	65
SC916	0,088	\pm	0,0494 ^{d-f}	34	SM908	0,700	\pm	0,2134 ^{bc}	10
SC51	0,090	\pm	0,0596 ^{d-f}	55	SM21	0,939	\pm	0,1439 ^{ab}	33
SC46	0,095	\pm	0,0571 ^{d-f}	42	SM37	1,000	\pm	0,3780 ^a	8

Presença de vitrificação 0-3

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

4.2.8 Existência de Cloroses

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável clorose é dependente do meio de cultura testado (Anexo 7; Tabela 8). Os valores médios de presença de clorose dos três diferentes meios estão representados na Tabela 23. Observa-se que o meio MS/2 é estatisticamente diferente dos meios MS e GD, por apresentar a média significativamente mais baixa entre os meios. Em relação aos meios MS e GD, existem diferenças estatisticamente significativas, sendo o meio GD o que apresenta maior presença de clorose.

Tabela 23 - Valores observados da variável clorose em função do fator Meio.

<i>Meio</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
GD	0,219	\pm	0,0232 ^c	523
MS	0,168	\pm	0,0143 ^b	850
MS/2	0,012	\pm	0,0054 ^a	406

Presença de Clorose 0-3.

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável clorose é dependente da concentração da citocinina BAP (Anexo 8; Tabela 8). Os valores médios de existência de clorose para as três diferentes concentrações de BAP estão representadas na Tabela 24. A concentração BAP 0,45 μ M apresenta resultados nulos quanto a presença de clorose nos explantes. Verificou-se que a uma concentração de 0,89 μ M de BAP os explantes apresentam uma maior taxa de vitrificação, embora seja estatisticamente semelhante aos resultados de 0,45 μ M de BAP. Em relação às concentrações de 2,22 μ M e de 0,89 μ M, não são apresentadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 24 - Valores observados da variável clorose em função da concentração de BAP.

<i>Meio μM</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
BAP 0,45	0,000	\pm	0,000 ^a	250
BAP 0,89	0,174	\pm	0,011 ^{ab}	1943
BAP 2,22	0,055	\pm	0,055 ^b	36

Presença de Clorose 0-3.

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A Anova mostra a existência de diferenças significativas, isto é, que a variável clorose é dependente do fator Clone (Anexo 9; Tabela 8). Os valores médios da presença clorose dos três diferentes meios estão representados na Tabela 25. Observa-se que o clone SM37 é estatisticamente diferente dos restantes clones, por apresentar a média significativamente

mais alta. Relativamente a um grupo reduzido de clones (SC41, SC915 e SM908), existem diferenças estatisticamente significativas, sendo que esses clones não apresentam a presença de clorose.

Tabela 25 - Valores observados da variável clorose em função do fator Clone.

<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>	<i>Clone</i>	<i>Média</i>	\pm	<i>Erro Padrão</i>	<i>N</i>
SC41	0,000	\pm	0,0000 ^d	15	SC24	0,123	\pm	0,0303 ^{b-d}	170
SC915	0,000	\pm	0,0000 ^d	4	SC57	0,125	\pm	0,0745 ^{b-d}	32
SM908	0,000	\pm	0,0000 ^d	10	SC19	0,156	\pm	0,0436 ^{b-d}	83
SM30	0,020	\pm	0,0200 ^d	50	SM906	0,170	\pm	0,0473 ^{b-d}	100
SC918	0,046	\pm	0,0262 ^{c-d}	65	SC903	0,173	\pm	0,1356 ^{b-d}	23
SC55	0,050	\pm	0,0349 ^{c-d}	40	SC43	0,176	\pm	0,1282 ^{b-d}	17
SC22	0,058	\pm	0,0410 ^{c-d}	34	SC916	0,205	\pm	0,0821 ^{b-d}	34
SM16	0,083	\pm	0,0833 ^{b-d}	12	SM901	0,237	\pm	0,0739 ^{b-d}	59
SM919	0,087	\pm	0,0312 ^{b-d}	103	SC46	0,238	\pm	0,0821 ^{b-d}	42
SC912	0,088	\pm	0,0495 ^{b-d}	34	SM21	0,242	\pm	0,1154 ^{b-d}	33
SC919	0,089	\pm	0,0207 ^{b-d}	191	SC51	0,290	\pm	0,0807 ^{b-d}	55
SC914	0,091	\pm	0,0219 ^{b-d}	196	SC09	0,333	\pm	0,1433 ^{bc}	24
SC904	0,104	\pm	0,0446 ^{b-d}	48	SC32	0,357	\pm	0,0578 ^b	95
SM904	0,108	\pm	0,0296 ^{b-d}	129	SC01	0,359	\pm	0,0717 ^b	64
SC36	0,111	\pm	0,1111 ^{b-d}	9	SM37	0,625	\pm	0,3239 ^a	8

Presença de Clorose 0-3.

Valores (média \pm SE) seguidos por letras diferentes, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

4.2.9 Visão Global da Multiplicação

A análise fatorial dos componentes principais da fase de multiplicação explica 52% da variância total observada, de acordo com os fatores 1 a 3 (Tabela 26; Figura X), num total de onze variáveis.

De acordo com a Tabela 26, há a referir o seguinte: o fator 1 explica 21,2% da variância total e está associado ao NS com um coeficiente (b) de 0,70, número de rebentos (NR; b=0,61) e variável NAPB (b=0,63). O fator 2 explica 19,5% da variância e associa as variáveis: meio de cultura (b=-0,65), BAP (b=-0,57) e CM (b=-0,56). O fator 3 explica 11,5% da variância total observada e está associada ao fator Clone (b=-0,63).

Tabela 26 - Análise fatorial dos componentes principais para as variáveis na multiplicação dos clones.

Variable	Factor Loadings (Unrotated) (mu Extraction: Principal component (Marked loadings are > ,700000)			Eigenvalues (multiplicacao.sta) Extraction: Principal components			
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %
clone	0,36148	-0,11097	-0,63365	2,33236	21,2032	2,33236	21,2032
Meio	0,35944	-0,65242	0,20079	2,14063	19,4603	4,47299	40,6636
BA	0,28545	-0,57077	0,13392	1,26287	11,4806	5,73586	52,1442
callus	-0,47070	0,42652	0,50534				
CNS	0,43777	0,00293	-0,28621				
NAPB	0,63400	0,54754	-0,01827				
NR	0,61165	0,55038	0,18870				
CM	0,48403	-0,55575	0,16402				
NS	0,70732	0,42488	0,24183				
Clorose	-0,08288	0,19831	-0,46029				
Vitrificacao	0,24547	-0,25195	0,36413				
Expl.Var	2,33236	2,14063	1,26287				

A PCA (Figura 3) mostra que o comprimento dos rebentos (CM) está associado ao meio de cultura e à concentração de BAP e por outro lado, o número de segmentos (NS) está associado as variáveis NAPB e NR. Ainda a referir que a presença de *callus* é oposta à proliferação dos rebentos (NS; NAPB; NR) e ao alongamento dos rebentos (CM). O número de segmentos (NS) utilizados na multiplicação das culturas aparece associado às variáveis NR e NAPB, isto é, indica que a multiplicação foi essencialmente realizada pela proliferação das culturas (NR e NAPB) comparativamente ao alongamento dos rebentos (CM).

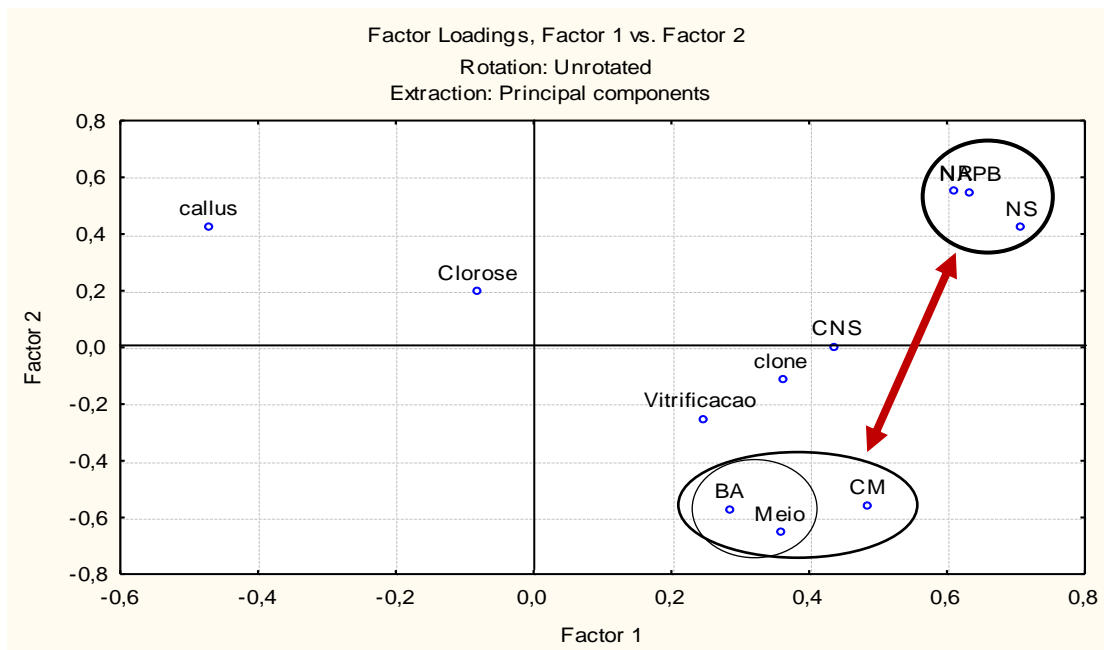


Figura 3 - Análise da influência das variáveis estudadas.

A figura 4 mostra novamente a associação das variáveis CM, Meio de cultura e BAP (Fator 1) e em oposição ao número de rebentos e número de segmentos. A presença de *callus* mostra estar associada ao Clone (Fator 3). Este fato pode explicar a dificuldade observada para alguns clones a proliferação dos rebentos, o seu alongamento e por consequência a multiplicação das culturas e a produção de plantas. Este fato é evidente para os clones SC41 e SC22 que apresentaram diferenças significativas na presença de *callus* relativamente a todos os outros clones testados.

Estes resultados estão de acordo com outros autores que referem que a micropropagação de clones de castanheiro é dependente do genótipo (Gonçalves, 1998; Gonçalves *et al.*, 1998; Seabra e Pais, 1993). Estes resultados indicam que é necessário continuar a otimizar os meios de cultura para um conjunto de genótipos.

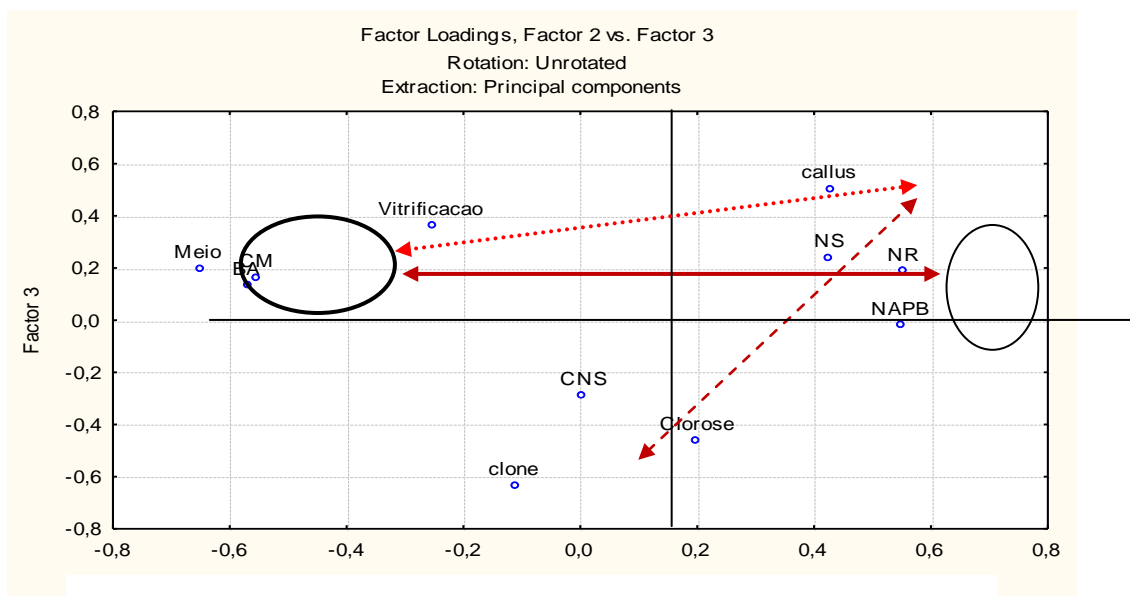


Figura 4 - Influência das variáveis estudadas.

As citocininas são as principais responsáveis pela indução e multiplicação de gomos axilares (Canhoto, 2010). Este fato foi observado na multiplicação dos híbridos de castanheiro. Assim, quando a citocinina foi adicionada em quantidades elevadas ocorreu uma proliferação de gomos axilares exagerada e falta de alongamento. A concentração de citocinina ideal está relacionada com o genótipo e o equilíbrio endógeno de hormonas (Canhoto, 2010; Gonçalves, 1998; Seabra e Pais, 1993). Verificou-se ainda que concentrações elevadas de BAP foram favoráveis ao desenvolvimento de *callus* limitando a multiplicação das culturas.

4.3 Resultados do Enraizamento e Aclimatização

Na fase de enraizamento e aclimatização foram testados três protocolos diferentes: enraizamento *ex vitro* em simultâneo com o processo de aclimatização; enraizamento *in vitro two steps*, caracterizado por duas etapas distintas de indução de enraizamento com auxinas, seguida pelo desenvolvimento das raízes, num meio de cultura sem reguladores de crescimento; neste caso, comparou-se a indução num período curto de tempo com a indução em meio sólido, com menor concentração de auxina, durante um período maior de tempo.

Os resultados na Tabela 27 e figura 5 mostram que os melhores resultados de enraizamento, com diferenças significativas, foram obtidos quando se testou o enraizamento *ex vitro* por *dipping* em simultâneo com a aclimatização. Estes resultados estão de acordo

com os observados por Gonçalves *et al.* (1998), na micropropagação de híbridos de *C. sativa* x *C. crenata*.

Tabela 27 - Valores observados das condições testadas.

Condições Testadas	Média	±	Erro Padrão
<i>Ex vitro</i>	90	±	10% ^a
<i>In vitro Two Steps</i>	77	±	10% ^b
<i>In vitro dipping</i>	69	±	10% ^b

A indução *in vitro* durante sete dias apresentou resultados inferiores de enraizamento, mas não significativamente diferentes dos observados quando se procedeu ao enraizamento *in vitro* por *dipping* (Tabela 27).



Figura 5 - Resultado do enraizamento e aclimatização *ex vitro* (A) e do enraizamento e aclimatização *in vitro* (B).

A figura 5 mostra um melhor desenvolvimento das raízes em condições *ex vitro*.

Assim, estas apresentavam um maior número de raízes e um desenvolvimento superior de raízes secundárias. Estes resultados estão de acordo com os observados por Gonçalves *et al.* (1998), na micropropagação de híbridos de *C. sativa* x *C. crenata*.

A indução de raízes em explantes multiplicados *in vitro* é extremamente difícil em espécies lenhosas comparada com espécies herbáceas (Canhoto, 2010; Grattapaglia *et al.*, 1998; Gonçalves *et al.*, 1998; Seabra e Pais, 1993). O enraizamento se torna mais difícil quando o explante é originado de tecido adulto (Ponte, 1999; Gonçalves, 1998), mas a capacidade de enraizar pode ser recuperada com sucessivas repicagens do material *in vitro* de forma a rejuvenescer o material.

Para a formação de raízes *in vitro* o processo é feito em três fases: indução, iniciação e alongamento da raiz. A utilização da auxina IBA nas duas primeiras fases é importante, contudo pode correr o risco de inibir o alongamento (Canhoto, 2010; Ponte, 1999). A técnica *dipping* foca-se em mergulhar a base do explante numa maior concentração de auxina num curto período de tempo. Pode-se afirmar que a técnica oferece a quantidade de hormonas necessário para iniciar a fase de indução e vai se diluindo no meio em que o rebento foi inserido ao longo do tempo.

O processo de aclimatização em simultâneo com o enraizamento apenas demonstra resultados satisfatório quando existe um controle eficiente das condições ambientais. O enraizamento e aclimatização *ex vitro* demonstrou ser o método mais eficaz, não só porque há melhores resultados (taxa de enraizamento e desenvolvimento das raízes), mas também porque é um método que requer menos tempo, menos mão de obra e menos custos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Relativamente ao primeiro objetivo, que consistia em estabelecer o maior número de clones híbridos de castanheiro existentes nos viveiros da Escola Superior Agrária, foram estabelecidos 30 clones (70% do parque de pés mãe).

Na fase de multiplicação pretendeu-se avaliar a combinação adequada de reguladores de crescimento e nutrientes, para a multiplicação de um maior número de clones. O meio GD apresentou os piores resultados entre os meios testados. Os melhores resultados na taxa de multiplicação, avaliada pelas variáveis NS e CM, foram observados com o meio de cultura MS/2, com diferenças significativas relativamente a MS e GD.

Quando foi testada a concentração de BAP 2,22 μM foi observada uma maior presença de *callus* (com diferenças significativas relativamente às outras duas concentrações testadas). O desenvolvimento de *callus* limitou a multiplicação das culturas. Os melhores resultados na taxa de multiplicação, avaliada pela variável NS, foram observados quando foi testada a concentração de 0,89 μM , sem diferenças significativas de BAP 0,45 μM . No entanto, o maior comprimento dos rebentos foi observado, com diferenças significativas quando foi testada a menor concentração de BAP.

O fator genótipo mostrou ser relevante para a multiplicação das culturas.

No enraizamento os melhores resultados, com diferenças significativas, foram obtidos quando foi testado o enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a aclimatização.

6 BIBLIOGRAFIA

Abreu, C.; 1992. “A hipovirulência como forma de luta natural contra o cancro do castanheiro”. *Revista das Ciências Agrárias*. 15: 167-171pp.

Abreu, C.; 1996. “Castanheiros: uma saudade no futuro?”. *Finisterra*, XXVII, 53-54pp.

Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.; Mafía, R.F.; Assis, T.F.; 2004. “Clonagem e doenças do Eucalipto”. UFV, 442pp.

And: Anderson, W. C. 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 109: 343-347.

Anjos, F.M.; 2003. “Caracterização de populações de castanheiro (*Castanea* spp.) resistentes e suscetíveis à doença da tinta: uma abordagem periférica”. Dissertação de doutoramento, Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, Vila Real.

Bergougnoux, F.; Verlhac, A.; Breisch, H.; Chapa, J., 1978. “Le châtaignier – production et culture”. INVUFLEC, Paris.

Bragança. H.; Simões, S.; Onofre, N.; 2005. “Cancro do castanheiro – dispersão da doença em Portugal. Caso-estudo para determinação de factores de dispersão”. Estação Florestal Nacional, Oeiras.

Canhoto, J.M., 2010. “Biotecnologia Vegetal, da clonagem de plantas à transformação genética.” Imprensa da Universidade de Coimbra.

Carvalho, L., 2005. “Doença da tinta do castanheiro”. *Revista Jovens Agricultores*, Centro de Gestão Agrícola de Mirandela. N64.

Coelho, M.T.P.P.G.R.; 1999. “Influência da Concentração de CO₂ na aclimatização de plantas de castanheiro regeneradas *in vitro*”. Dissertação de mestrado. Universidade de Évora.

Costa, T.; Jorge, N.; 2011. “Composto Bioativo Benéficos presentes em Castanhas e Nozes”. Artigo de Revisão, Departamento de Engenharia e Tecnologia dos alimentos, Universidade Estadual Paulista, Brasil.

DRATM (a), 2003. “O cancro do Castanheiro”. Direcção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes. [consult. 23 de Novembro 2011].

DRATM (b), 2003. “Doença da tinta do Castanheiro”. Direcção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes. [consult. 23 de Novembro 2011].

Duncan, E.; Setze, E.; Lehmann, J.; 2004. "General considerations for the storage of sample material prior to DNA purification". Hilden, Germany: QIAGEN GmbH.

FAO, 2006. "Evaluation de los recursos forestales mundiales 2005". Estudio FAO. [Consultado: Setembro 2011]. Disponível em www.fao.org/world/regional/rap/infonote.

FCUP - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; s.d. "*Castanea sativa* (Mill.)" [consult. Agost. 2011]. Disponível em WWW: <URL: <http://jardimbotanico.up.pt/php/flora.php?menuabc=c&id=41>>.

Fenaroli, L., 1945. "Il Castagno". Ramo Editoriale degli Agricoltori, Roma. p.122.

Fick, T.A., 2007. "Estabelecimento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (Louro-Pardo)". Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil. 61pp.

FS: De Fossard, R.A.; Nitsch, C.; Cresswell, R.J.; Lee, H.C.M. 1974. Tissue and organ culture of Eucalyptus. New Zeal. J. For. Sci. 4:267-278.

GD: Greshoff, P.M., Doy, C.H., 1972. Developmental and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* tomato. Planta 107, 161–170.

Gomes, A.L., 1982. "Revisão crítica sobre a cultura do castanheiro em Portugal". Dissertação de Doutoramento. Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

Gonçalves J.C.; Coelho T.; Diogo G.; s.d. "Micropropagação do Castanheiro". Material de apoio as aulas. Lab. Biologia Vegetal, Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Gonçalves, J.C.; 1991. "Influência de alguns fatores na micropropagação de castanheiro". Dissertação de mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 80pp.

Gonçalves J.C.; Diogo G.; Amâncio S.; 1998. "*In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*): effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation". *Sci. Hort.* 72: 265-275.

Gonçalves, J.C., 1998. "Micropropagação de castanheiro: Estudo das fases de enraizamento e aclimatização". Dissertação de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 234pp.

Grattapaglia, D.; Machado, M.A.; Caldas, L.S.; Buso, J.A.; 1998. "Cultura de tecidos e transformação genética de plantas." EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, v.1. 183-260pp.

Huang H.; Dane F.; Kubisiak T.; 1998. "Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic variation in wild populations of the American chestnut (Fagaceae)". [Consult. Agosto 2011] – Disponível em WWW: [URL:http://www.amjbot.org/content/85/7/1013.abstract](http://www.amjbot.org/content/85/7/1013.abstract).

Knop: Gautheret, R.J. 1959. "La culture des tissues végétaux, techniques et realizations". Paris, Masson ed.

Kubitzki K.; Rohwer G.J.; Bittrich V.; 1993. "The families and genera of vascular plants-Flowering plants, dicotyledons: magnolid, hamamelid, and caryophyllid families". Vol III. New York: Springer. ISBN 3 540 55509 9. p 301-305.

López, J.F., Vásquez, R.D., Augustin, M.A.G; Lorenzo, S.P.; 2000. "Conservacion de Recursos genéticos de las frondosas nobles em Españ." Invest. Agr.; Sist. Recur. 2:71-93.

Meireles C.; Gonçalves P.; Rego F.; Silveira S.; 2005. "Estudo da regeneração natural das espécies arbóreas autóctones na Reserva Natural da Serra da Malcata". *Silva Lusitana* 13: 217 - 231.

Moreira F.M.R; 2009. "Propagação vegetativa de medronheiro (*Arbutus unedo*), castanheiro (*Castanea sp.*) e rododendro (*Rhododendron sp.*)". Relatório de estágio LERF, ESAC. Coimbra, p. 66.

MS: Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497

MS/2: Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Paiva, J.; 1990. "O castanheiro em Portugal". Ed. QUERCUS – Associação Nacional de Conservação da Natureza. Cadernos QUERCUS, Série A, 4.

Ponte, E.M.; 1999. "Micropropagação de *Eucalyptus globulus spp. Glonulus labill*". Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pelotas.

Portela, E., Martins, A., Pires, A.L., 1998. "Praticas culturais de limitação da tinta do castanheiro. Universidade de Trás-os Montes e Alto Douro, Vila Real.

Santos, C.; Valentim, P.; 2009. “Efeito do fosfonato de potássio na proteção das raízes do castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) contra *Phitophthora*”. Dissertação de mestrado, Escola Superior Agrária de Bragança.

Seabra, R.C.; Pais, M.S.; 1993. “Micropropagação de Clones de Castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) Resistentes à doença da tinta”. *Silva Lusitana* 1(2): 169-181, Lisboa.

Seabra R.C.; Simões A.M.; Baeta J.; Salomé Pais M.; 2001. "Evaluation of Portuguese chestnut stands by RAPDs". *For. Snow Landsc. Res.* 76: 435-438.

Tavares, F.R.C.; 2010. “Compreensão da resistência a Fungos patogênicos em *Castanea* spp.”. Dissertação de mestrado, Escola Superior Agrária de Coimbra.

Villani, F.; Pigliucci, M.; Cherubini, M; 1994. “Evolution of *Castanea sativa* Mill. In Turkey and Europe”. *Genetical research*, 63:109-116.

7 ANEXOS

7.1 Anexo I - Meio de Anderson

	<i>sol mãe</i>		<i>Anderson (1984)</i>	
	g/ 1L	mg/L	quant.ml/1 L	
Na H₂PO₄.H₂O	27,6	380,88	13,8	
K NO₃	95	475	5	
Ca Cl₂.2H₂O	44	440	10	
Mg SO₄.7H₂O	74	370	5	
NH₄ NO₃	330	429	1,3	
Na Fe EDTA	4	40	10	
Oligo elementos de MS (1962)			1	
Vit. Fossard C (1974)			20	
ácido ascórbico	100mg/100ml		1	
sulfato de adenina	8g/100 ml		1	
BAP	100mg/100ml	0.1 - 0.2 - 0.5	0.1 - 0.2 - 0.5	
sacarose			30 g	
água			verificar	
pH			5,65	
agar (g)			7,5	
esterilização			121°C 18'	

7.2 Anexo II - Meio FS

	<i>sol mãe</i>		<i>FS</i>
	g/ 1L	mg/ L	quant.ml/1 L
Na H₂PO₄.H₂O	27,6	138	5
K NO₃	95	1010	10,6
Ca Cl₂.2H₂O	44	294	6,7
Mg SO₄.7H₂O	74	396,6	5,4
NH₄ NO₃	330	800	2,4
Na₂ SO₄	12,8	63,9	5,0
Na Fe EDTA	4	40	10,0
Oligo elementos de MS (1962)			1
Vit. Fossard C (1974)			20
ácido ascórbico	100mg/100ml		1
sulfato de adenina	8g/100 ml		1
BAP	100mg/100ml	0.1 - 0.2 - 0.5	0.1 - 0.2 - 0.5
sacarose			30 g
água			verificar
pH			5,65
agar (g)			7,5
esterilização			121°C 18'

7.3 Anexo III - Meio MS

	<i>sol mãe</i>		<i>MS</i>
	g/ 1L	mg/ L	quant.ml/1 L
K NO₃	95	1900	20
K H₂PO₄	17	170	10
Ca Cl₂.2H₂O	44	440	10
Mg SO₄.7H₂O	74	370	5
NH₄ NO₃	330	1650	5
Na Fe EDTA	4	80	20
Oligo elementos de MS (1962)			2
Vit. Fossard C (1974)			40
ácido ascórbico	100mg/100ml		1
sulfato de adenina	8g/100 ml		1
BAP	100mg/100ml	0.1 - 0.2 - 0.5	0.1 - 0.2 - 0.5
sacarose			30 g
água			verificar
pH			5,65
agar (g)			7,5
esterilização			

7.4 Anexo IV - Meio MS/2

	<i>sol mãe</i>		<i>X MS/2</i>
	g/ 1L	mg/ L	quant.ml/1 L
K NO₃	95	950	10
K H₂PO₄	17	85	5
Ca Cl₂.2H₂O	44	220	5
Mg SO₄.7H₂O	74	185	2,5
NH₄ NO₃	330	825	2,5
Na Fe EDTA	4	40	10
Oligo elementos de MS (1962)			1
Vit. Fossard C (1974)			20
ácido ascórbico	100mg/100ml		1
sulfato de adenina	8g/100 ml		1
BAP	100mg/100ml	0.1 - 0.2 - 0.5	0.1 - 0.2 - 0.5
sacarose			30 g
água			verificar
pH			5,65
agar (g)			7,5
esterilização			121°C 18'

7.5 Anexo V - Meio GD

	GD		
	sol mãe		quant ml/L
	g/ 1L	mg/ L	
KCl	20	200	10
Na H₂PO₄	16	150	9,4
(NH₂)₂ SO₄	28	250	8,9
K NO₃	95	1000	10,5
Ca Cl₂.2H₂O	44	150	3,4
Mg SO₄.7H₂O	74	250	3,4
Na Fe EDTA	4		10
Oligo elementos de MS (1962)			1
Vit. Fossard C (1974)			20
ácido ascórbico	100mg/100ml		1
sulfato de adenina	8g/100 ml		1
BAP	100mg/100ml	0.1 - 0.2 - 0.5	0.1 - 0.2 - 0.5
sacarose			30 g
água			verificar
pH			5,65
agar (g)			7,5
esterilização			121°C 18'

7.6 Anexo VI – Meio Knop + CA1%

	<i>sol mãe</i>		<i>Knop</i>
	g/ 1L	mg/ L	quant.ml/1 L
K NO₃	95	250	2,6
K H₂PO₄	17	250	14,7
Ca (NO₃)₂.4H₂O	50	500	10,0
Mg SO₄.7H₂O	74	250	3,4
Na Fe EDTA	4	40	10,0
Oligo elementos Rizog. de MS (1962)			1
Vit. Fossard A Rizog. (1974)			2
sacarose (g)			15
água			verificar
pH			5,65
carbono activo (g)			15
agar (g)	6,5-7g		7,5
esterilização			121°C 18'

7.7 Anexo VII – Fator Meio de Cultura

Tabela 1 - Anova, análise de variância para avaliar do efeito do fator Meio de cultura na variável dependente CNS.

Effect	Univariate Tests of Significance for CNS (multiplicacao.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	6386,55	1	6386,55	426766,1	0,000000
Meio	0,012	2	0,006	0,4	0,66060
Error	26,578	1776	0,015		

Cell No.	Meio	Meio; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=,41470, p=,66060 Effective hypothesis decomposition				N
		CNS Mean	CNS Std.Err.	CNS -95,00%	CNS +95,00%	
1	GD	1,98088	0,00599	1,96910	1,99265	523
2	MS	1,98588	0,00404	1,97793	1,99382	850
3	MS/2	1,98768	0,00548	1,97691	1,99845	406

Tabela 2 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do fator Meio de cultura na variável dependente NAPB.

Cell No.	Meio	Meio; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=19,354, p=,00000 Effective hypothesis decomposition				N
		NAPB Mean	NAPB Std.Err.	NAPB -95,00%	NAPB +95,00%	
1	GD	1,87571	0,04628	1,78478	1,96664	523
2	MS	1,59176	0,03041	1,53207	1,65145	850
3	MS/2	1,54679	0,04145	1,46529	1,62829	406

Cell No.	Meio	Duncan test; variable NAPB Homogenous Groups, all Error: Between MS = ,86	
		NAPB Mean	1 2
3	MS/2	1,54679	****
2	MS	1,59176	****
1	GD	1,87571	****

Effect	Univariate Tests of Significance for NAPB (multiplicacao.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	4528,98	1	4528,98	5240,48	0,000000
Meio	33,45	2	16,72	19,35	0,000000
Error	1534,87	1776	0,86		

Tabela 3 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **fator Meio de cultura** na variável dependente **NR**.

Meio; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=5,5728, p=,00387 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable NR Homogenous Groups, alpha = 0,05 Error: Between MS = 2,5				
Cell No.	Meio	NR Mean	NR Std.Err.	NR -95,00%	NR +95,00%	N	Cell No.	Meio	NR Mean	1	2
1	GD	1,29063	0,06900	1,15507	1,42618	523	3	MS/2	0,93842	****	
2	MS	1,17294	0,04957	1,07563	1,27024	850	2	MS	1,17294		****
3	MS/2	0,93842	0,09669	0,74833	1,12851	406	1	GD	1,29063		****

Univariate Tests of Significance for NR (multiplicacao.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2084,73	1	2084,73	802,994	0,00000
Meio	28,93	2	14,46	5,5728	0,00386
Error	4610,86	1776	2,59		

Tabela 4 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **fator Meio de cultura** na variável dependente **CM**.

Meio; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=265,51, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable CM (mu) Homogenous Groups, alpha = 0,05 Error: Between MS = 79,759,					
Cell No.	Meio	CM Mean	CM Std.Err.	CM -95,00%	CM +95,00%	N	Cell No.	Meio	CM Mean	1	2	3
1	GD	9,7734	0,26774	9,2474	10,2994	523	1	GD	9,7734	****		0,00
2	MS	15,3152	0,28281	14,7601	15,8704	850	2	MS	15,3152		****	0,00
3	MS/2	23,3743	0,62562	22,1445	24,6042	406	3	MS/2	23,3743			0,00

Univariate Tests of Significance for CM (multiplicacao.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	423064,1	1	423064,1	5304,28	0,00
Meio	42353,4	2	21176,7	265,508	0,00
Error	141652,1	1776	79,8		

Tabela 5 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Meio de cultura** na variável dependente **NS**.

Meio; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=5,6932, p=,00343 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable NS Homogenous Groups, alpha = Error: Between MS = ,69				
Cell No.	Meio	NS Mean	NS Std.Err.	NS -95,00%	NS +95,00%	N	Cell No.	Meio	NS Mean	1	2
1	GD	1,43403	0,03733	1,36069	1,50737	523	2	MS	1,42000	****	
2	MS	1,42000	0,02645	1,36807	1,47192	850	1	GD	1,43403	****	
3	MS/2	1,58374	0,04617	1,49296	1,67452	406	3	MS/2	1,58374		****

Univariate Tests of Significance for NS (multiplicacao.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3547,44	1	3547,44	5096,52	0,00000
Meio	7,92	2	3,96	5,69	0,00343
Error	1236,18	1776	0,69		

Tabela 6 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Meio de cultura** na variável dependente **Callus**.

Meio; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=123,35, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable callus (n) Homogenous Groups, alpha = Error: Between MS = ,84727,					
Cell No.	Meio	callus Mean	callus Std.Err.	callus -95,00%	callus +95,00%	N	Cell No.	Meio	callus Mean	1	2	3
1	GD	1,08795	0,06154	0,96705	1,20885	523	3	MS/2	0,25615	****		0,00
2	MS	0,38588	0,02244	0,34183	0,42992	850	2	MS	0,38588		****	0,00
3	MS/2	0,25615	0,02555	0,20592	0,30638	406	1	GD	1,08795			0,00

Univariate Tests of Significance for callus (multiplicacao.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	539,10	1	539,10	636,28	0,00
Meio	209,01	2	104,50	123,34	0,00
Error	1504,74	1776	0,84		

Tabela 7 - **Anova**, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Meio de cultura** na variável dependente **Vitrificação**.

Meio; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=49,029, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Meio	Vitrificacao Mean	Vitrificacao Std.Err.	Vitrificacao -95,00%	Vitrificacao +95,00%	N
1	GD	0,06309	0,01253	0,03846	0,08772	523
2	MS	0,29176	0,01933	0,25382	0,32970	850
3	MS/2	0,37192	0,03048	0,31198	0,43185	406

Duncan test; variable Vitrificacao Homogenous Groups, alpha = ,0 Error: Between MS = ,26205, df :					
Cell No.	Meio	Vitrificacao Mean	1	2	3
1	GD	0,06309	****		0,00
2	MS	0,29176		****	0,00
3	MS/2	0,37192			0,00

Univariate Tests of Significance for Vitrificacao Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	95,146	1	95,1467	363,087	0,00
Meio	25,696	2	12,8480	49,029	0,00
Error	465,400	1776	0,2620		

Tabela 8 - **Anova**, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Meio de cultura** na variável dependente **Clorose**.

Meio; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=30,990, p=,00000 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Meio	Clorose Mean	Clorose Std.Err.	Clorose -95,00%	Clorose +95,00%	N
1	GD	0,21988	0,02326	0,17418	0,26558	523
2	MS	0,16823	0,01436	0,14003	0,19643	850
3	MS/2	0,01231	0,00548	0,00154	0,02308	406

Duncan test; variable Clorose Homogenous Groups, alpha = Error: Between MS = ,16982,					
Cell No.	Meio	Clorose Mean	1	2	3
3	MS/2	0,01231	****		0,00
2	MS	0,16823		****	0,00
1	GD	0,21988			0,00

Univariate Tests of Significance for Clorose (mult Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	28,883	1	28,8835	170,086	0,00000
Meio	10,525	2	5,2626	30,989	0,00000
Error	301,594	177	0,1698		

7.8 Anexo VIII – Fator Concentração de BAP

Tabela 1 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Concentração da citocinina BAP** na variável dependente **CNS**.

BA; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=19,302, p=,00000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable CNS Homogenous Groups, alpha = ,014 Error: Between MS = ,014				
Cell No.	BA	CNS Mean	CNS Std.Err.	CNS -95,00%	CNS +95,00%	N	Cell No.	BA	CNS Mean	1	2
1	BA 0.5	1,86111	0,05845	1,74243	1,97978	36	1	BA 0.5	1,86111	****	
2	BA 0.2	1,98794	0,00282	1,98240	1,99348	1493	3	BA 0.1	1,98400		****
3	BA 0.1	1,98400	0,00795	1,96833	1,99966	250	2	BA 0.2	1,98794		****

Univariate Tests of Significance for CNS (multipli Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1048,60	1	1048,60	71559,9	0,00000
BA	0,56	2	0,28	19,30	0,00000
Error	26,02	1776	0,015		

Tabela 2 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Concentração da citocinina BAP** na variável dependente **NAPB**.

BA; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=66,142, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable NAPB (m Homogenous Groups, alpha = , Error: Between MS = ,82185, d					
Cell No.	BA	NAPB Mean	NAPB Std.Err.	NAPB -95,00%	NAPB +95,00%	N	Cell No.	BA	NAPB Mean	1	2	3
1	BA 0.5	0,50000	0,14638	0,20282	0,79717	36	1	BA 0.5	0,50000	****		0,00
2	BA 0.2	1,76423	0,02440	1,71635	1,81211	1493	3	BA 0.1	1,24000		****	0,00
3	BA 0.1	1,24000	0,04118	1,15888	1,32112	250	2	BA 0.2	1,76423			0,00

Univariate Tests of Significance for NAPB (m Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	378,44	1	378,44	460,479	0,00
BA	108,71	2	54,359	66,142	0,00
Error	1459,61	1776	0,821		

Tabela 3 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Concentração da citocinina BAP** na variável dependente **NR**.

BA; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=13,354, p=,00000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable NR (multi) Homogenous Groups, alpha = , Error: Between MS = 2,57				
Cell No.	BA	NR	NR	NR	NR	N	BA	NR	1	2	
		Mean	Std.Err.	-95,00%	+95,00%		Mean				
1	BA 0.5	0,19444	0,10404	-0,01677	0,40565	36	BA 0.5	0,19444	****		
2	BA 0.2	1,23174	0,04385	1,14572	1,31776	1493	BA 0.1	0,82800		****	
3	BA 0.1	0,82800	0,06629	0,69742	0,95857	250	BA 0.2	1,23174		****	

Univariate Tests of Significance for NR (multiplicacao.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	156,60	1	156,602	60,8451	0,00000
BA	68,74	2	34,370	13,3539	0,00000
Error	4571,05	1776	2,5738		

Tabela 4 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Concentração da citocinina BAP** na variável dependente **CM**.

BA; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=152,32, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable CM (multi) Homogenous Groups, alpha = , Error: Between MS = 88,437, d				
Cell No.	BA	CM	CM	CM	CM	N	BA	CM	1	2	3
		Mean	Std.Err.	-95,00%	+95,00%		Mean				
1	BA 0.5	3,3333	0,21821	2,8903	3,7763	36	BA 0.5	3,3333	****		0,00
2	BA 0.2	14,3405	0,23432	13,8809	14,8002	1493	BA 0.2	14,3405		****	0,00
3	BA 0.1	24,3560	0,74658	22,8855	25,8264	250	BA 0.1	24,3560			0,00

Univariate Tests of Significance for CM (multiplicacao.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	54442,1	1	54442,1	615,606	0,00
BA	26942,6	2	13470,9	152,323	0,00
Error	157063,1	1776	88,44		

Tabela 5 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Concentração da citocinina BAP** na variável dependente **NS**.

BA; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=10,225, p=,00004 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable NS (m) Homogenous Groups, alpha=0,05 Error: Between MS = ,692				
Cell No.	BA	NS Mean	NS Std.Err.	NS -95,00%	NS +95,00%	N	BA	NS	1	2	
1	BA 0.5	0,97222	0,04856	0,87362	1,07082	36	BA 0.5	0,97222	****		
2	BA 0.2	1,49430	0,02221	1,45073	1,53788	1493	BA 0.1	1,33600		****	
3	BA 0.1	1,33600	0,04530	1,24676	1,42523	250	BA 0.2	1,49430		****	

Univariate Tests of Significance for NS (multiplicacao.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	445,618	1	445,618	643,455	0,00000
BA	14,163	2	7,081	10,225	0,00003
Error	1229,95	1776	0,692		

Tabela 6 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Concentração da citocinina BAP** na variável dependente **Callus**.

BA; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=232,09, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable callus (m) Homogenous Groups, alpha=0,05 Error: Between MS = ,765				
Cell No.	BA	callus Mean	callus Std.Err.	callus -95,00%	callus +95,00%	N	BA	callus	1	2	
1	BA 0.5	3,63888	0,26171	3,10757	4,17020	36	BA 0.1	0,34000	****		
2	BA 0.2	0,52578	0,02325	0,48017	0,57139	1493	BA 0.2	0,52578	****		
3	BA 0.1	0,34000	0,03307	0,27485	0,40514	250	BA 0.5	3,63888		****	

Univariate Tests of Significance for callus (m) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	625,38	1	625,381	817,478	0,00000
BA	355,09	2	177,549	232,086	0,00000
Error	1358,66	1776	0,765		

Tabela 7 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Concentração da citocinina BAP** na variável dependente **Vitrificação**.

BA; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=17,804, p=,00000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable Vitrificacao (r Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,27108, df =					
Cell No.	BA	Vitrificacao Mean	Vitrificacao Std.Err.	Vitrificacao -95,00%	Vitrificacao +95,00%	N	Cell No.	BA	Vitrificacao Mean	1	2	3
1	BA 0.5	0,00000				36	1	BA 0.5	0,00000	***		0,00
2	BA 0.2	0,22103	0,01314	0,19524	0,24682	1493	2	BA 0.2	0,22103		***	0,00
3	BA 0.1	0,40800	0,03934	0,33050	0,48549	250	3	BA 0.1	0,40800			0,00

Univariate Tests of Significance for Vitrificacao (r Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	12,194	1	12,1944	44,9842	0,00000
BA	9,652	2	4,8262	17,8036	0,00000
Error	481,443	1776	0,2710		

Tabela 8 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Concentração da citocinina BAP** na variável dependente **Clorose**.

BA; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(2, 1776)=19,947, p=,00000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable Clor Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,171				
Cell No.	BA	Clorose Mean	Clorose Std.Err.	Clorose -95,00%	Clorose +95,00%	N	Cell No.	BA	Clorose Mean	1	2
1	BA 0.5	0,05555	0,05555	-0,05722	0,16833	36	3	BA 0.1	0,00000	****	
2	BA 0.2	0,17481	0,01163	0,15200	0,19763	1493	1	BA 0.5	0,05555	****	****
3	BA 0.1	0,00000				250	2	BA 0.2	0,17481		****

Univariate Tests of Significance for Clorose (mult Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,635	1	1,63559	9,5157	0,00206
BA	6,857	2	3,42860	19,9474	0,00000
Error	305,262	1776	0,17188		

7.9 Anexo IX – Fator Clone

Tabela 1 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Clone** na variável dependente **CNS**.

clone; Weighted Means (multiplicacao.sa) Current effect: F(29, 1749)=8,5927, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable CNS (mu Homogenous Groups, alpha = Error: Between MS = ,01331, d					
Cell No.	clone	CNS Mean	CNS Std.Err.	CNS -95,00%	CNS +95,00%	N	clone	CNS Mean	1	2	3	
1	SC41	1,60000	0,13093	1,31918	1,88081	15	1	SC41	1,60000	****		
2	SC22	1,85294	0,06165	1,72750	1,97837	34	2	SC22	1,85294		****	
3	SC51	1,98181	0,01818	1,94536	2,01827	55	6	SC55	1,92500			****
4	SC915	2,00000				4	5	SC57	1,93750			****
5	SC57	1,93750	0,04347	1,84883	2,02616	32	26	SC43	1,94117			****
6	SC55	1,92500	0,04217	1,83969	2,01031	40	21	SC01	1,96875			****
7	SC24	1,99411	0,00588	1,98250	2,00573	170	3	SC51	1,98181			****
8	SM16	2,00000				12	19	SM901	1,98305			****
9	SC36	2,00000				9	30	SC919	1,98429			****
10	SC916	2,00000				34	20	SM904	1,98449			****
11	SM919	2,00000				103	7	SC24	1,99411			****
12	SC19	2,00000				83	12	SC19	2,00000			****
13	SC903	2,00000				23	13	SC903	2,00000			****
14	SM30	2,00000				50	14	SM30	2,00000			****
15	SM37	2,00000				8	15	SM37	2,00000			****
16	SM906	2,00000				100	11	SM919	2,00000			****
17	SM21	2,00000				33	17	SM21	2,00000			****
18	SM908	2,00000				10	18	SM908	2,00000			****
19	SM901	1,98305	0,01694	1,94912	2,01697	59	8	SM16	2,00000			****
20	SM904	1,98449	0,01092	1,96288	2,00610	129	10	SC916	2,00000			****
21	SC01	1,96875	0,02192	1,92494	2,01255	64	9	SC36	2,00000			****
22	SC46	2,00000				42	22	SC46	2,00000			****
23	SC918	2,00000				65	23	SC918	2,00000			****
24	SC914	2,00000				196	24	SC914	2,00000			****
25	SC09	2,00000				24	25	SC09	2,00000			****
26	SC43	1,94117	0,05882	1,81647	2,06587	17	4	SC915	2,00000			****
27	SC912	2,00000				34	27	SC912	2,00000			****
28	SC32	2,00000				95	28	SC32	2,00000			****
29	SC904	2,00000				48	29	SC904	2,00000			****
30	SC915	1,98429	0,00902	1,96650	2,00208	191	16	SM906	2,00000			****

Univariate Tests of Significance for CNS (mu Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2795,013	1	2795,013	210038,	0,00
clone	3,316	29	0,114	8,6	0,00
Error	23,274	1749	0,013		

Tabela 2 - Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **fator Clone** na variável dependente **NAPB**.

clone; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(29, 1749)=8,3728, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition						Duncan test; variable NAPB (multiplicacao.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,78739, df = 1749,0											
Cell No.	clone	NAPB Mean	NAPB Std.Err.	NAPB -95,00%	NAPB +95,00%	N	Cell No.	clone	NAPB Mean	1	2	3	4	5	6	7	8
1	SC41	0,000000				15	1	SC41	0,000000	***							
2	SC22	0,735294	0,165192	0,399208	1,071380	34	2	SC22	0,735294	***							
3	SC51	1,418182	0,123613	1,170353	1,666010	55	5	SC51	0,937500	***	***						
4	SC915	1,500000	0,500000	-0,091223	3,091223	4	21	SC07	1,250000	***	***	***					
5	SC57	0,937500	0,173539	0,583564	1,291436	32	15	SM37	1,375000		***	***	***				
6	SC55	1,475000	0,160078	1,151211	1,798789	40	3	SC51	1,418182		***	***	***				
7	SC24	1,605882	0,069455	1,468771	1,742994	170	10	SC916	1,470588		***	***	***	***			
8	SM16	1,500000	0,230283	0,993150	2,006850	17	6	SC55	1,475000		***	***	***	***			
9	SC36	1,666667	0,288675	1,000981	2,332353	9	16	SM90E	1,480000		***	***	***	***			
10	SC916	1,470588	0,153598	1,158091	1,783086	34	8	SM16	1,500000		***	***	***	***			
11	SM919	2,174757	0,091965	1,992346	2,357169	103	4	SC915	1,500000		***	***	***	***			
12	SC19	1,614458	0,076339	1,462596	1,766320	83	28	SC32	1,505263		***	***	***	***			
13	SC903	2,173913	0,173913	1,813239	2,534587	23	19	SM901	1,559322			***	***	***	***		
14	SM30	1,040000	0,002610	1,073900	2,006012	50	24	SC914	1,581633			***	***	***	***		
15	SM37	1,375000	0,182981	0,942318	1,807682	8	7	SC24	1,605882			***	***	***	***	***	
16	SM906	1,480000	0,082241	1,316815	1,643185	100	12	SC19	1,614458			***	***	***	***	***	
17	SM21	2,090909	0,146704	1,792083	2,389735	33	22	SC46	1,619041			***	***	***	***	***	
18	SM908	1,900000	0,100000	1,673784	2,126216	10	9	SC36	1,666667			***	***	***	***	***	
19	SM901	1,559322	0,106128	1,346884	1,771760	59	26	SC43	1,705882			***	***	***	***	***	
20	SM904	1,914729	0,086680	1,743217	2,086240	129	25	SC09	1,791667			***	***	***	***	***	
21	SC01	1,250000	0,104464	1,041246	1,458754	64	30	SC919	1,837691			***	***	***	***	***	
22	SC46	1,619048	0,152228	1,311616	1,926479	42	14	SM30	1,840000			***	***	***	***	***	
23	SC918	1,907692	0,119541	1,668883	2,146502	65	18	SM90E	1,900000			***	***	***	***	***	
24	SC914	1,581633	0,064640	1,454150	1,709115	196	23	SC918	1,907692			***	***	***	***	***	
25	SC09	1,791667	0,199448	1,379077	2,204257	24	20	SM904	1,914729			***	***	***	***	***	
26	SC43	1,705882	0,267954	1,137845	2,273919	17	29	SC904	2,062500			***	***	***	***	***	
27	SC912	2,205882	0,167712	1,864670	2,547095	34	17	SM21	2,090909			***	***	***	***	***	
28	SC32	1,505263	0,081796	1,342855	1,667672	95	13	SC903	2,173913			***	***	***	***	***	
29	SC904	2,062500	0,137758	1,785367	2,339633	48	11	SM919	2,174757			***	***	***	***	***	
30	SC919	1,837696	0,065558	1,708382	1,967011	191	27	SC912	2,205882			***	***	***	***	***	

Univariate Tests of Significance for NAPB (m Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1832,69	1	1832,69	2327,55	0,00
clone	191,18	29	6,59	8,37	0,00
Error	1377,14	1749	0,787		

Tabela 3 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **fator Clone na variável dependente NR.**

clone; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(29, 1749)=7,8104, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition						Duncan test; variable NR (multiplicacao.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 2,3487, df = 1749,0												
Cell No.	clone	NR Mean	NR Std.Err.	NR -95,00%	NR +95,00%	N	Cell No.	clone	NR Mean	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	SC41	0,000000				15	4	SC915	0,000000	****								
2	SC22	0,294118	0,123304	0,043253	0,544982	34	1	SC41	0,000000	****								
3	SC51	1,036364	0,168102	0,699339	1,373388	55	15	SM37	0,250000	****	****							
4	SC915	0,000000				4	5	SC57	0,281250	****	****							
5	SC57	0,281250	0,120770	0,034938	0,527562	32	2	SC22	0,294118	****	****							
6	SC55	1,050000	0,202390	0,640628	1,459372	40	8	SM16	0,333333	****	****	****						
7	SC24	0,905882	0,094487	0,719356	1,092409	170	21	SC01	0,390625	****	****	****	****					
8	SM16	0,333333	0,256235	-0,230637	0,897304	12	12	SC19	0,554217	****	****	****	****	****				
9	SC36	0,666667	0,372678	-0,192730	1,526064	9	9	SC36	0,666667	****	****	****	****	****	****			
10	SC916	0,676471	0,172641	0,325230	1,027712	34	28	SC32	0,673684	****	****	****	****	****	****			
11	SM919	2,300971	0,176604	1,950678	2,651263	103	10	SC916	0,676471	****	****	****	****	****	****			
12	SC19	0,554217	0,098852	0,357569	0,750865	83	16	SM906	0,710000	****	****	****	****	****	****			
13	SC903	1,434783	0,300369	0,811855	2,057710	23	7	SC24	0,905882	****	****	****	****	****	****	****		
14	SM30	2,020000	0,210907	1,596167	2,443833	50	26	SC43	0,941176	****	****	****	****	****	****	****		
15	SM37	0,250000	0,250000	-0,341156	0,841156	8	25	SC09	1,000000	****	****	****	****	****	****	****	****	
16	SM906	0,710000	0,108521	0,494671	0,925329	100	3	SC51	1,036364	****	****	****	****	****	****	****	****	
17	SM21	2,212121	0,322037	1,556154	2,868088	33	6	SC55	1,050000	****	****	****	****	****	****	****	****	
18	SM908	1,500000	0,428174	0,531402	2,468598	10	19	SM901	1,067797	****	****	****	****	****	****	****	****	
19	SM901	1,067797	0,160115	0,747292	1,388301	59	24	SC914	1,086735	****	****	****	****	****	****	****	****	
20	SM904	1,395349	0,130879	1,136383	1,654314	129	22	SC46	1,095238	****	****	****	****	****	****	****	****	
21	SC01	0,390625	0,121207	0,148413	0,632837	64	23	SC918	1,230769	****	****	****	****	****	****	****	****	****
22	SC46	1,095238	0,220362	0,650209	1,540267	42	29	SC904	1,333333	****	****	****	****	****	****	****	****	****
23	SC918	1,230769	0,211189	0,808872	1,652667	65	27	SC912	1,382353	****	****	****	****	****	****	****	****	****
24	SC914	1,086735	0,097794	0,893864	1,279605	196	20	SM904	1,395349	****	****	****	****	****	****	****	****	****
25	SC09	1,000000	0,262375	0,457236	1,542764	24	13	SC903	1,434783	****	****	****	****	****	****	****	****	****
26	SC43	0,941176	0,314720	0,274001	1,608352	17	18	SM908	1,500000	****	****	****	****	****	****	****	****	****
27	SC912	1,382353	0,188883	0,998067	1,766639	34	30	SC919	1,821990	****	****	****	****	****	****	****	****	****
28	SC32	0,673684	0,128251	0,419038	0,928330	95	14	SM30	2,020000	****	****	****	****	****	****	****	****	****
29	SC904	1,333333	0,215395	0,900015	1,766651	48	17	SM21	2,212121	****	****	****	****	****	****	****	****	****
30	SC919	1,821990	0,196690	1,434013	2,209966	191	11	SM919	2,300971	****	****	****	****	****	****	****	****	****

Univariate Tests of Significance for NR (mult Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	702,00	1	702,000	298,893	0,00
clone	531,97	29	18,344	7,810	0,00
Error	4107,82	1749	2,3487		

Tabela 4 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Clone na variável dependente CM.**

clone; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(29, 1749)=13,799, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition						Duncan test; variable CM (multiplicacao.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 85,617, df = 1749,0																		
Cell No.	clone	CM Mean	CM Std.Err.	CM -95,00%	CM +95,00%	N	Cell No.	clone	CM Mean	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	SC41	2,00000	0,425385	1,08764	2,91236	15	1	SC41	2,00000	***	***													
2	SC22	7,26471	1,738373	3,72796	10,80145	34	4	SC919	4,50000	***	***													
3	SC51	19,24545	1,551575	16,13473	22,35618	55	8	SM16	4,75000	***	***	***												
4	SC915	4,50000	0,645497	2,44574	6,55426	4	9	SC36	6,88889	***	***	***	***											
5	SC57	9,06250	1,502644	5,99784	12,12716	32	2	SC22	7,26471	***	***	***	***	***										
6	SC55	17,52500	2,573780	12,31904	22,73096	40	18	SM908	8,10000	***	***	***	***	***										
7	SC24	21,52941	0,862539	19,82667	23,23215	170	14	SM30	8,68000	***	***	***	***	***										
8	SM16	4,75000	0,391675	3,88793	5,61207	12	5	SC57	9,06250	***	***	***	***	***	***									
9	SC36	6,88889	0,654990	5,37848	8,39930	9	17	SM21	9,93939	***	***	***	***	***	***	***								
10	SC916	10,11765	0,899361	8,28788	11,94741	34	10	SC916	10,11765	***	***	***	***	***	***	***								
11	SM919	13,12621	0,796155	11,54704	14,70538	103	21	SC01	10,89063			***	***	***	***	***	***							
12	SC19	11,95181	0,675090	10,60884	13,29478	83	12	SC19	11,95181			***	***	***	***	***	***	***						
13	SC903	12,21739	0,891232	10,36909	14,06569	23	13	SC903	12,21739			***	***	***	***	***	***	***	***					
14	SM30	8,68000	0,383794	7,90874	9,45126	50	30	SC919	12,57063			***	***	***	***	***	***	***	***	***				
15	SM37	13,12500	2,423379	7,39462	18,85538	8	27	SC915	13,08824			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***			
16	SM906	15,26000	0,951089	13,37283	17,14717	100	15	SM37	13,12500			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
17	SM21	9,93939	0,708364	8,49650	11,38228	33	11	SM919	13,12621			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		
18	SM908	8,10000	0,936305	5,98193	10,21807	10	26	SC43	13,52941			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	
19	SM901	15,00000	0,845796	13,30696	16,69304	59	19	SM901	15,00000			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
20	SM904	20,02326	1,027214	17,99074	22,05577	129	16	SM906	15,26000			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
21	SC01	10,89063	0,944417	9,00336	12,77789	64	22	SC46	15,88095			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
22	SC46	15,88095	1,184100	13,48961	18,27229	42	6	SC57	17,52500			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
23	SC918	18,44615	1,467276	15,51493	21,37737	65	29	SC904	17,72917			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
24	SC914	19,64796	0,823051	18,02474	21,27118	196	23	SC918	18,44615			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
25	SC09	19,04167	2,039003	14,82367	23,25967	24	28	SC32	18,81053			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
26	SC43	13,52941	2,164414	8,94106	18,11776	17	25	SC09	19,04167			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
27	SC912	13,08824	0,670711	11,72366	14,45281	34	3	SC51	19,24545			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
28	SC32	18,81053	1,002270	16,82050	20,80056	95	24	SC914	19,64796			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
29	SC904	17,72917	1,485372	14,74098	20,71735	48	20	SM904	20,02326			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
30	SC919	12,57068	0,374394	11,83218	13,30918	191	7	SC24	21,52941			***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Univariate Tests of Significance for CM (mul- Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	121458,1	1	121458,1	1418,62	0,00
clone	34260,9	29	1181,4	13,799	0,00
Error	149744,4	1749	85,6		

Tabela 5 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Clone na variável dependente NS.**

clone; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(29, 1749)=4,6227, p=,00000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable NS (multiplicacao.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,66069, df = 1749,0										
Cell No.	clone	NS Mean	NS Std.Err.	NS -95,00%	NS +95,00%	N	Cell No.	clone	NS Mean	1	2	3	4	5	6	7	8
1	SC41	0,600000	0,13093	0,319182	0,880818	15	1	SC41	0,600000	****							
2	SC22	0,970588	0,09888	0,76941	1,171766	34	2	SC22	0,970588	****	****						
3	SC57	1,400000	0,11488	1,169666	1,630333	55	4	SC915	1,000000	****	****	****					
4	SC915	1,000000				4	8	SM16	1,000000	****	****	****					
5	SC57	1,156250	0,10149	0,949250	1,363250	32	9	SC36	1,111111	****	****	****	****				
6	SC57	1,575000	0,15967	1,252022	1,897977	40	15	SM37	1,125000		****	****	****				
7	SC24	1,458824	0,05846	1,343400	1,574248	170	5	SC57	1,156250		****	****	****	****			
8	SM16	1,000000				12	12	SC19	1,156627		****	****	****	****			
9	SC36	1,111111	0,11111	0,854888	1,367333	9	10	SC916	1,176471		****	****	****	****			
10	SC916	1,176471	0,06636	1,041450	1,311488	34	21	SC01	1,234375		****	****	****	****	****		
11	SM919	1,834951	0,09862	1,639326	2,030576	103	16	SM906	1,300000		****	****	****	****	****	****	
12	SC19	1,156627	0,04013	1,076780	1,236474	83	18	SM908	1,300000		****	****	****	****	****	****	
13	SC903	1,652174	0,17341	1,292520	2,011822	23	28	SC32	1,336842		****	****	****	****	****	****	****
14	SM30	1,880000	0,13594	1,606800	2,153199	50	3	SC51	1,400000		****	****	****	****	****	****	****
15	SM37	1,125000	0,12500	0,829422	1,420577	8	30	SC919	1,408377		****	****	****	****	****	****	****
16	SM906	1,300000	0,06590	1,169230	1,430766	100	19	SM901	1,440678		****	****	****	****	****	****	****
17	SM21	1,787879	0,18339	1,414320	2,161433	33	7	SC24	1,458824		****	****	****	****	****	****	****
18	SM908	1,300000	0,15275	0,954450	1,645550	10	22	SC46	1,500000		****	****	****	****	****	****	****
19	SM901	1,440678	0,10333	1,233820	1,647533	59	24	SC914	1,500000		****	****	****	****	****	****	****
20	SM904	1,728682	0,09387	1,542940	1,914422	129	23	SC918	1,523077		****	****	****	****	****	****	****
21	SC01	1,234375	0,08256	1,069380	1,399366	64	26	SC43	1,529412		****	****	****	****	****	****	****
22	SC46	1,500000	0,14154	1,214140	1,785850	42	27	SC912	1,529412		****	****	****	****	****	****	****
23	SC918	1,523077	0,11829	1,286750	1,759400	65	6	SC55	1,575000			****	****	****	****	****	****
24	SC914	1,500000	0,05987	1,381920	1,618077	196	13	SC903	1,652174				****	****	****	****	****
25	SC09	1,708333	0,21263	1,268460	2,148200	24	29	SC904	1,687500					****	****	****	****
26	SC43	1,529412	0,31056	0,871030	2,187780	17	25	SC09	1,708333						****	****	****
27	SC912	1,529412	0,10542	1,314920	1,743900	34	20	SM904	1,728682						****	****	****
28	SC32	1,336842	0,07573	1,186460	1,487210	95	17	SM21	1,787879							****	****
29	SC904	1,687500	0,14933	1,387070	1,987920	48	11	SM919	1,834951								****
30	SC915	1,408377	0,04928	1,311160	1,505590	191	14	SM30	1,880000								****

Univariate Tests of Significance for NS (multiplicacao.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1383,10	1	1383,10	2093,43	0,000000
clone	88,57	29	3,054	4,623	0,000000
Error	1155,54	1749	0,661		

Tabela 6 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Clone** na variável dependente **Callus**.

clone; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(29, 1749)=36,786, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition						Duncan test; variable callus (multiplicacao.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,60862, df = 1749,0												
Cell No.	clone	callus Mean	callus Std.Err.	callus -95,00%	callus +95,00%	N	Cell No.	clone	callus Mean	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	SC41	2,866667	0,533333	1,722278	4,010553	15	30	SC919	0,005236	****								
2	SC22	2,705882	0,349508	1,99480	3,416962	34	9	SC36	0,111111	****	****							
3	SC51	0,981818	0,131018	0,71914	1,244493	55	27	SC912	0,117647	****	****							
4	SC915	0,750000	0,750000	-1,63683	3,136835	4	25	SC09	0,166667	****	****							
5	SC57	0,718750	0,201978	0,30681	1,130687	32	24	SC914	0,178571	****	****	****						
6	SC55	2,100000	0,255202	1,58380	2,616195	40	28	SC32	0,189474	****	****	****						
7	SC24	0,517647	0,054854	0,40936	0,625934	170	29	SC904	0,208333	****	****	****						
8	SM16	1,833333	0,166667	1,46650	2,200164	12	10	SC916	0,235294	****	****	****	****					
9	SC36	0,111111	0,111111	-0,14511	0,367334	9	23	SC918	0,261538	****	****	****	****	****				
10	SC916	0,235294	0,094961	0,04210	0,428493	34	16	SM906	0,320000	****	****	****	****	****	****			
11	SM919	0,495146	0,075412	0,34557	0,644725	103	13	SC903	0,347826	****	****	****	****	****	****			
12	SC19	0,626506	0,074151	0,47900	0,774016	83	26	SC43	0,352941	****	****	****	****	****	****			
13	SC903	0,347826	0,134967	0,06792	0,627731	23	19	SM901	0,406780	****	****	****	****	****	****			
14	SM30	1,720000	0,134134	1,45045	1,989552	50	11	SM919	0,495146	****	****	****	****	****	****			
15	SM37	0,625000	0,263052	0,00298	1,247019	8	7	SC24	0,517647	****	****	****	****	****	****			
16	SM906	0,320000	0,056640	0,20761	0,432386	100	22	SC46	0,547619	****	****	****	****	****	****			
17	SM21	2,090909	0,258798	1,56375	2,618064	33	20	SM904	0,596899	****	****	****	****	****	****			
18	SM908	0,800000	0,133333	0,49838	1,101621	10	15	SM37	0,625000	****	****	****	****	****	****			
19	SM901	0,406780	0,064502	0,27766	0,535895	59	12	SC19	0,626506	****	****	****	****	****	****			
20	SM904	0,596899	0,066508	0,46530	0,728498	129	5	SC57	0,718750			****	****	****	****			
21	SC01	0,828125	0,161458	0,50548	1,150774	64	4	SC915	0,750000				****	****	****			
22	SC46	0,547619	0,114065	0,31726	0,777979	42	18	SM908	0,800000					****	****			
23	SC918	0,261538	0,063082	0,13552	0,387558	65	21	SC01	0,828125						****			
24	SC914	0,178571	0,031841	0,11577	0,241369	196	3	SC51	0,981818							****		
25	SC09	0,166667	0,077709	0,00591	0,327419	24	14	SM30	1,720000								****	
26	SC43	0,352941	0,119471	0,09967	0,606209	17	8	SM16	1,833333									****
27	SC912	0,117647	0,056086	0,00354	0,231755	34	17	SM21	2,090909									****
28	SC32	0,189474	0,045626	0,09888	0,280064	95	6	SC55	2,100000									****
29	SC904	0,208333	0,059238	0,08916	0,327505	48	2	SC22	2,705882									****
30	SC919	0,005236	0,005236	-0,00509	0,015563	191	1	SC41	2,866667									****

Univariate Tests of Significance for callus (m Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	448,884	1	448,884	737,540	0,00
clone	649,280	29	22,389	36,786	0,00
Error	1064,480	1749	0,608		

Tabela 7 – Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Clone** na variável dependente **Vitrificação**.

clone; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(29, 1749)=7,1291, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition						Duncan test; variable Vitrificacao (multiplicacao.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,25110, df = 1749,0									
Cell No.	clone	Vitrificacao Mean	Vitrificacao Std. Err.	Vitrificacao -95,00%	Vitrificacao +95,00%	N	Cell No.	clone	Vitrificacao Mean	1	2	3	4	5	6
1	SC41	0,000000				15	25	SC09	0,000000	****					
2	SC22	0,029412	0,029412	-0,030427	0,089250	34	26	SC43	0,000000	****					
3	SC51	0,090909	0,059587	-0,028556	0,210375	55	4	SC915	0,000000	****					
4	SC915	0,000000				4	8	SM16	0,000000	****					
5	SC57	0,031250	0,031250	-0,032485	0,094985	32	9	SC36	0,000000	****					
6	SC55	0,075000	0,042176	-0,010310	0,160310	40	1	SC41	0,000000	****					
7	SC24	0,347059	0,049545	0,249252	0,444865	170	21	SC01	0,015625	****					
8	SM16	0,000000				12	2	SC22	0,029412	****					
9	SC36	0,000000				9	5	SC57	0,031250	****					
10	SC916	0,088235	0,049375	-0,012219	0,188689	34	6	SC55	0,075000	****	****				
11	SM919	0,388350	0,057277	0,274742	0,501957	103	29	SC904	0,083333	****	****	****			
12	SC19	0,156627	0,049925	0,057310	0,255943	83	13	SC903	0,086957	****	****	****	****		
13	SC903	0,086957	0,060074	-0,037629	0,211542	23	10	SC916	0,088235	****	****	****	****		
14	SM30	0,320000	0,077932	0,163389	0,476611	50	3	SC51	0,090909	****	****	****	****		
15	SM37	1,000000	0,377964	0,106256	1,893744	8	22	SC46	0,095238	****	****	****	****		
16	SM906	0,350000	0,057516	0,235876	0,464124	100	19	SM901	0,118644	****	****	****	****		
17	SM21	0,939394	0,143939	0,646199	1,232589	33	28	SC32	0,126316	****	****	****	****		
18	SM908	0,700000	0,213437	0,217171	1,182829	10	12	SC19	0,156627	****	****	****	****		
19	SM901	0,118644	0,042460	0,033650	0,203638	59	27	SC912	0,176471	****	****	****	****		
20	SM904	0,302326	0,052326	0,198790	0,405861	129	30	SC919	0,235602	****	****	****	****		
21	SC01	0,015625	0,015625	-0,015599	0,046849	64	20	SM904	0,302326	****	****	****	****		
22	SC46	0,095238	0,057123	-0,020125	0,210601	42	24	SC914	0,316327	****	****	****	****		
23	SC918	0,430769	0,081951	0,267053	0,594485	65	14	SM30	0,320000	****	****	****	****		
24	SC914	0,316327	0,041045	0,235378	0,397275	196	7	SC24	0,347059	****	****	****	****		
25	SC09	0,000000				24	16	SM906	0,350000	****	****	****	****		
26	SC43	0,000000				17	11	SM919	0,388350	****	****	****	****		
27	SC912	0,176471	0,066362	0,041456	0,311485	34	23	SC918	0,430769			****	****		
28	SC32	0,126316	0,040274	0,046351	0,206280	95	18	SM908	0,700000				****	****	
29	SC904	0,083333	0,040315	0,002230	0,164437	48	17	SM21	0,939394					****	****
30	SC919	0,235602	0,034181	0,168180	0,303024	191	15	SM37	1,000000						****

Effect	Univariate Tests of Significance for Vitrificac Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	33,7884	1	33,7884	134,559	0,00
clone	51,9144	29	1,79015	7,1291	0,00
Error	439,181	1749	0,25110		

Tabela 8 - Anova, análise de variância para avaliar do efeito do **factor Clone** na variável dependente **Clorose**.

clone; Weighted Means (multiplicacao.sta) Current effect: F(29, 1749)=3,5079, p=,00000 Effective hypothesis decomposition							Duncan test; variable Clorose (mult Homogenous Groups, alpha = ,050 Error: Between MS = ,16865, df = 1					
Cell No.	clone	Clorose Mean	Clorose Std.Err.	Clorose -95,00%	Clorose +95,00%	N	clone	Clorose Mean	1	2	3	4
1	SC41	0,00000				15	4	SC915	0,00000	****		
2	SC22	0,05882	0,04095	-0,02450	0,14215	34	18	SM908	0,00000	****		
3	SC51	0,29090	0,08070	0,12910	0,45271	55	1	SC41	0,00000	****		
4	SC915	0,00000				4	14	SM30	0,02000	****		
5	SC57	0,12500	0,07446	-0,02686	0,27686	32	23	SC918	0,04615	****	****	
6	SC55	0,05000	0,03489	-0,02059	0,12059	40	6	SC55	0,05000	****	****	
7	SC24	0,12352	0,03031	0,06368	0,18337	170	2	SC22	0,05882	****	****	
8	SM16	0,08333	0,08333	-0,10008	0,26674	12	8	SM16	0,08333	****	****	****
9	SC36	0,11111	0,11111	-0,14511	0,36733	9	11	SM919	0,08737	****	****	****
10	SC916	0,20588	0,08207	0,03889	0,37287	34	27	SC912	0,08823	****	****	****
11	SM919	0,08737	0,03118	0,02553	0,14922	103	30	SC919	0,08900	****	****	****
12	SC19	0,15662	0,04364	0,06980	0,24344	83	24	SC914	0,09183	****	****	****
13	SC903	0,17391	0,13560	-0,10730	0,45513	23	29	SC904	0,10416	****	****	****
14	SM30	0,02000	0,02000	-0,02019	0,06019	50	20	SM904	0,10852	****	****	****
15	SM37	0,62500	0,32389	-0,14090	1,39090	8	9	SC36	0,11111	****	****	****
16	SM906	0,17000	0,04725	0,07623	0,26377	100	7	SC24	0,12352	****	****	****
17	SM21	0,24242	0,11539	0,00738	0,47746	33	5	SC57	0,12500	****	****	****
18	SM908	0,00000				10	12	SC19	0,15662	****	****	****
19	SM901	0,23728	0,07388	0,08940	0,38517	59	16	SM906	0,17000	****	****	****
20	SM904	0,10852	0,02961	0,04993	0,16712	129	13	SC903	0,17391	****	****	****
21	SC01	0,35937	0,07171	0,21607	0,50267	64	26	SC43	0,17647	****	****	****
22	SC46	0,23809	0,08214	0,07220	0,40398	42	10	SC916	0,20588	****	****	****
23	SC918	0,04615	0,02622	-0,00624	0,09854	65	19	SM901	0,23728	****	****	****
24	SC914	0,09183	0,02191	0,04862	0,13504	196	22	SC46	0,23809	****	****	****
25	SC09	0,33333	0,14328	0,03692	0,62974	24	17	SM21	0,24242	****	****	****
26	SC43	0,17647	0,12820	-0,09530	0,44824	17	3	SC51	0,29090	****	****	****
27	SC912	0,08823	0,04937	-0,01221	0,18868	34	25	SC09	0,33333		****	****
28	SC32	0,35789	0,05779	0,24313	0,47265	95	28	SC32	0,35789			****
29	SC904	0,10416	0,04455	0,01452	0,19380	48	21	SC01	0,35937			****
30	SC919	0,08900	0,02065	0,04825	0,12975	191	15	SM37	0,62500			****

Univariate Tests of Significance for Clorose (mult Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	18,055	1	18,0552	107,059	0,00000
clone	17,156	29	0,5916	3,5079	0,00000
Error	294,962	1749	0,1686		

(Helen Schimith Beltrame)