

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**INFLUÊNCIA DE ALGUNS FACTORES
NA MICROPROPAGAÇÃO DE CASTANHEIRO**
(*Castanea* Miller)

José Carlos Dias Duarte Gonçalves

LISBOA, 1991

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**INFLUÊNCIA DE ALGUNS FACTORES
NA MICROPROPAGAÇÃO DE CASTANHEIRO**
(*Castanea* Miller)

José Carlos Dias Duarte Gonçalves

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para efeito de obtenção do Grau de Mestre em Produção Vegetal, sendo apresentado no Instituto Superior de Agronomia.

Toda a orientação e colaboração recebidas são mencionadas.

LISBOA, 1991

Dissertação realizada na Escola Superior Agrária
de Castelo Branco sob orientação da Professora Sara
Amâncio, do Instituto Superior de Agronomia.

'Há já muito tempo que os cientistas renunciaram à ideia de uma verdade última e intangível, imagem exacta duma "realidade" que espera ser descoberta ao virar da esquina. Os cientistas sabem agora que devem contentar-se com o parcial e o provisório.'

François Jacob

AGRADECIMENTOS

Na execução deste trabalho queremos agradecer a todos os que de alguma forma para ele contribuíram, em especial:

À Professora Sara Amâncio, do Instituto Superior de Agronomia, orientador científico, pela disponibilidade sempre demonstrada, sugestões e leitura crítica do trabalho;

À Professora Ana Maria Vieitez pelas sugestões, esclarecimentos e revisão crítica do trabalho;

Ao Professor João Santos Pereira pelas sugestões dadas;

A todos os elementos da Unidade de Cultura de Tecidos do Instituto de Investigações Agrobiológicas da Galiza, pela formação técnica e científica prestada em visitas e cursos aí realizados, bem como pela cedência de material vegetal;

Ao Engenheiro Armando Ferreira, por toda a disponibilidade sempre manifestada e, em particular, no auxílio dado no tratamento estatístico;

À Graça Diogo, pelo apoio em todo o trabalho laboratorial e de registo;

Aos elementos do Centro de Recursos da ESACB pela execução gráfica;

À Estação Nacional de Fruticultura Vieira da Natividade e Direcção Regional de Agricultura da Beira Interior pela cedência de material vegetal.

À Escola Superior Agrária, por ter possibilitado a criação de condições que permitiram a execução dos ensaios experimentais.

BEM HAJAM

À Teresa, Inês e Mariana.

RESUMO

No presente trabalho, pretendeu-se analisar a influência de alguns factores na micropropagação de material adulto, híbridos de *Castanea sativa* x *C. crenata*.

Multiplicação: A concentração de BAP mostrou ser a principal responsável pela variabilidade registada, embora o tipo de resposta seja dependente do genótipo e do meio de cultura utilizados. As concentrações de 0.1 e 0.2 mg/l foram as que melhores resultados permitiram. As formulações nutritivas utilizadas foram, dos factores analisados, o que menor variabilidade induziu, sendo no entanto de grande importância a natureza e as razões existentes entre as substâncias fornecedoras de azoto inorgânico, surgindo como francamente favorável a utilização de sulfato de amónio em vez de nitrato, para além de baixas razões $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$.

Enraizamento: Com taxas superiores a 80%, parece ser determinado pela concentração de AIB ou tempo de exposição, de acordo com a metodologia utilizada, independentemente da formulação nutritiva, que se apresenta como importante na modelação da morfologia do sistema radicular formado, onde a razão $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ se revelou importante, tendo ainda sido verificadas diferenças interclonais.

Transplante e aclimação: Continua ainda a ser uma fase de elevada mortalidade, cerca de 50%, que poderá resultar da inadequação dos substratos e/ou condições de aclimação, mas supomos que também do vigor fisiológico com que os rebentos regenerados *in vitro* se apresentam para, e durante, a fase de enraizamento.

Pensamos que será possível, a curto prazo, otimizar as condições estudadas e, como tal, utilizar estas técnicas na multiplicação vegetativa do castanheiro.

Palavras chave: *Castanea sativa* x *C. crenata*; micropropagação; rebentamento axilar; clone.

Abreviaturas: BAP: 6-benzilaminopurina; AIB: ácido indol butírico.

ABSTRACT

In the present work, we have studied the influence of some factors that can affect the *in vitro* regeneration of adult material of three *Castanea sativa* x *C. crenata* hybrids.

It was shown that the concentration of BAP is the principal responsible factor for the variability that we have found in response variables in the multiplication phase, which are, however, dependent on the genotype and culture medium. The concentrations of 0.1 and 0.2 mg l⁻¹ are the most suitable, whether for proliferation or for obtention of secondary explants. The influence of nutritive formulation has been small, but the type of nitrogen supplies and the rate of NH₄⁺/NO₃⁻ have great importance in the control of shoot development.

The rate of rooting, up to 80 %, seems to be determined by the concentration of IBA, independently of the culture medium, which influences the rooting morphological characteristics, where it is important the relationship of NH₄⁺/NO₃⁻.

The transplant and acclimatization remain a difficult process, and the rate of mortality, about 50 %, could result of inadequate substrates and/or acclimatization conditions; but we think that also the physiological status of the *in vitro* regenerated shoots, after and during the rooting process, is determinant.

We think that it is possible, in a short time, to optimize the studied conditions and, therefore, obtain results that could permit the use of these techniques for vegetative propagation of chestnut.

Key-words: *Castanea sativa* x *C. crenata*; micropropagation; axillary shooting; clone.

Abbreviation: BAP: 6-benzylaminopurin ; IBA: indol butiric acid.

ABREVIATURAS

- AIB** - ácido indol butírico
- BAP** - 6-benzilaminopurina
- CM** - comprimento do maior rebento formado por explant
- CMra** - comprimento da maior raiz formada por rebento
- Cmra** - comprimento médio de todas as raízes formadas por rebento
- GD** - meio de Greshoff e Doy (1972)
- 1/2GD** - meio de GD com macronutrientes reduzidos a metade
- Hm** - meio de Heller (1953), modificado por Vieitez *et al.*, 1983
- MS** - meio de Murashige e Skoog (1962)
- MSm** - meio de MS com macronutrientes reduzidos a metade e nitratos a 1/4
- NR** - número de rebentos maiores que 5 mm formados por explant <==>
taxa de multiplicação <==> taxa de proliferação
- NS** - número de segmentos formados na totalidade dos rebentos formados por explant
- NRa** - número de raízes formadas por rebento
- WPM** - Woody Plant Medium (McCown e Lloyd, 1981)

ÍNDICE

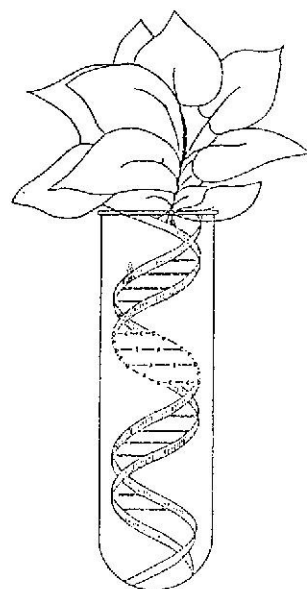
Resumo / Abstract
Abreviaturas

A. INTRODUÇÃO	1
I. O CASTANHEIRO	2
1. Considerações gerais	2
1.1 - Caracterização botânica	2
1.2 - Importância económica	6
1.3 - Principais doenças	8
1.4 - Técnicas convencionais de propagação clonal	10
2. Programas de melhoramento genético	13
II. A CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS <i>IN VITRO</i>	15
1. Aspectos históricos	15
2. Sistemas de cultura de tecidos e suas aplicações	17
2.1 - A micropropagação	20
3. Propagação de plantas lenhosas por cultivo <i>in vitro</i>	25
3.1 - Generalidades	25
3.2 - Caso do castanheiro	29
B. MATERIAL E MÉTODOS	32
I. MATERIAL VEGETAL	33
II. TIPO DE EXPLANT, ESTERILIZAÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTURA	33
1. Caracterização do explant	33
2. Métodos de desinfecção e esterilização	34
3. Condições físicas de cultura	35
III. MEIOS DE CULTURA PARA ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO	36

1. Meio de estabelecimento	36
2. Meios de multiplicação	36
3. Meios de enraizamento	37
4. Substratos	37
IV. TRANSPLANTE E ACLIMATAÇÃO	38
V. EXPRESSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	38
1. Fase de estabelecimento	38
2. Fase de multiplicação	39
3. Fase de enraizamento	39
4. Fase de transplante e aclimação	39
5. Interpretação estatística dos resultados	40
C. RESULTADOS	41
I. FASES DE ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO	42
1. Estabelecimento	42
2. Multiplicação	43
2.1 - Taxa de multiplicação	43
2.2 - Comprimento do maior rebento	48
2.3 - Número de segmentos	52
II. FASE DE ENRAIZAMENTO	57
1. Aplicação de AIB no meio de cultura	57
2. Aplicação de AIB por imersão basal do rebento	59
3. Efeito da aplicação da gota de BAP	60
III. FASE DE TRANSPLANTE E ACLIMATAÇÃO	61
D. DISCUSSÃO	62
I. FASE DE MULTIPLICAÇÃO	63
1. Efeitos da concentração da benzilaminopurina	64
2. Influência do clone	66
3. Efeitos das formulações nutritivas	67
II. FASE DE ENRAIZAMENTO	69
III. FASE DE TRANSPLANTE E ACLIMATAÇÃO	72
E. CONCLUSÕES	73
F. BIBLIOGRAFIA	78
G. ANEXOS	96

INTRODUÇÃO

A



I. O CASTANHEIRO

1. Considerações gerais

1.1 - Caracterização botânica

A identificação de folhas fossilizadas em turfas com mais de cinco mil anos, com características de nervação e recorte em tudo iguais às dos castanheiros actuais, associada a estudos de caracterização de pólen, testemunham uma origem muito antiga para as espécies do género *Castanea*.

De tal forma o castanheiro está implantado desde tempos remotos na Europa, que se torna difícil localizar e identificar as populações de origem espontânea e as populações importadas de Este, que regressaram de uma forma mais ou menos acentuada ao estado selvagem.

O castanheiro europeu, que se distribui preferencialmente por todo o Sul mediterrânico, pertence ao género *Castanea* Miller, classe das Dicotiledóneas e à família das Fagáceas, juntamente com os géneros *Fagus* e *Quercus*.

Para além do castanheiro europeu, *Castanea sativa* Miller, o género *Castanea* inclui ainda mais doze espécies, das quais cinco de origem asiática (*C. henryi* Rehder e Wilson, *C. molissima* Blume, *C. crenata* Sieb e Zucc., *C. seguinii* Dode e *C. davidii* Dode) e sete de origem americana, *C. dentata* (Marsh.) Borkh, *C. pumila* Miller, *C. floridiana* Ashe, *C. paucispina* Ashe, *C. alnifolia* Nuttall, *C. ashei* Sudworth e *C. ozarkensis*, apresentando uma grande diversidade de morfologia e dimensões (Fig. A1).

De interesse para o nosso país, para além da autóctone *C. sativa*, têm particular destaque a *C. crenata* e a *C. molissima*, não pela sua produtividade, já que são espécies de maiores exigências edafo-climáticas, mas sim pelo facto de terem sido espécies utilizadas como dadoras de genes de resistência à doença da tinta, grave enfermidade que tem

vindo a ser um dos factores determinantes na drástica redução de área de cultura e, conseqüentemente, de produção desta espécie.

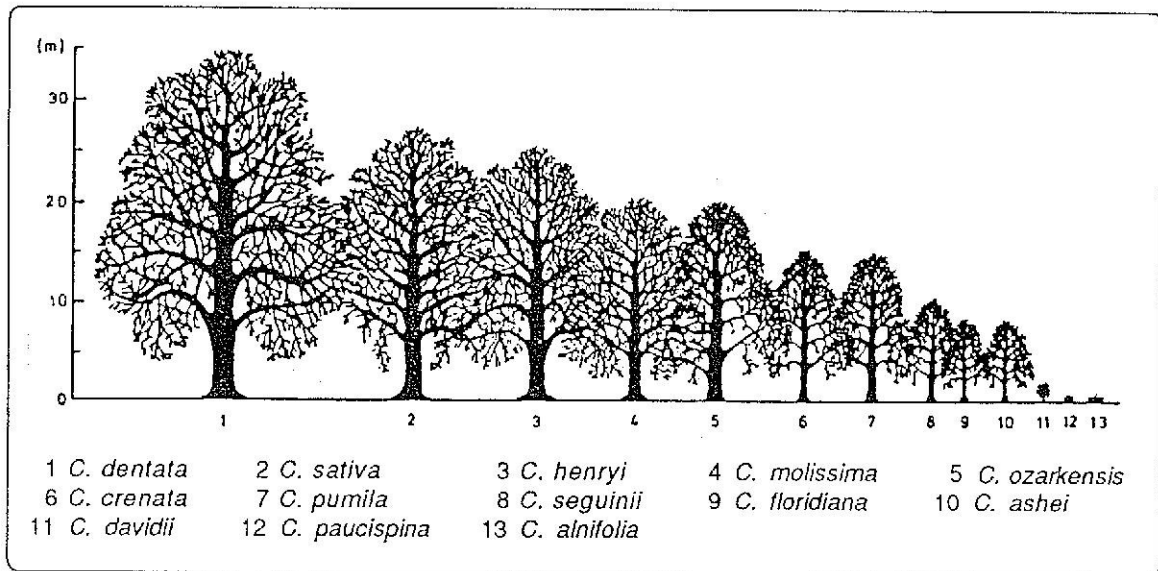


Fig. A1. Dimensões máximas de várias espécies de castanheiro. (Adaptado de Vieitez *et al.*, 1986, seg. Bazzigher *et al.*, 1982)

O castanheiro europeu é considerado uma árvore de grande porte e longevidade, com crescimento rápido até aos setenta, oitenta anos (com acréscimos de 10-25 mm de diâmetro/ano, o que é significativo para espécies com lenho de alta qualidade) idade a partir da qual estabiliza, podendo nesta fase atingir alturas de 20 a 30 metros, com copa ampla e semiesférica, suportada por grossos ramos que, em idade avançada, tendem para a horizontal.

O sistema radicular é constituído por raízes profundas e robustas desde que o solo o permita e, se houver dificuldades de penetração, desenvolve abundante e longo sistema radicular horizontal.

Prefere solos ligeiros, frescos e bem drenados, á base de areias siliciosas, de saibros graníticos ou provenientes da decomposição de xistos, gneisses, grés, terras vulcânicas, de aluviões profundos com taxas de argila pouco elevadas e sem calcário, onde o pH não ultrapasse os 6 - 6.5. É, sem dúvida, uma espécie de altitude onde em regime de talhadia e alto fuste cresce até aos 1200 - 1300 m e, em produção de fruto, até cerca dos 800 m.

As condições climáticas exigidas variam desde o marítimo atlântico (com inverno ameno e verão pluvioso), mediterrânico (verão quente e seco) ao continental (inverno ri-

goroso e verão quente). Com necessidades de água da ordem dos 700 mm por ano, com exigências no final do verão (Agosto-Setembro), período durante o qual os frutos se desenvolvem até ao seu tamanho final.

Os rebentos do ano das árvores jovens em crescimento são pequenos mas com diâmetro considerável. As folhas são alongadas e muito dentadas. Os gomos são grossos, de forma triangular com disposição filotáxica do tipo 2/5. Os ouriços têm dimensão variável, os mais frequentes são pequenos, para os tipos indígenas e florestais, e de grandes a muito grandes para os tipos fruteiros de boas variedades (8 a 15 cm de diâmetro). Os ouriços desenvolvem-se nos ramos do ano e localizam-se na parte terminal a sub-terminal. Os espinhos são rígidos, com ramificações intrincadas e mascaram a parede externa constituída por quatro válvulas.

A base dos frutos possui uma cicatriz, testemunho da sua inserção no ouriço. Esta cicatriz, ou hilo, é variável em dimensão podendo a sua linha de contacto com o pericarpo ser ondulada e portadora de pilosidade.

As flores masculinas estão agrupadas quer sobre os amentilhos unissexuais, quer sobre a parte superior dos amentilhos andróginos, tendo na base as inflorescências das flores femininas. O grão de pólen é muito pequeno, 14 μm de diâmetro para pólen de genomas diplóides e 17 μm para pólen de genomas tetraplóides (Dermen e Diller, 1962)

Segundo a presença ou ausência de estames por um lado, e o comprimento deles em relação ao perianto da flor por outro, os castanheiros podem ser:

- i) sem estames, logo sem pólen;
- ii) braquiestaminados, filetes com 1 a 3 mm de comprimento, as anteras não ultrapassam o perianto, com pouco pólen;
- iii) mesoestaminados, filetes com 3 a 5 mm de comprimento, as anteras não ultrapassam o perianto, pouco pólen;
- iv) estames longos, filetes com 5 a 7 mm de comprimento, as anteras ultrapassam largamente o perianto e pólen abundante.

Como consequência, os castanheiros sem estames, os braquiestaminados e os mesoestaminados não deverão nunca ser escolhidos como polinizadores.

A antese das flores masculinas dá-se, para os castanheiros indígenas, de acordo com os anos, da segunda quinzena de Junho para os mais precoces, a meados de Julho para os mais tardios. As flores femininas estão agrupadas de uma a cinco, em inflorescências localizadas na base dos amentilhos andróginos. Cada flor contém vários óvulos, podendo dar um fruto com uma ou mais sementes. As flores femininas consideram-se em plena

floração quando todos os estigmas das flores centrais e laterais estão totalmente desabrochados. Esta fase corresponde ao período de máxima receptividade das flores femininas e, por consequência, à melhor possibilidade de fecundação.

A polinização está fortemente correlacionada com as condições climáticas que existem durante o período de floração, de meados de Junho a meados de Julho. Com efeito, o pólen não pode libertar-se das anteras senão em condições de temperatura elevada (15 a 18°C) e de humidade baixa que favoreçam o seu transporte, quer pelos insectos, quer pelo vento. Os castanheiros sem estames, os braquiestaminados e os mesoestaminados, com pouco pólen, são incapazes de autofecundação, pelo que esta só seria possível pelos castanheiros de estames longos. No entanto a taxa de autofecundação é muito reduzida (menos de 10 frutos em 100 ouriços) quando comparada com os valores médios de fertilidade da mesma árvore com fecundação livre (165 a 225 frutos em 100 ouriços), com uma taxa de autogamia de 7% (McKay, 1942).

Assim, com exigência de fecundação cruzada, uma produção máxima de frutos só poderá ser assegurada se a escolha dos polinizadores for realizada tendo em conta três aspectos:

- i) boa intercompatibilidade genética com a variedade base (aptidão que deverá ser determinada previamente por cruzamentos controlados);
- ii) boa simultaneidade de períodos de floração, traduzindo-se por uma estreita concordância entre o período de emissão do pólen pelo polinizador e o período de receptividade máxima das flores femininas da árvore a fecundar (concordância obtida nos locais de plantação da variedade base, por estudos fenológicos precisos e desenvolvidos ao longo de vários anos sucessivos);
- iii) boa adaptação ecológica no local de plantação.

Todas as espécies do género *Castanea* têm igual número de cromossomas, $2n=24$ (Jaynes, 1962) e as espécies híbridas que têm sido estudadas são androestéreis bem como algumas espécies chinesas e japonesas (Jaynes, 1963a), sendo esta androesterilidade de origem citoplásmica em muitas das árvores observadas. Se assim for, todas as plantas provenientes de sementes destas árvores deveriam ser também estéreis masculinas, mas tal não foi ainda confirmado. Jaynes (1964) reuniu em pormenor a informação da primeira geração de cruzamentos interespecíficos e enumerou aqueles que verificou serem verdadeiros híbridos, utilizando como marcadores a presença de caracteres dados pelos progenitores. Cruzamentos entre cada um dos grupos deram taxas de produção de sementes superiores aos de cruzamentos entre espécies dos dois grupos. Jaynes concluiu que "existem

barreiras genéticas entre as espécies e os subgéneros no género *Castanea*, mas elas são variáveis e incompletas".

1.2 - Importância económica

O castanheiro desempenhou desde sempre um importante papel na economia rural das populações mais desfavorecidas das regiões interiores do nosso país. A castanha é utilizada para a alimentação humana e dos animais e parte dela é vendida, o que permite obter alguns dividendos. O aproveitamento do lenho, de características excepcionais para a indústria de mobiliário e de tanoaria é uma segunda fonte de rendimento.

Esta situação de dupla função do castanheiro, produtor de fruto e produtor de madeira, é hoje posta em causa pelas exigências da fruticultura moderna, que propõe uma delimitação das regiões e áreas segundo as suas características edafo-climáticas e definir, quais as de potencialidade para o castanheiro produtor de fruto e quais as de potencialidade para a exploração do castanheiro em talhadia e alto fuste.

Em termos de produção de fruto é unanimemente reconhecida a superior qualidade das castanhas portuguesas, sendo de referir entre as variedades mais comercializadas a Longal, Judia, Verdeal, Martainha, Côta, Lada, Bária, Colarinha e Negral.

As regiões mais importantes de distribuição geográfica desta espécie são as de Trás-os-Montes (Carrazeda de Montenegro, Bragança e Vinhais), Beira Interior (Trancoso, Sabugal e Guarda), Beira Litoral (Sernancelhe, Satão, Vila Nova de Paiva e Moimenta da Beira) e com menor significado, Alentejo (Castelo de Vide, Marvão e Portalegre) (Tab. A1).

Este valor actual contrasta bastante com as áreas potenciais para esta espécie, que poderão atingir os 50000 ha.

Na Tabela A2, está indicada a produção de castanha e os valores do comércio externo no período de 1980 a 1987 no Continente. Da sua análise, torna-se evidente o contínuo decréscimo na produção e a importante procura externa de castanha que levou, em 1988, à quase total exportação da produção e a que correspondeu uma entrada de divisas superior a um milhão de contos. Daqui se deduz o acentuado valor crescente deste fruto.

Tabela A1. Distribuição geográfica do castanheiro (1000 ha).

Distrito	Puros	Domin.	Total
V. Castelo	.3	.2	.5
Braga	.3	.6	.9
V. Real	3.8	.0	3.8
Bragança	11.6	.0	11.6
Aveiro	.2	.0	.2
Viseu	3.7	.0	3.7
Guarda	6.3	1.2	7.5
Coimbra	.5	.0	.5
C. Branco	1.4	.3	1.7
Portalegre	1.4	.1	1.5
Faro	.2	.0	.2
TOTAL	29.7	2.4	32.1

Fonte: Direcção Geral das Florestas, 1989.

Os países da Comunidade, para a série de anos analisada, têm vindo a aumentar as importações de castanha com origem em Portugal (Tab. A3). É hoje aceite que a exportação de castanha, quer para consumo em espécie, quer de castanha congelada, tem boas perspectivas, dadas as previsões de aumento do consumo no mercado comunitário, e devido ao facto de as suas importações terem como origem principal os estados membros, o que poderá funcionar como um incentivo ao desenvolvimento do sector no país.

Tabela A3. Castanha exportada para a CEE, em % do total de exportações.

Anos	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987
%	31.1	28.6	20.7	45.9	49.6	63.8	31.8	77.7

Fonte: INE, Estatísticas do Comércio Externo

Tabela A2. Produção e valores do comércio externo de castanha no Continente.

Anos	Produção ton	Importação		Exportação	
		ton	10 ³ esc	ton	10 ³ esc
1980	20224	-	-	6149	232018
1981	18200	-	-	2946	147605
1982	17290	-	-	4571	344860
1983	18846	-	-	4009	312146
1984	17901	-	-	4274	378827
1985	17005	-	-	6494	588404
1986	16325	-	-	5221	603639
1987	18000	48	4122	8569	737924
1988	14500	.3	76	12200	1083976

Fonte: INE, Estatísticas Agrícolas

Os operadores comerciais a nível mundial e especialmente a nível da Comunidade, referem-se à nossa castanha como sendo de excelente qualidade, o que tem beneficiado a sua procura e cotação e, estima-se que 50000 ton não chegassem para satisfazer a procura. Ora a obtenção deste quantitativo não se coaduna com os sistemas de produção tradicional. Assim, é fundamental actuar em dois sentidos:

- i) revalorizar os antigos soutos, com baixas produções, quer através da sua transformação em manchas produtoras de madeira quando, devido ao isolamento ou condições topográficas, não seja possível rentabilizar a produção de fruto, quer através do recurso à enxertia como processo de rejuvenescimento;
- ii) ao nível das novas plantações, promover a selecção e produção de material vegetal, variedades e porta-enxertos e aplicar novas técnicas de implantação e condução.

Tabela A4. Importação e exportação de madeira de castanheiro.

Anos	Importação		Exportação	
	Ton	10 ³ esc	Ton	10 ³ esc
1980	*	*	*	*
1981	*	*	*	*
1982	*	*	*	*
1983	6524	99392	1	27
1984	11176	168948	25	486
1985	17034	320767	-	-
1986	35900	725590	-	-
1987	49230	1056730	1	220
1988	57732	1296595	387	7341
1989**	54374	1332286	70	858

* não era individualizado ** provisório

Fonte: INE, Estatísticas do Comércio Externo.

Em relação à produção de madeira, de acordo com as fontes estatísticas disponíveis, não foi possível obter dados relativos da produção, pelo que apenas se apresentam na Tabela A4, dados relativos à exportação e importação de madeira de castanheiro nos últimos dez anos, sendo de registar o crescente aumento nas importações e o pouco significado que têm as nossas exportações.

1.3 - Principais doenças

Apesar de estarem identificadas várias doenças no castanheiro, algumas comuns a outras espécies, tais como a ferrugem alaranjada do entrecasco do sobreiro, causada pela *Endolhiella gyrosa* Sacc., o carvão do entrecasco do sobreiro, causado pela *Nummularia regia* (De Not) Sacc., a podridão branca das raízes, causada pela *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl., a seca das folhas do castanheiro, causada pela *Phleospora castanicola* (Desm.) Sacc., sobressaem pela sua importância, devido a um certo carácter epidémico em determinados países, o chamado cancro do castanheiro, causado pelo fungo *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr (*Endothia parasitica*) e a doença da tinta provocada pelos fungos *Phytophthora cinnamomi* Rands e *P. cambivora* (Petri) Buis.

A *C. parasitica* foi responsável pelo quase total desaparecimento do castanheiro americano (*Castanea dentata*) dos Estados Unidos durante o final do século passado e princípio deste, onde em pouco mais de 50 anos uma área superior a 40 milhões de hectares foi completamente dizimada, tendo sido introduzida na Europa provavelmente no final da 1ª Guerra Mundial. Em Itália fez importantes estragos na região de Campanil e de Piémont, após o que foi perdendo todo o seu carácter de virulência como consequência do aparecimento dum fenómeno curioso, a hipovirulência exclusiva contagiosa (Grente, 1975a). Em França é detectada depois da 2ª Guerra Mundial, mais tarde em Espanha e, em Portugal, identificou-se em 1989 um primeiro foco infeccioso na região de Braga.

Quanto à doença da tinta é, sem dúvida, a que tem causado maiores prejuízos a nível do continente europeu e, em Portugal, ela é não só responsável pela drástica redução da área de cultura (Fernandes, 1966) como também pelo estrangulamento na expansão desta espécie, já que a *Castanea sativa* não apresenta imunidade aos fungos causadores desta doença.

O sistema radicular é o local escolhido para iniciar o ataque (Grente, 1975b), começando pelas extremidades das radículas e progredindo em direcção ao colo, atacando progressivamente a casca das raízes de diâmetro cada vez maior acabando por atacar a base do tronco. As lesões consistem numa destruição do câmbio, pelo que o crescimento em diâmetro pára. Como resultado surge o fendilhamento da casca e consequente perda dos

translocados floémicos o que torna impossível o fornecimento de nutrientes à parte aérea da planta, o que se traduz por um emurchecimento e morte progressiva das extremidades da copa.

A primeira sintomatologia é o porte pendente das folhas do cume, tornando-se a silhueta da árvore muito característica: os ouriços das extremidades dos ramos não são tapados pelas folhas destacando-se facilmente no céu como fundo. De seguida as folhas amarelecem, podendo cair prematuramente ou ficando fortemente agarradas aos ramos, tal como os ouriços, durante o período Outono/Primavera, evoluindo a doença ao longo de vários anos e muito de acordo com as características climáticas anuais (Grente, 1975b).

Um aspecto a referir, é que a doença da tinta só muito raramente aparece em castanheiros de exploração florestal em sistema de talhadia. Uma explicação possível para tal facto tem a ver com o vigoroso rebentamento na base do tronco que se regista com este sistema de exploração, e que induz uma rápida e intensa formação de raízes. Estabelece-se então uma competição entre o poder destruidor dos fungos e o poder de regeneração do tronco através da formação de novos rebentos e, em condições naturais, a vitória vai para a árvore (Grente, 1975b).

Este facto testemunha uma indicação de como o parasitismo da *Phytophthora sp.* está de certo modo condicionado por factores que o favorecem ou inibem.

Para além destas influências do sistema de exploração e das condições ambientais, também pela análise do mecanismo genético da resistência a estes fungos, tem sido possível extrair preciosas indicações. Assim se começou a trabalhar no sentido de seleccionar porta-enxertos e/ou produtores directos resistentes à doença. Segundo Grente (1975b), duas estratégias podem e devem ser desenvolvidas em simultâneo:

- i) identificação e selecção de árvores que localizadas em zona de forte contaminação, tenham resistido aos ataques da doença durante dezenas de anos, sendo então prova de uma resistência natural, nas condições onde se encontravam. A ideia de multiplicar vegetativamente este material, com constituição de campos de pés-mães, encontra assim uma forte base de apoio;
- ii) constante e permanente identificação de novos genótipos com indexagem sistemática à prova de resistência à doença por inoculação, o que dá resultados rápidos.

Para além destas metodologias torna-se também imperioso pensar em proteger, dentro do possível, as plantações existentes, e dentro deste domínio as investigações sobre os efeitos protectores de micorrizas têm demonstrado resultados bastante prometedores,

permitindo já conhecer alguns mecanismos de acção, dos quais se podem citar (Grente, 1975b):

- i) o manto do micélio que envolve a raiz micorrizada, e que constitui um novo tecido, pode-se apresentar como uma barreira mecânica contra a infecção;
- ii) o fungo micorrízico pode segregar determinadas substâncias com efeito antibiótico, ou influenciar a própria microflora das raízes, no sentido de favorecer um antagonismo, ou mesmo a produção de substâncias tóxicas para o parasita;
- iii) a simbiose com o fungo pode alterar o metabolismo da planta, por exemplo, promovendo a síntese de certas substâncias de acção fungicida.

Uma outra razão para continuar as pesquisas nesta área da micorrização, prende-se com a possibilidade de produção de cogumelos comestíveis ou outros, podendo assim dar um rendimento acrescido aos proprietários de soutos e castinçais.

1.4 - Técnicas convencionais de propagação clonal

A propagação assexual, mecanismo de reprodução a partir de estruturas vegetativas da planta progenitora é possível, porque qualquer célula vegetal contém toda a informação genética necessária para regenerar uma planta completa, sendo esta característica peculiar das células vegetais, conhecida por totipotência celular. Esta reprodução vegetativa pode dar-se por formação de rebentos e raízes adventícias, ou pela união de partes vegetativas, isto é, por enxertia.

Podem-se enumerar seis principais razões que justificam a utilização destas metodologias para a propagação de plantas:

- i) manutenção de clones. A propagação vegetativa faz uso exclusivo de divisões mitóticas, onde a divisão do material genético é feito de uma forma equacional para as células filhas; como tal, está garantida a uniformidade genotípica da descendência à qual se dá o nome de clone (Shull, 1912; Stern, 1943). Este processo é de particular importância para as espécies floro-horto-frutícolas, as quais são fortemente heterozigóticas, pelo que as características de interesse económico seriam perdidas de imediato se fossem propagadas por semente;
- ii) propagação de plantas sem semente. É o único processo de propagar espécies que não produzem semente viável, tal como acontece com algumas variedades

- des e/ou cultivares de bananeira, figueira, laranjeira e videira;
- iii) evitar longos períodos de juvenilidade. Plantas que crescem de semente, em particular lenhosas e herbáceas perenes, apresentam normalmente um longo período de juvenilidade, no qual não ocorre floração. Uma vez atingida a fase de floração, ela passa a ocorrer regularmente. A propagação vegetativa retém esta capacidade de floração e diminui significativamente esta fase juvenil sem floração;
 - iv) condução na forma de crescimento. Durante a fase juvenil as plantas apresentam, normalmente, diferentes padrões de crescimento, o que pode ser parcialmente orientado pela propagação vegetativa;
 - v) cruzamentos inter e intra-específicos. A possibilidade de proceder a cruzamentos deste tipo, que por via sexual são muitas vezes impossibilitados por mecanismos de incompatibilidade, torna este processo de reprodução extraordinariamente importante sob o ponto de vista do melhoramento;
 - vi) económicas. Em geral, a propagação vegetativa em larga escala, não é mais económica quando comparada com a propagação por semente, mas a sua utilização é justificada pela superior qualidade do material vegetal obtido. No entanto, é de notar que a propagação vegetativa reduz grandemente a fase de juvenilidade e como tal, o tempo de entrada em produção.

Para o castanheiro, a manutenção das características genotípicas (manutenção clonal), a redução do período de juvenilidade, o controle no crescimento da planta, os cruzamentos inter e intra-específicos e, finalmente, os aspectos económicos que atrás foram enumerados, são factores determinantes para que a propagação desta espécie para a produção de fruto seja por via vegetativa. Mas também sob o ponto de vista de aproveitamento do lenho as metodologias de propagação vegetativa têm potenciais vantagens sobre a propagação por semente.

É opinião generalizada desde há muitos anos, de que o castanheiro é uma espécie de difícil enraizamento, o que significa que o enraizamento por estacas, método mais produtivo sob o ponto de vista de propagação vegetativa é, com base nos trabalhos publicados, de realização difícil e economicamente inviável. Fracassos obtidos com a utilização desta técnica foram sucessivamente citados por Urquijo (1952), Schad *et al.* (1952) e Vieitez (1952). Areses e Vieitez (1970) verificaram que as estacas de castanheiro adulto contêm inibidores de crescimento, detectados pelo teste do coleóptilo da aveia, e inibidores do processo de enraizamento, pelo que estes dois grupos de substâncias químicas devem

desempenhar um papel determinante na fraca capacidade rizogénica do castanheiro (Vieitez, 1981).

Jaynes e Messner (1967), descreveram metodologias para enraizamento de estacas com algum sucesso, utilizando estacas de rebentos basais, mas a forte variação interclonal que se registou na capacidade de enraizamento e de sobrevivência, tornam estas metodologias pouco praticáveis em larga escala, isto é, apesar da taxa de enraizamento ser elevada, a capacidade de sobrevivência ao primeiro inverno pode ser muito baixa (Jaynes, 1976).

Face às dificuldades surgidas, tentaram-se outros métodos de propagação assexual, sem no entanto ter sido ainda possível eleger um método verdadeiramente eficaz. Urquijo (1946) tentou, embora sem qualquer êxito, o "air-layering" e, apesar de se ter conseguido a indução de rizogénese mediante a aplicação de várias auxinas (Vieitez, 1961, 1963), este processo depende em muito do tipo e idade do ramo.

Em relação às técnicas convencionais de enxertia, nas suas diferentes variantes, elas têm sido utilizadas com relativo êxito (Shafer, 1966), sendo a incompatibilidade entre cavalo e garfo uma das principais preocupações em tais metodologias. Moore (1963), introduziu a enxertia em castanha germinada, e os seus estudos serviram de base para se ensaiarem novos métodos de enxertia em cavalos juvenis (Jaynes e Messner, 1967; Park, 1967, 1968, 1969) e em hipocótilos (Vieitez e Vieitez, 1981b).

O método mais utilizado para a propagação vegetativa de génotipos seleccionados, tem sido a amontôa. Foi usado pela primeira vez em França, por Schad *et al.* (1952), com anilhamento dos rebentos e posteriormente em Espanha por Vieitez (1955), com aplicação de auxinas, em Portugal por Fernandes (1972), que utilizou o anilhamento e a aplicação de auxinas em simultâneo, e na Suíça por Bazzigher *et al.* (1982).

Esta técnica permite obter plantas enraizadas e com manutenção fenotípica da planta mãe. A aptidão de enraizamento varia de acordo com as espécies e também entre clones. As plantas destinadas à amontôa são dispostas em condições normais de plantação. As plantas são depois decepadas a 10-15 cm do solo ou do ponto de enxertia, no caso de plantas enxertadas, sendo neste caso importante controlar os rebentos do porta-enxerto. Para a execução da amontôa é mais importante o estado fisiológico dos rebentos do que a sua espessura, pelo que se devem preparar no seu estado herbáceo, para que os resultados sejam melhores. Este estado decorre entre finais de Maio e princípios de Junho. As operações consistem em retirar as folhas até 20 cm de altura, pincelar com uma auxina, e colocar na base do rebento um arame fino, que não deverá ficar a exercer pressão sobre o rebento, e isto para que o estrangulamento se dê de uma forma progressiva à medida que o ramo engrossa, devendo ter o cuidado de deixar dois a três rebentos como "respi-

radores". Em seguida cobre-se com terra e a recolha dos rebentos pode-se iniciar quando da queda das folhas em Novembro/Dezembro (Fig. A2), devendo os rebentos enraizados permanecer 1 a 2 anos em viveiro antes de serem instalados em locais definitivos.

Em relação à enxertia ela é praticada sobre porta-enxertos seminais, rebentos de talhadia, ou sobre árvores já produtoras quando se pretende reconversão do souto. As técnicas de enxertia utilizadas variam de acordo com a época do ano em que se pretende executar tal operação, mas as mais utilizadas em viveiro, e sobre plantas seminais de um ano são, a fenda simples e a inglesa e a enxertia em borbulha, com ou sem tecido associado. Enxertias sobre indivíduos adultos, já em pomar, são geralmente em fenda ou em coroa, mas também de borbulha.



Fig. A2. Rebentos de castanheiro obtidos por amontôa

2. Programas de melhoramento genético

Quando se pretende planificar programas de melhoramento genético para o castanheiro, eles terão que ter em conta uma dupla finalidade: melhoramento das características culturais sob o ponto de vista da produção de fruto e de lenho, e a obtenção de material vegetal resistente às doenças.

Sem dúvida que o segundo objectivo é nesta fase prioritário, já que em relação à qualidade e quantidade de fruto podemos afirmar que as nossas variedades são susceptíveis de fornecer toda uma gama de variabilidade capaz de as adaptar às diferentes condições edafo-climáticas, bem como no que diz respeito à possibilidade de fruto para transforma-

ção industrial, quanto à qualidade do lenho, a selecção de árvores elite permitirá também dispôr de material vegetativo em abundância.

Já em relação ao segundo objectivo, obtenção de material vegetal resistente, as soluções têm-se mostrado bem mais complicadas. Uma primeira medida foi a utilização de espécies exóticas, a *C. molissima* e a *C. crenata* portadoras de genes de resistência à doença da tinta, mas cedo se verificou que estas duas espécies eram bem mais exigentes sob o ponto de vista edafo-climático (Fernandes, 1953). Na produção de fruto, tentou-se a utilização destas espécies como porta-enxertos para as nossas variedades, no entanto também rapidamente se verificou uma grande incompatibilidade, pelo que esta via foi também abandonada.

Assim, em Portugal, tal como em outros países europeus, em face da resistência quase nula da *C. sativa* à doença da tinta, recorreu-se à hibridação desta espécie com espécies exóticas, em especial a *C. crenata*, como portadoras de genes de resistência. Os objectivos pretendidos eram comuns a qualquer programa de hibridação, isto é, conseguir reunir num indivíduo características importantes que se encontram dispersas pelos seus progenitores e, eventualmente, obter o chamado vigor híbrido ou heterosis.

Para conseguir tais objectivos, a metodologia mais indicada seria a que permitisse transmitir os genes de resistência que possuem os castanheiros exóticos para o castanheiro europeu. Para isso executaram-se retrocruzamentos sucessivos a fim de aumentar a incorporação de genes do progenitor recorrente, bem como os genes de características importantes do dador. Um detalhado programa de melhoramento, mas neste caso para a incorporação de genes de resistência à *C. parasitica* no castanheiro americano, é apresentado por Burnham (1986, 1988) e ilustra de uma forma muito concisa as diferentes fases de programas deste tipo.

Há no entanto que fazer referência a um aspecto importante nestes programas de melhoramento e que tem a ver com a finalidade da utilização das árvores, ou seja, para a produção de fruto ou para a produção de madeira.

Em relação à sua exploração florestal, segundo Gomes (1982), a aplicação dos resultados obtidos nestes cruzamentos deveria desenvolver-se segundo duas vias:

- i) constituição de povoamentos por via agâmica com base nos melhores clones, desde que o enraizamento de propágulos proporcionasse fácil e rápida multiplicação, o que não acontece;
- ii) a partir dos melhores clones e com uma base genética ampla, constituir pomares produtores de semente para a instalação de povoamentos por via seminal.

Para a produção de fruto a estratégia terá que passar numa primeira fase, pela utilização dos clones de *C. sativa* e híbridos considerados resistentes e que à partida poderão garantir uma melhor afinidade para com as variedades portuguesas. Segundo Gomes (1988), existem pelo menos 20 clones de *C. sativa* considerados resistentes. Em termos futuros e no sentido de aumentar a "pool" genética, deverão desenvolver-se polinizações controladas com cruzamentos entre clones de *C. sativa* considerados resistentes, entre clones híbridos e retrocruzamentos da população híbrida com os clones de *C. sativa* (Gomes, 1988), devendo as novas plantas ser testadas, o que vem de encontro aos pressupostos de Grente já referidos.

Mas só a possibilidade de multiplicar em larga escala os indivíduos seleccionados, permitirá o desenvolvimento e concretização destes programas. Contudo, a quase total autoesterilidade do castanheiro, não permite a obtenção de linhas com genótipo estável, pelo que a multiplicação vegetativa é a única via a explorar.

Em relação às metodologias clássicas de propagação vegetativa possíveis de serem utilizadas neste género, as suas deficiências e dificuldades já referidas, não têm permitido responder de uma forma positiva, tornando-se assim num importante estrangulamento, tendo as modernas biotecnologias que fazem uso da cultura de tecidos vegetais *in vitro* aplicadas à propagação de plantas, demonstrados já, serem possuidoras de enorme potencial, capazes de serem alternativa eficaz às metodologias clássicas.

II. A CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS *IN VITRO*

1. Aspectos históricos

Os princípios fundamentais que suportam a possibilidade de cultivar tecidos vegetais em condições artificiais, estão contidos no conceito de totipotência celular. De facto, a célula vegetal tem capacidade de autonomia e, como tal, capacidade de regenerar até se obter uma nova planta completa. Se isto era óbvio para o caso de esporos e zigotos, já o mesmo não era para o caso de células somáticas.

A primeira tentativa de cultivar células e/ou tecidos vegetais, surgiu com Haberlandt em 1902. Embora não tenha sido bem sucedido, este investigador é hoje considerado como o fundador da cultura de tecidos vegetais em meios de cultura artificiais. Entre 1907 e 1927 vários botânicos, alguns alunos de Haberlandt, referenciaram tentativas para

fazerem crescer células adultas, mas todas elas sem grande sucesso (Gautheret, 1982), ao contrário dos êxitos que se obtinham na área da cultura de tecidos animais.

Em 1927 Went, conseguia isolar a primeira substância de natureza auxínica, as quais promovem crescimento celular. Quimicamente verificou-se que se tratava do ácido 3-indol acético, substância esta que já havia sido descoberta e isolada há vários anos atrás por Salkowski, em 1885. Logo que se começaram a verificar os efeitos desta substância nos tecidos vegetais, três autores, White, Nobécourt e Gautheret publicam, em 1939, independentemente, resultados obtidos no êxito de cultura de tecidos vegetais *in vitro*, por longos períodos de tempo, sendo estes trabalhos considerados como pioneiros. Desde então que o ritmo das descobertas foi sendo cada vez maior. A utilização de novas substâncias, como o leite de coco, proporcionou um novo incremento, permitindo inclusive a cultura de embriões de monocotiledóneas, bem como elevadas taxas de proliferação celular em tecidos de cenoura (Caplin e Steward, 1948). Em 1955, Miller, Skoog e colaboradores conseguem isolar e identificar a substância constituinte do leite de coco e que tão extraordinários resultados estava a permitir obter, à qual foi dado o nome de cinetina (Miller *et al.*, 1955, 1955a)

Os numerosos ensaios de associação de auxinas com citocininas e a apresentação de novas formulações nutritivas cada vez mais adaptadas às necessidades fisiológicas das células vegetais propostas, entre outros, por Heller (1953), Murashige e Skoog (1962), White (1963), Gamborg *et al.* (1968), Schenk e Hildebrandt (1972) e Greshoff e Doy (1972), permitiram que uma cada vez maior diversidade de células, tecidos e órgãos pertencentes a diferentes espécies fossem possíveis de estabelecer *in vitro*.

Estas técnicas foram rapidamente aplicadas a estudos de morfogênese, permitindo a comparação do desenvolvimento da estrutura da planta obtida *in vitro* com o da planta crescendo em ambiente natural e, como tal, significativos acréscimos do conhecimento nas áreas de histogênese e organogênese. Com base nestes estudos cedo se verificaram as potencialidades destes sistemas de regeneração *in vitro* na propagação de plantas, o que mais tarde se viria a chamar de micropropagação ou propagação *in vitro*. A sua primeira aplicação com grande sucesso foi feita por Morel (1960, 1964) para a obtenção de plantas isentas de vírus e propagação clonal de orquídeas.

Em 1950 surgia um trabalho pioneiro, apresentado por Levine, onde se refere pela primeira vez a obtenção de embriões somáticos a partir de culturas de *calli* de cenoura, surgindo com ele a possibilidade da confirmação definitiva da totipotência celular. Outra área em que a utilização dos sistemas de cultura de tecidos começava a ganhar importância era a da genética e melhoramento vegetal. Assim, várias foram sendo as referências de êxitos, tais como, diferenciação em embriões somáticos haplóides (Guha e Mahes-

wari, 1964) com a conseqüente regeneração de plantas completas (Bourgein e Nitsch, 1967) e a integração de DNA estranho por células vegetais (Ledoux, 1965). A obtenção de protoplastos por acção de sistemas enzimáticos e a sua relativa facilidade em serem cultivados em meios sintéticos, com reacquirição da capacidade meristemática permitiu a Takabe, Labibe e Melchers (1971) obterem as primeiras plantas regeneradas a partir de protoplastos, e o seu posterior uso em sistemas de hibridação somática, estando assim ultrapassada a barreira da incompatibilidade sexual imposta pela natureza. Ainda na área do melhoramento, foi reconhecido o potencial das metodologias de cultura de tecidos na obtenção de variabilidade genética, e o termo variação somaclonal, foi introduzido por Larkin e Scowcroft em 1981. Como últimos êxitos, estão a obtenção de plantas transformadas a partir da incorporação de genes estranhos via vectores (Murai *et al.*, 1983; Horsch *et al.*, 1984; Klee *et al.*, 1987).

2. Sistemas de cultura de tecidos e suas aplicações

Desde o início da utilização das metodologias de cultura de tecidos vegetais *in vitro*, que foram facilmente constatadas as enormes vantagens e potencialidades destes sistemas para o estudo e compreensão de mecanismos fisiológicos do mundo vegetal, de tal forma que hoje em dia, a sua aplicação está alargada a campos tão distintos como a biologia celular, fisiologia, genética, fitopatologia, agricultura, horticultura, silvicultura e indústria.

Foi com base na utilização dos diferentes sistemas de cultura de tecidos que foi possível aprofundar e obter novas linhas de investigação. Assim, as culturas de *calli*, que podem ser obtidas quer directamente dos explants iniciais, quer de células já em cultura, são hoje utilizadas como excelentes meios para obtenção de organogénese indirecta (Reinert e Bajaj, 1977; Ammirato, 1983; Evans *et al.*, 1983; George e Sherrington, 1984; Pierik, 1987), de rebentamento adventício, quer por embriogénese somática quer por cultura de células em suspensão (George e Sherrington, 1984); são um extraordinário meio no campo do melhoramento, através da obtenção de variabilidade somaclonal (Sibi, 1976; Oono, 1981; Dulieu e Barbier, 1982; Ahuja, 1987), tendo ainda aplicação no campo da fisiologia (Reinert e Bajaj, 1977), patologia (Ingram, 1977) e criopreservação (Finkle e Ulrich, 1983).

A cultura de células em suspensão, é hoje utilizada para a produção de metabólitos primários e secundários (Tabata *et al.*, 1979 e Crocomo *et al.*, 1981) de grande aplicação industrial; é, teoricamente, um extraordinário sistema para propagação de plantas em larga escala; no campo da fisiologia permitiu estudar o comportamento da célula isolada,

sendo assim quebradas todas as interações a nível tecidual; no campo da patologia tornou possível o estudo da interação parasita/célula ao nível da acção de toxinas nas membranas e organitos, em ambiente controlado e livre de qualquer outro contaminante (Ingram, 1977).

A cultura de protoplastos tem permitido uma elucidação na especificidade e modo de acção de fungos e bactérias no metabolismo celular, em particular, nas bases genéticas da resposta de resistência ou de susceptibilidade das plantas a um factor específico (Ingram, 1977), já que a parede celular, que por vezes pode ser impeditiva dessa relação, está ausente, o que se torna de grande importância na relação célula/vírus. Estes sistemas têm permitido ainda significativos avanços no campo da genética e melhoramento (Handro, 1981; Gamborg *et al.*, 1981; Takabe *et al.*, 1971), já que por fusão é possível a obtenção de híbridos somáticos, com a consequente supressão de barreiras de incompatibilidade sexual, permitindo a obtenção de novas espécies aloplóides, sua utilização como pontes genéticas, aproveitamento da assimetria produzida por incompatibilidade somática, bem como possibilidade de induzir artificialmente essa assimetria. Os sistemas de protoplastos constituem ainda um óptimo sistema para aplicação da tecnologia de DNA recombinante e consequente obtenção de plantas transformadas (Ohyama, 1983; Sederof *et al.*, 1987; Lindsey e Jones, 1989).

A cultura de anteras e/ou grãos de pólen, tem sido um sistema utilizado, cada vez com maior êxito, para a produção de linhas homozigóticas por duplos haplóides, e mesmo para a obtenção de plantas haplóides por androgénese, com grande aplicação em programas de melhoramento (Nitsch, 1981; Bajaj, 1983).

Todos os sistemas atrás referidos podem ser considerados como sistemas de cultura desorganizados (George e Sherrington, 1984), já que em todos eles as células passam por uma fase de desdiferenciação, aumentando o volume tecidual com total ausência de estruturas organizadas e contendo apenas um limitado número de diferentes células especializadas. Ao contrário, os sistemas de cultura organizados, baseiam-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 (George e Sherrington, 1984), ou quando tais estruturas são formadas de novo a partir de tecidos desorganizados, processo designado por organogénese.

Dentro deste âmbito devemos referir a cultura de embriões, que tem permitido ultrapassar problemas de dormência de sementes ou de incompatibilidade pré ou pós-zigótica, permitindo ainda a aquisição de conhecimentos sobre processos fisiológicos e morfológicos no desenvolvimento de embriões vegetais (Pierik, 1987; Yeung e Thorpe, 1981). Têm ainda

sido utilizados como explants iniciais para a obtenção de culturas de *calli* com competência embriogénica (Vieitez *et al.*, 1990; Gingas e Lineberger, 1989).

A cultura de órgãos determinados, isto é, que estão destinados a possuir um tamanho e forma definidos, tais como folhas, flores e frutos, têm permitido o estudo de efeitos de reguladores de crescimento no desenvolvimento destes órgãos, mas é, sem dúvida, a cultura de órgãos com crescimento indeterminado, isto é, cujo crescimento é potencialmente ilimitado, tais como tecidos meristemáticos apicais de caules ou de raízes, que maior aplicação e impacto tem provocado na propagação vegetativa.

No caso de raízes, a descoberta de que elas podiam crescer em condições assépticas e isoladas (White, 1934), constituiu o primeiro passo no desenvolvimento das metodologias de cultura de tecidos e, desde então para cá, tem contribuído para estudos de fisiologia e metabolismo de aminoácidos, bem como nos processos de ramificação, de associação micorrízica (Rhodes, 1983), sistemas de nodulação com fixadores de azoto e outros simbiontes e ainda, para estudos de interacção entre raízes e organismos patogénicos, tais como fungos e nemátodes (Ingram, 1977).

De especial importância se reveste a utilização de meristemas e ápices caulinares, já que são o sistema até hoje mais utilizado na propagação vegetativa, e isto, porque apesar de todos os sistemas já referidos permitirem a regeneração de plantas completas, a propagação *in vitro* por gomos apicais e/ou axilares apresenta os mais baixos níveis de variabilidade genética, garantindo assim uma elevada manutenção da estabilidade genotípica e, conseqüentemente, fenotípica, dos indivíduos assim obtidos, embora as taxas de multiplicação sejam, em geral, inferiores aos sistemas que fazem uso de culturas desorganizadas.

Dois tipos de cultura têm sido utilizados, dependendo do tamanho do explant inicial. Assim, a cultura de meristemas, que consiste na utilização da extremidade do ápice, constituído exclusivamente por células meristemáticas, com dimensão entre 0.2 e 1 mm, e de grande aplicação na obtenção de plantas isentas de vírus (Skirvin, 1981; Boxus e Druart, 1986), e a cultura de ápices caulinares, que consiste na utilização de explants iniciais com dimensões que podem ir até aos 10 mm de comprimento, têm constituído dois extraordinários métodos de propagação de plantas. Se as condições de cultivo forem as indicadas para a espécie, ambos os tipos de cultura vão permitir o desenvolvimento de pequenos rebentos. Com tratamentos apropriados, os rebentos assim obtidos podem ser induzidos a desenvolver raízes, concluindo-se a obtenção da planta completa, ou podem ser utilizados como fonte de obtenção de explants secundários, para assim aumentar o número de rebentos disponíveis para enraizamento e posterior aclimação. As culturas de meristemas e gomos axilares são hoje também utilizadas para desenvolver sistemas

experimentais de criopreservação (Kantha, 1981), com a conseqüente formação de bancos de germoplasma.

2.1 - A micropropagação

De acordo com a terminologia proposta pela Associação Internacional de Cultura de Tecidos, entende-se por micropropagação ou propagação *in vitro*, a propagação de plantas em meios de cultura de formulação definida, mantidas em ambiente artificial controlado, utilizando contentores de plástico ou vidro, com manipulação em condições assépticas (IAPTC, 1985).

Foram os trabalhos de Murashige (1974) e posteriormente de Debergh e Maene (1981) que estabeleceram os princípios gerais de um sistema de micropropagação, tendo sido definidas cinco fases:

Fase 0: Selecção da planta mãe e preparação do explant.

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

Fase 1: Estabelecimento de uma cultura asséptica.

Inclui o isolamento do explant e sua colocação em condições assépticas no meio de cultura.

Fase 2: Fase de multiplicação.

De acordo com a metodologia utilizada o principal objectivo é conseguir propagar sem perda de estabilidade genética, tendo como factores mais importantes para o sucesso a formulação dos meios de cultura e as condições físicas do ambiente de crescimento.

Fase 3: Preparação para o crescimento em ambiente natural.

Inclui a formação de raízes adventícias, quer *in vitro* quer *in vivo*, podendo haver necessidade de uma fase prévia de alongamento dos rebentos obtidos na fase 2.

Fase 4: Transferência para o ambiente natural.

São determinantes nesta fase todo um conjunto de factores físicos, tais como

luz, humidade e temperatura, que devem ser alterados de forma gradual a fim de permitir à planta a sua autosuficiência fotossintética.

Teoricamente são vários os métodos hoje disponíveis para desenvolver sistemas de propagação *in vitro* (Fig. A3). Dentro deles podemos referir os sistemas de rebentamento axilar, utilizando como explant primário meristemas, ápices caulinares ou gomos nodais, sistemas de organogénese e/ou embriogénese directa, isto é, directamente do explant e, também, por organogénese e/ou embriogénese indirecta, isto é, passando por uma fase de *calli*, podendo depois estes *calli* serem também utilizados para obtenção de culturas de células em suspensão e de protoplastos com posterior regeneração da planta completa.

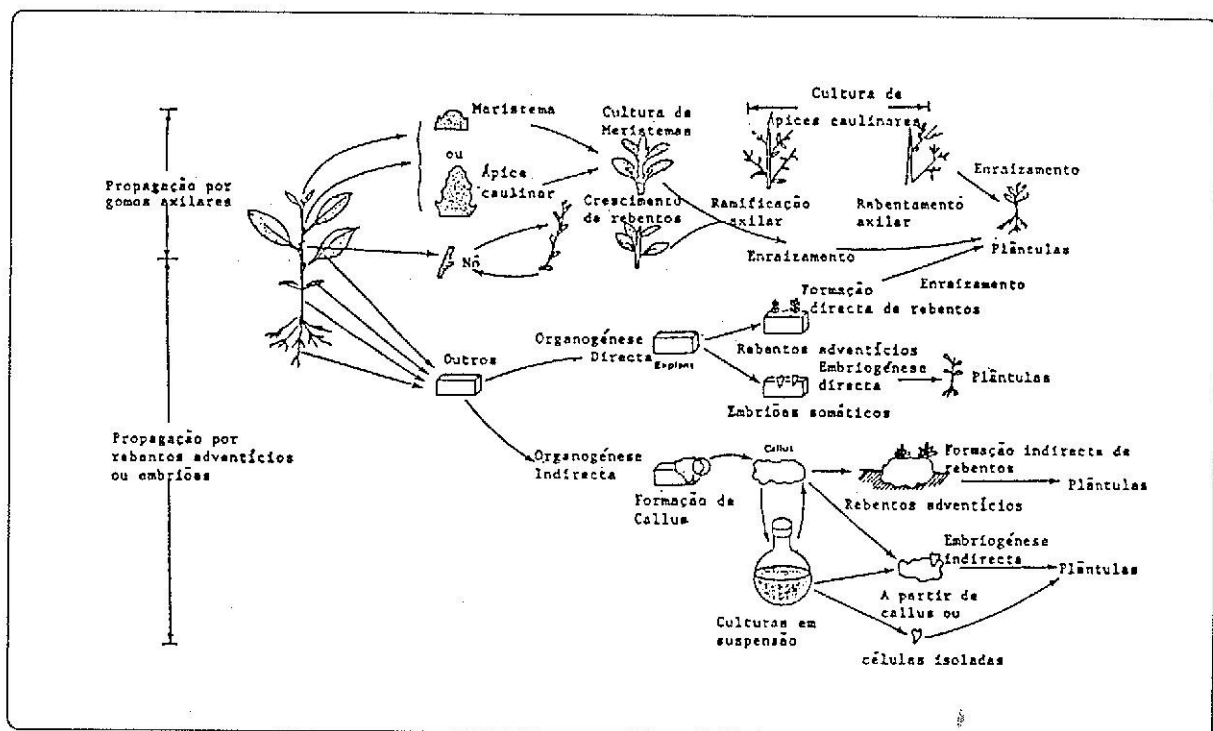


Fig. A3. Principais métodos de micropropagação. (Adaptado de George e Sherrington, 1984)

Estes sistemas têm vindo a obter uma cada vez maior aplicação, quer em espécies herbáceas, quer em espécies lenhosas e o facto de se assistir a uma cada vez maior utilização e aplicação generalizada dos sistemas de propagação em geral e de clonagem em particular segundo metodologias *in vitro*, é testemunho mais do que suficiente para demonstrar as inúmeras vantagens potenciais. Dentro delas podemos referir (Pierik, 1987; George e Sherrington, 1984):

- i) a propagação *in vitro* é mais rápida do que a propagação *in vivo*;
- ii) é possível propagar algumas espécies *in vitro* as quais são difíceis ou mesmo impossíveis de propagar *in vivo*;
- iii) as culturas são iniciadas por explants de reduzidas dimensões, bem como os próprios propágulos de multiplicação, pelo que se conseguem obter números elevados de plantas em áreas reduzidas;
- iv) a propagação é executada em condições assépticas, livre de agentes patogénicos;
- v) utilizando metodologias apropriadas, nomeadamente a cultura de meristemas, é possível a obtenção de plantas isentas de vírus;
- vi) como resultado do controle de vários factores, tais como, nutritivos, hormonais e físicos, o efeito das estações do ano pode ser eliminado e, como tal, a produção pode ser contínua;
- vii) a obtenção de plantas enraizadas com o seu próprio sistema radicular torna desnecessário, se for caso disso, o recurso à enxertia;
- viii) as plantas não necessitam de cuidados entre os subcultivos;
- ix) para o melhorador é todo um campo de potenciais aplicações, permitindo a obtenção de resultados que, pelos métodos clássicos eram impossíveis, ou de obtenção lenta e difícil.

Em relação aos métodos disponíveis, fazemos referência especial ao sistema de propagação por rebentamento axilar, já que foi o utilizado neste trabalho. Os explants para iniciar este tipo de culturas podem ser ápices caulinares ou gomos axilares, consistindo de zonas meristemáticas com um maior ou menor número de primórdios folheares, onde existem meristemas de gomos axilares em formação. A utilização do meristema como explant inicial está reservada a metodologias que pretendem associar a erradicação de viroses. Após uma primeira fase de crescimento dos rebentos, estes são depois utilizados para fornecer explants para as fases de subcultivo sucessivas, que são colocados em meios que induzem o desenvolvimento dos gomos axilares. Há no entanto que referir que, eventualmente, nem todos os rebentos obtidos por este sistema são de origem axilar, pois é possível a formação de rebentos adventícios, quer directamente do explant e que com ele estabelecem conexões vasculares, quer indirectamente do *callus* que frequentemente se forma na base do explant (George e Sherrington, 1984), pelo que a origem precisa só pode muitas vezes ser determinada por cuidadosos exames anatómicos. No entanto, em muitos casos, os *calli* que se formam são do tipo semi-organizado e, como tal, com capacidade de produzir plantas geneticamente estáveis (George e Sherrington, 1984). Assim, os

explants de subcultivo deverão ser, tanto quanto possível, escolhidos dos rebentos de origem axilar, ou dos que com ele estabelecem conexões vasculares, daí que, quando se pretende manutenção clonal se torne fundamental ajustar as concentrações dos reguladores de crescimento, para que não se registre a formação de rebentos adventícios por organogénese via *calli*, mesmo em prejuízo das taxas de multiplicação. Para conseguir tais objectivos a utilização de elevadas concentrações de certos reguladores de crescimento na fase de multiplicação, nomeadamente de citocininas, é de desaconselhar.

Vários são os factores que influenciam o processo de formação de novos rebentos e, no caso do castanheiro, foram tidos em consideração os seguintes:

- i) influência do número de subcultivos no processo de desenvolvimento das culturas;
- ii) necessidades variáveis de citocininas na fase de multiplicação de acordo com o objectivo pretendido;
- iii) características físicas e qualitativas das formulações nutritivas, nomeadamente concentração iónica total, balanços $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ e $\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$ e potencias osmóticos;
- iv) formação de *calli* como resultado de elevadas concentrações de citocininas.
- v) possíveis diferenças de comportamento genótipo dependentes.

Após a fase de multiplicação torna-se necessário preparar os rebentos obtidos no ambiente artificial e heterotrófico dos tubos de ensaio, para a sua sobrevivência em ambientes naturais e já obrigatoriamente autotróficos. Esta fase, para além de envolver uma fase de enraizamento, já que são raros os casos em que a rizogénese ocorre simultaneamente com a multiplicação, envolve ainda toda uma série de alterações no comportamento fisiológico da jovem planta, nomeadamente o estimular da função fotossintética, absorção de água e outros nutrientes através do seu sistema radicular e resistência à desidratação e agentes patogénicos. E apesar dos muitos progressos já obtidos, a fase de enraizamento permanece como uma das mais difíceis na propagação de espécies lenhosas (Németh, 1986). As metodologias possíveis de utilizar para induzir rizogénese são basicamente duas:

- i) os rebentos individualizados podem ser colocados directamente num substrato de enraizamento natural, sob nebulização e elevada taxa de humidade, tendo o processo de rizogénese sido previamente estimulado por imersão basal do rebento em soluções hormonais de concentração e em tempos variáveis de acordo com as espécies, geralmente designado por enraizamento *in vivo*;

- ii) os propágulos ou rebentos individualizados podem ser colocados em novo meio de cultura sintético, esterilizado, com omissão de citocininas e incremento da concentração de auxinas e, em particular nas espécies lenhosas, com redução das concentrações de macronutrientes do meio de cultura.

Esta última metodologia, de acordo com as espécies e mesmo clones, pode ser favorecida se for utilizado ou adicionado meio líquido, bem como utilização de dois tempos na rizogênese, um de indução, com os rebentos ou propágulos em contacto com o meio com auxinas durante período de tempo variável, e um de alongamento, por posterior transferência para um meio livre de auxinas.

A fase de transplante e aclimação é, também, uma fase crítica em todo o processo. E isto porque um fraco desenvolvimento da cutícula das plantas, associado a um deficiente funcionamento dos estomas, se tornam numa das principais causas de desidratação nas primeiras horas de aclimação. Também as folhas, muito finas, são pouco eficientes fotossinteticamente, já que o seu mesófilo tem poucas e pequenas células a constituir os parênquimas em paliçada e grandes espaços intercelulares e as conexões vasculares entre o sistema caulinar e radicular são reduzidas, o que dificulta o transporte de translocados xilémicos e floémicos. Para além destas causas, é sabido que muitos sistemas radiculares desenvolvidos *in vitro*, não são fisiologicamente activos, verificando-se que mais de 50% destas raízes morrem imediatamente ou então mantêm-se durante a aclimação sem produzir qualquer crescimento (McClelland *et al.*, 1990).

Assim, todo o processo de transplante e aclimação deverá desenvolver-se de uma forma gradual, e vários são os cuidados a ter presente, tais como:

- i) os rebentos já enraizados ou não, devem ser bem lavados, para retirar todos os vestígios de agar e tratados com um fungicida;
- ii) o substrato a utilizar deverá ser previamente esterilizado;
- iii) após a transferência as plantas devem ser protegidas da desidratação e de elevadas intensidades luminosas através de nebulização e ensombramento, onde devem permanecer vários dias até funcionamento do sistema radicular e mecanismos fotossintéticos;
- iv) uma vez estabelecidas, deverão ser gradualmente sujeitas a redução das taxas de humidade ambiental e a acréscimos da intensidade luminosa, até condições ambientais naturais;
- v) necessidade de prevenir ataques fúngicos.

Em relação a esta fase, muitos são ainda os progressos e os desenvolvimentos a esperar, já que ela é uma fase relativamente cara e muito susceptível de falhas, daí que os

grandes laboratórios comerciais estejam constantemente a apresentar inovações que permitam não só uma maior eficácia dos tratamentos, como também uma progressiva automatização de todo o sistema, por forma a diminuir os custos. Quando tal acontecer, o preço das plantas propagadas *in vitro* certamente que irá descer significativamente, o que tornará estas metodologias economicamente rentáveis (Levin e Vasil, 1989).

3. A propagação de plantas lenhosas por cultivo *in vitro*

3.1 - Generalidades

Gautheret (1934) foi o primeiro investigador a conseguir cultivar com êxito tecidos de plantas lenhosas, utilizando para isso tecidos cambiais de ulmeiro. Em 1940, conseguia obter diferenciação de gomos a partir desses mesmos tecidos. Dez anos mais tarde, Ball (1950), consegue obter diferenciação de gomos a partir de *calli* de *Sequoia sempervirens* e Winton, em 1968, refere pela primeira vez a obtenção de uma planta completa, a partir de *calli* de *Populus tremuloides* triplóide. Foi então sendo progressivamente demonstrado que era possível o crescimento, subcultivo e a indução de organogénese a partir de vários tipos de explants, para um cada vez maior número de espécies lenhosas.

Segundo Bonga e Durzan, em 1987, eram trabalhadas *in vitro* 122 espécies de 52 géneros, sendo 19 espécies de 7 géneros de 4 famílias de gimnospérmicas e 103 espécies de 45 géneros de dicotiledóneas. Contudo, apenas para um pequeno número destas espécies, se têm já definidas e padronizadas, quais as condições ideais subjacentes a todo o processo de regeneração para a sua produção em massa, a fim de que possa ser avaliada a estabilidade genética e morfogenética dos clones sob condições de campo.

É opinião generalizada, que existe uma maior dificuldade no estabelecimento de sistemas de propagação *in vitro* de espécies lenhosas do que de espécies herbáceas. Alguns factores que contribuem para tal são a forte influência genotípica inter e intra-específica no tipo de respostas regenerativas, a contaminação das culturas por agentes patogénicos endógenos, a inibição do crescimento por fenóis e polifenóis libertados pelos explants e, finalmente, a dificuldade no estabelecimento em cultivo *in vitro* de explants provenientes de material com características fisiológicas adultas.

Como consequência da forte influência genotípica, é sabido que para cada uma das espécies que se pretende clonar, se torna necessário desenvolver um sistema específico, isto é, o que resulta bem para uma espécie, pode já não funcionar para outra. E em adição a esta variação interespecífica, assiste-se ainda, por vezes, a uma forte variação intra-

específica, de clone para clone. Quando se pretendem desenvolver sistemas para diferentes géneros, estas dificuldades surgem com muito mais relevância.

Também a contaminação bacteriana das culturas *in vitro*, logo na fase de estabelecimento, ou posteriormente durante a fase de proliferação, é um grave problema. Tal facto, que pode ser consequência de processos de desinfeção deficientes e, então, há que os corrigir, é muitas vezes resultado de actividade bacteriana endógena, dos próprios tecidos e, como tal, não é possível de eliminar pelos processos de desinfeção normais. Quando tal acontece, há que ter em conta aspectos de sanidade da planta mãe que fornece os explants, ou utilizar sistemas de estabelecimento que diminuam esse risco, como por exemplo utilizando como explants meristemas ou ápices meristemáticos, sistemas de proliferação que favoreçam o rápido alongamento caulinar, com baixas concentrações de citocininas, ausência de luz entre outros e, se necessário, utilização mista destas metodologias associadas ao emprego de antibióticos no meio de cultura. Quando tal acontece, é sempre aconselhável proceder a indexagens regulares.

O terceiro factor, inibição do crescimento por libertação de fenóis para o meio de cultura pelos explants, não sendo possível evitar, é no entanto possível minimizar os seus efeitos. Assim, vários sistemas podem ser definidos na tentativa de inactivar a acção dos compostos fenólicos no meio de cultura, à medida que vão sendo libertados, por exemplo através da alteração do potencial redox ou ainda por diminuição da actividade das fenolases. Na prática, alguns destes sistemas têm sido conseguidos através da inclusão no meio de cultura de anti-oxidantes, como por exemplo o ácido ascórbico, o ácido cítrico e o hidrocloreto de cisteína, ou de substâncias com capacidade de absorção de substâncias fenólicas como o carbono activo ou a polivinilpirrolidina; outra solução consiste na passagem sucessiva do explant por meios líquidos com anti-oxidantes antes de serem colocados no meio de cultura, ou ainda, por transferências sucessivas do explant para novo meio de cultura.

Finalmente o quarto aspecto referido, dificuldade de estabelecimento de material vegetal de características adultas é, sem dúvida, o que maiores problemas tem levantado aos investigadores, em particular em géneros como *Juglans*, *Castanea* e *Quercus*, entre outros, em que a maturidade é atingida muito tardiamente. Assim, já que a clonagem deste material é feita a partir de indivíduos cujas características fenotípicas se manifestam na fase adulta, torna-se necessário utilizar ou desenvolver metodologias que permitam obtenção de material vegetal com características juvenis. No primeiro caso, utilização de material com certas características de juvenildade, é sabido que em muitas espécies o material proveniente dos ramos inferiores, em especial próximos do tronco, são mais juvenis, bem como rebentos ortotrópicos que se originam da base do tronco. Quanto ao segundo

caso, utilização de técnicas de rejuvenescimento, pode-se actuar quer ao nível da planta mãe, antes de retirar o explant, quer já após o estabelecimento *in vitro*.

As metodologias mais utilizadas até ao momento têm sido a aplicação de citocininas ao nível da planta ou durante o estabelecimento em cultura, enxertias em série, utilização de rebentos de touça e podas severas (Greenwood, 1986).

O rejuvenescimento *in vitro* de tecidos adultos, recorrendo à aplicação de uma citocinina, geralmente a benzilaminopurina, é feito com base na capacidade deste regulador de crescimento promover o crescimento de gomos axilares ou o rebentamento adventício, sendo opinião de vários autores que os rebentos assim obtidos, apresentam maior facilidade de multiplicação e de posterior enraizamento (Mullins *et al.*, 1979; Lyrene, 1981; Bonga, 1982; Fouret *et al.*, 1984; Bekkaoui *et al.*, 1984; Bouriquet *et al.*, 1984; Franclet *et al.*, 1987).

O recurso à execução de enxertias em série, geralmente utilizando porta-enxertos juvenis, tem sido utilizada com êxito em algumas espécies, nomeadamente em *Pseudotsuga* (Franclet, 1981) e tuia (Misson e Giot-Wirgot, 1984), no entanto Hackett (1985), adverte para a necessidade de existirem controlos para comparação que permitam distinguir efeitos reversíveis de verdadeiro rejuvenescimento.

Também os rebentos obtidos a partir de toças e da base do tronco, ou resultantes de podas severas, têm sido largamente utilizados, apesar de também não se ter ainda perfeito conhecimento se o aspecto juvenil dos rebentos é resultado de um processo de rejuvenescimento ou apenas de uma actividade meristemática de tecidos juvenis que permanecem na planta (Greenwood, 1986). Espécies como a *Pinus radiata* L., *P. pinaster* L. e *Picea abies* Karst. (Bolstad e Libby, 1982; St-Claire *et al.*, 1985; Franclet *et al.*, 1980) nas Gimnospérmicas, têm vindo a ser propagadas com este tipo de material vegetal. Nas Angiospérmicas, também várias são as espécies em que se utiliza este tipo de material vegetal para iniciar sistemas de propagação *in vitro*, como por exemplo castanheiro (Vieitez *et al.*, 1983), carvalho (Vieitez *et al.*, 1985; San-José *et al.*, 1983, 1985) e sobreiro (Manzanera e Pardos, 1990).

Ainda no âmbito do rejuvenescimento, é de referir a utilização de metodologias de estiolamento ao nível dos ramos da copa em castanheiro, como alternativa à inexistência de outro material com características juvenis (Ballester *et al.*, 1989).

A acrescentar a estas dificuldades juntam-se outras, comuns a todas as espécies que são propagadas por estas metodologias, tais como: necessidade de equipamento laboratorial e especializado, riscos de contaminação que podem inviabilizar grande quantidade de culturas, desenvolvimento de métodos específicos para cada espécie, o tamanho inicial das plantas é muito pequeno, são muito susceptíveis a perdas de água e, para além de não serem fotossinteticamente autosuficientes, algumas metodologias não garantem

estabilidade genética. Perante o exposto, é assim indispensável, quando se inicia um projecto de multiplicação de plantas por cultura de tecidos, ter em atenção os seguintes pressupostos:

- i) possibilidade de obtenção de taxas de regeneração elevadas;
- ii) capacidade das plantas obtidas *in vitro* resistirem ao transplante e, desenvolverem-se no campo, segundo as expectativas ou ainda melhor;
- iii) existir uma certa compatibilidade entre os sistemas adoptados e os sistemas de multiplicação convencionais;
- iv) as características seleccionadas deverão justificar economicamente, ou de qualquer outro modo, o uso de sistemas de propagação por cultura de tecidos.

No entanto, todas as metodologias actualmente em utilização, necessitam de ser mais amplamente exploradas, para que a sua efectiva utilidade na multiplicação de plantas lenhosas adultas seja uma realidade. Neste sentido, o potencial das técnicas de embriogénese somática aplicadas a espécies lenhosas tem de ser objecto de intensa investigação. Protocolos completos têm que ser desenvolvidos com um adequado controle da regeneração da planta, para que a fidelidade genética do genótipo dador, possa ser amplamente conservada nos seus propágulos posteriores. Também a engenharia genética poderá contribuir de uma forma decisiva para aumentar a eficiência destas metodologias.

Esta investigação poderá então levar a propagação *in vitro* de espécies lenhosas a tornar-se competitiva face à propagação pelos métodos convencionais, não devendo esquecer que um dos importantes aspectos a ser considerado, em termos de aplicação comercial, é a relação custo/benefício.

De facto, torna-se difícil referir com exactidão os custos de obtenção de plantas quer por via convencional, quer por técnicas *in vitro*, mas é assumido que estas podem apresentar valores superiores na ordem dos 30 a 200 %, não devendo no entanto esquecer que um dos aspectos mais importantes da propagação clonal, é o facto de permitir a multiplicação de novas variedades ou de genótipos melhorados, com a sua introdução no mercado muito mais rapidamente do que através dos métodos convencionais. O ganho potencial também é difícil de determinar, mas os quantitativos do produto economicamente útil, madeira, fruto e óleos, podem também ser significativamente mais elevados no material clonado. No aspecto florestal e tendo em conta o importante aspecto económico a longo prazo, tem sido demonstrado que incrementos de apenas 2 a 3 %, podem ter um importante impacto económico (Carlisle, 1971).

3.2 - Caso do castanheiro

Os primeiros ensaios com este género foram desenvolvidos por Jacquiot (1950, 1956, 1970) a partir do estabelecimento *in vitro* de tecidos cambiais. Com o estabelecimento de fragmentos de caules de plantas com menos de um ano (Borrod, 1971) e de tecidos cotiledonares (Vieitez *et al.*, 1978a; Keys e Cech, 1979,) foi possível obter a formação de *calli* como primeira resposta fisiológica. As primeiras manifestações de organogénese foram observadas por Vieitez *et al.* (1978b), que conseguiram obter rizogénese adventícia a partir de *calli* com origem em tecidos cotiledonares e, mais tarde, plantas completas a partir do desenvolvimento do embrião seminal (Vieitez e Vieitez, 1980a; Keys e Cech, 1981). Os trabalhos que se seguiram permitiram o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de vários tipos de explants provenientes de plantas com características juvenis, tais como gomos axilares (Vieitez e Vieitez, 1980b, 1982; Keys e Cech, 1982; Chevre *et al.*, 1983; Qi-Guang *et al.*, 1986), ápices caulinares (Rodriguez, 1982) e secções de epicótilos e hipocótilos (San-José *et al.*, 1984).

A utilização de explants com origem em material de características adultas, tem deparado com bastantes dificuldades quer no estabelecimento quer na sua multiplicação e enraizamento. Os primeiros resultados com algum êxito foram referidos por Biondi *et al.* em 1981, e por Vieitez *et al.* em 1983. Esta equipa de investigadores utilizou como explants segmentos nodais e ápices caulinares de rebentos axilares de varas de amontoa que, como atrás foi referido, apresentam certas características de juvenilidade.

Não pretendendo sermos exaustivos, seguem-se algumas referências sobre as diferentes metodologias que têm vindo a ser utilizadas para o estabelecimento e multiplicação *in vitro* deste género.

Assim, os processos de desinfeção do material vegetal estão logicamente relacionados com o tipo de explant utilizado e também com o local de crescimento da planta mãe (os tratamentos deverão ser mais duros se o material vegetal é proveniente de plantas com crescimento no campo):

- embriões:
 - imersão da semente pelada em álcool durante 4 m (Vieitez e Vieitez, 1980a) ou 1 m (Keys e Cech, 1981)
- gomos axilares e apicais:
 - imersão rápida por etanol, passagem por hipoclorito de cálcio 5% durante 5 m seguido de lavagem (Vieitez e Vieitez, 1980b; Vieitez *et al.*, 1983).

- tecidos cotiledonares:

- imersão da semente em hipoclorito de cálcio a 7% durante 10 m, seguida de lavagem (Vieitez e Vieitez, 1980a);
- imersão da semente em álcool durante 5 m seguida de imersão em clo-
rox 20% durante 30 m e lavagem (Rodriguez, 1982a)

Os meios de cultura utilizados no estabelecimento e multiplicação deste género apresentam como característica comum uma baixa concentração iónica, pelo que meios como o de Heller (1953), de Murashige e Skoog (1962) com redução dos macronutrientes a metade e por vezes os nitratos a um quarto, e o meio de Greshoff e Doy (1972) têm sido os mais utilizados (Vieitez e Vieitez, 1980b; Biondi *et al.*, 1981; Vieitez *et al.*, 1983). Em relação aos suplementos hormonais, para o estabelecimento e multiplicação de rebentos a citocinina mais utilizada tem sido a benzilaminopurina em concentrações que vão de 0.1 mg l⁻¹ a 1-2 mg l⁻¹, sem adição de qualquer auxina.

Para a fase de enraizamento os meios utilizados são normalmente reduzidos a metade da sua concentração de macronutrientes (Biondi *et al.*, 1981; Rodriguez, 1982a; Vieitez *et al.*, 1983), sendo indispensável a utilização de uma auxina em concentrações que variam segundo a metodologia utilizada.

Em relação aos tipos de cultura já ensaiados com este género, são de referir a cultura de embriões maduros e imaturos, a cultura de *calli*, qualquer que seja a sua origem e que têm como pressuposto a sua utilização em sistemas de organogénese indirecta, quer de caulogénese e rizogénese (Vieitez e Vieitez, 1980b) quer de embriogénese somática (Gonzalez, *et al.*, 1985; Vieitez *et al.*, 1990) e a cultura de gomos e ápices caulinares atrás referida.

Em relação a este último tipo de cultura e que se integra mais no âmbito deste trabalho, a utilização de material vegetal adulto com características de juvenildade tem permitido obter resultados bastante satisfatórios, embora com alguma variação interclonal, o que não acontece com material proveniente da copa da árvore, apesar de alguns resultados terem sido obtidos após tratamento de estiolamento do ramo na copa (Balles-ter *et al.*, 1989).

Em relação ao processo de rizogénese dos rebentos obtidos *in vitro*, para qualquer dos métodos possíveis de utilizar, regulador de crescimento no meio ou por imersão basal, parece ainda ser fundamental encontrar um equilíbrio entre a dose de auxina e o tempo de aplicação, bem como conjugar estes procedimentos com outros que permitam solucionar o problema da necrose apical que se regista durante esta fase e que é determinante para a manutenção do bom estado fisiológico da planta. Sobre esta anomalia as metodo-

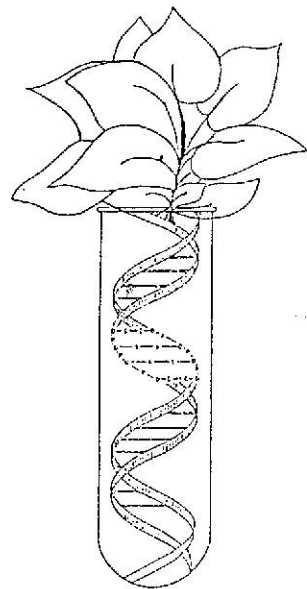
logias apresentadas por Vieitez e colaboradores (1989) para a controlar, parecem-nos ser bastante promissoras, mas de difícil execução sob o ponto de vista da propagação em larga escala. Quanto ao enraizamento *in vivo*, os únicos resultados até hoje referidos dizem respeito ao enraizamento de rebentos com origem em material juvenil, não tendo sido conseguido para material adulto (Mullins, 1987).

Em relação à fase de transplante e aclimação é muito pouca a informação, bem como a sua dificuldade de repetição. Keys e Cech (1982) fazem uma breve referência ao assunto indicando grandes dificuldades, Vieitez e colaboradores (1986), referem valores de sobrevivência na ordem dos 35% e Mullins (1987) refere que para rebentos enraizados *in vitro*, se registaram elevadas taxas de mortalidade, embora em rebentos com enraizamento *in vivo* se tivessem verificado melhores resultados, mas sem qualquer quantificação, e sempre com a utilização de material juvenil.

No que respeita à actividade experimental que se delineou para este trabalho (cf. Material e Métodos) ela teve como principal objectivo, para além da aquisição e aperfeiçoamento de metodologias referentes à propagação *in vitro*, analisar o comportamento do castanheiro quando submetido a estes sistemas de propagação, sob a acção de vários factores que se consideram como importantes na modelação do tipo de respostas regenerativas possíveis de obter e que são: o clone, as formulações nutritivas, a concentração de BAP e a concentração e tempo de exposição ao AIB.

MATERIAL E MÉTODOS

B



I. MATERIAL VEGETAL

Utilizaram-se três clones híbridos, adultos, de castanheiro (*Castanea sativa* x *C. crenata*). Um clone, de origem espanhola, designado por 431, com 18 anos de idade, que se encontrava já estabelecido *in vitro* pelo Instituto de Investigações Agrobiológicas da Galiza em Santiago de Compostela. Os outros dois, com idade não determinada, mas superior a 15 anos, foram obtidos em Portugal. Um deles foi recolhido na Quinta das Relvas, Guarda, e foi designado por QR2, o segundo, proveniente do extinto Centro de Estudos do Castanheiro, Vimioso, Alcobaça, e designado por M2.

Todos estes clones são considerados resistentes à doença da tinta, e estão a ser propagados por amontoa.

II. TIPO DE EXPLANT, DESINFECÇÃO, ESTERILIZAÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTURA

1. Caracterização do explant

Com excepção do clone 431, que já se encontrava estabelecido *in vitro* e, como tal, entrou directamente na fase de multiplicação para obtenção de população stock, os explants de estabelecimento dos outros dois clones foram obtidos segundo o prescrito por Vieitez *et al.*, (1983) com pequenas alterações. Assim, foram recolhidas varas de amontoa na fase de repouso vegetativo (Novembro/Dezembro), cortadas em estacas com 20 a 25 cm, independentemente da sua posição na vara, mergulhadas por fungicida (Benomil, na concentração

indicada pelo fabricante) e secas em estufa com ventilação a 20°C. Após este tratamento, foram colocadas em sacos de plástico e mantidas no frio, a 4°C, até à sua utilização.

Em Março/Abril as estacas foram colocadas em tabuleiros com perlite, na estufa de

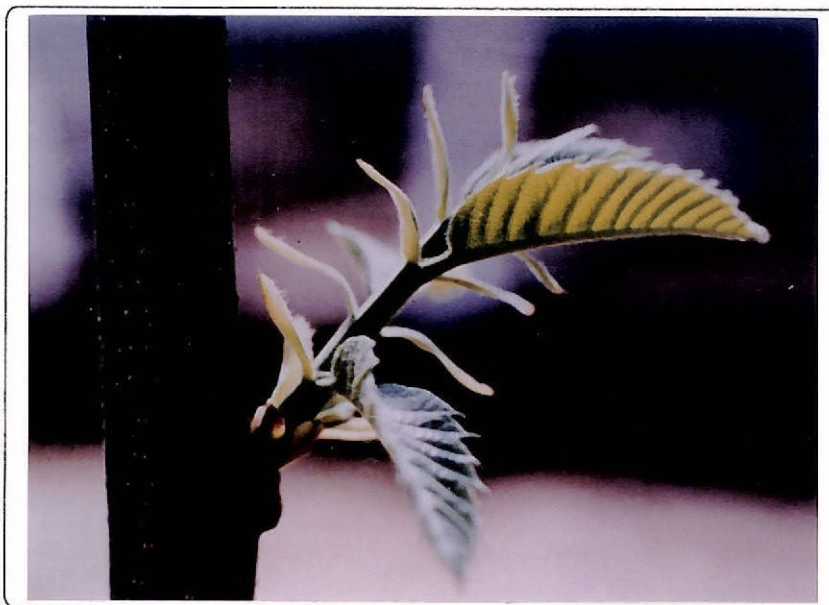


Fig. B1 - Rebento axilar desenvolvido em estufa

campo sob nebulização, ou simplesmente em água na estufa de laboratório, com luz natural e pulverizadas regularmente. Nestas condições, os gomos axilares, então dormentes, começam a desenvolver-se e, ao fim de 3 a 4 semanas, quando têm entre 3 a 5 cm de comprimento (Fig. B1), são cortados. Estes rebentos, após

desinfecção, fornecem então os explants de estabelecimento, na forma de segmentos nodais com 2 a 3 gomos axilares e ápices caulinares.

Quanto às características do explant utilizado na fase de multiplicação, explant secundário, ele foi definido como um segmento nodal dos rebentos estabelecidos *in vitro* a partir de uma população stock, com 5 a 8 mm de comprimento e com um mínimo de 2 gomos axilares, ao qual eram retiradas as folhas (Fig. B2).

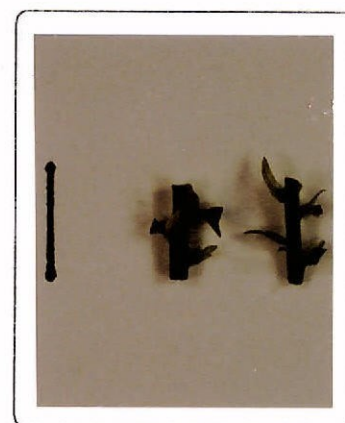


Fig. B2 - Explant de multiplicação

2. Métodos de desinfecção e esterilização

Destacados os rebentos axilares, desenvolvidos após a colocação das estacas em estufa, foram-lhes retiradas as folhas, operação que requer um certo cuidado a fim de não lesar o gomo axilar, e parafinadas as extremidades basais, a fim de evitar a penetração dos agentes desinfectantes.

A desinfecção foi feita por imersão dos rebentos em etanol a 70% durante 45 s, seguida

de imersão durante 5 min numa solução de lexívia comercial, com 5% de cloro activo e diluída 4x, à qual foram adicionadas algumas gotas de Tween 20, e que se manteve sob agitação. A remoção do agente desinfectante foi feita por três passagens sucessivas em água destilada esterilizada, após o que foram colocados em água destilada esterilizada, durante 2 a 3 horas, a fim de reduzir a exsudação de taninos para o meio de cultura.

A esterilização dos meios de cultura foi feita por calor húmido em autoclave, durante 15 min a 121°C. A esterilização de todo o material necessário às manipulações em condições assépticas, foi efectuada ou por calor húmido em autoclave nas condições anteriores, ou por calor seco durante 90 min a 170°C.

3. Condições de cultura

A população stock do material vegetal foi mantida em frascos de vidro, com 70.6 mm de diâmetro e 122 mm de altura, com tampa plástica translúcida e roscada, contendo 60 ml de meio e 4 explants por frasco (Fig. B3).



Fig. B3 - Rebentos de castanheiro em multiplicação

Os ensaios de multiplicação foram estabelecidos em tubo de ensaio, com 25 mm de diâmetro e 150 mm de altura, tapados com tampas metálicas, opacas, de mola, contendo 15 ml de meio e 1 explant colocado na vertical.

O pH dos meios de cultura foi ajustado entre 5.5 e 5.6, com NaOH 1N ou HCl 1N, antes de adicionar o agar. Este foi utilizado numa concentração de 6 g l⁻¹ para todos os meios de cultura. Também em todos os meios o SO₄Fe.7H₂O e o Na₂EDTA prescritos pelos autores

foram substituídos por 40 mg l^{-1} de FeNaEDTA. e adicionadas 100 mg l^{-1} de m-inositol.

As culturas foram mantidas em estufa, com fotoperíodo de 16 h, e a 25°C de temperatura dia e 18°C de temperatura noite. A iluminação foi dada por lâmpadas fluorescentes, tipo TLD 18/40 com uma intensidade média de 2000 Lux.

Na fase de aclimação das plantas foi utilizada uma estufa de campo, equipada com sistema de "cooling", bancadas aquecidas e sistema de nebulização fina com controle de humidade.

III. MEIOS DE CULTURA PARA ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO

1. Meio de estabelecimento

A composição do meio de cultura para estabelecimento dos clones QR2 e M2, teve como base a formulação de Murashige e Skoog (1962), com a concentração de nitratos reduzida a metade. Foram adicionadas 1 mg l^{-1} de tiamina, 0.1 mg l^{-1} de piridoxina, 0.1 mg l^{-1} de ácido nicotínico e 30 g l^{-1} de sacarose. Como regulador de crescimento utilizou-se a 6-benzilaminopurina (BAP), na concentração de 0.5 mg l^{-1} .

2. Meios de multiplicação

Um dos objectivos da fase de multiplicação, consistia em testar a influência de formulações nutritivas e de concentrações de BAP, no tipo de resposta regenerativa do material vegetal utilizado. Para todos os clones foram utilizadas três formulações: a de Heller (1953), modificada por Vieitez *et al.* (1983) por adição de 132 mg l^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, restantes macronutrientes multiplicados por um factor de 1.25x e com micronutrientes de Murashige e Skoog (1962), a seguir referida por Hm; a de Greshoff e Doy (1972), a seguir referida por GD e a de Woody Plant Medium de McCown e Lloyd (1981) a seguir referida por WPM, com as respectivas composições vitamínicas.

O facto de não se utilizar nestes ensaios a formulação de MS (1962) com os nitratos reduzidos a metade, utilizada no estabelecimento, tem a ver com a possibilidade de obtenção de variantes morfológicas após subcultivos sucessivos nesta formulação (Vieitez, A. M., comunicação pessoal).

Para testar os efeitos da BAP na indução da formação de rebentos, utilizou-se esta

substância, numa gama de concentrações de 0.05 mg^l⁻¹ a 2 mg^l⁻¹, em cada uma das três formulações nutritivas.

A todos os meios foram adicionadas 30 g^l⁻¹ de sacarose.

3. Meios de enraizamento

Para o enraizamento dos rebentos regenerados *in vitro*, foram comparados os efeitos de duas formulações nutritivas, a de Murashige e Skoog (1962), com macronutrientes reduzidos a metade e os nitratos a um quarto, a seguir referida por MSm e a de Greshoff e Doy (1972) com os macronutrientes reduzidos a metade, a seguir referida por 1/2GD, com micronutrientes e vitaminas respectivas sendo adicionadas 25 g^l⁻¹ de sacarose.

O regulador de crescimento utilizado foi o ácido indol 3-butírico (AIB), em concentrações e tempos de aplicação, que variaram de acordo com o método de aplicação, isto é, com o regulador de crescimento no meio ou por imersão basal do rebento. No primeiro caso, em que se testou a acção do AIB colocado no meio de cultura, durante 7 dias, foram utilizadas concentrações de 1.5, 3 e 5 mg^l⁻¹, após o que os rebentos eram transferidos para as mesmas formulações nutritivas mas sem auxina; a outra em que se usou a imersão basal dos rebentos, utilizou-se uma solução concentrada de AIB, 1 g^l⁻¹, durante tempos de 30, 60 e 120 segundos, após o que os rebentos foram colocados nos meios de cultura sem auxina.

No primeiro conjunto de ensaios, para comparação entre dois meios, cada um com três concentrações de AIB no meio, foi utilizado o clone 431. Para o segundo conjunto, com aplicação de AIB por imersão basal dos rebentos numa solução concentrada de AIB, foi utilizado o meio 1/2GD e foram comparados os clones M2 e 431.

Todos os rebentos para esta fase tiveram o último subcultivo de multiplicação no meio de MS (1962), com nitratos reduzidos a metade e suplementado com 0.1 mg^l⁻¹ de BAP, pois regista-se um maior vigor fisiológico destes rebentos, comparativamente aos obtidos nas formulações utilizadas na fase de multiplicação, susceptível de permitir uma melhor adaptação às condições de enraizamento (Vieitez *et al.*, 1983). A todos os rebentos de todos os tratamentos foi decapitado o ápice no dia zero, isto é, no início do tratamento indutor de rizogénese, tendo sido aplicada uma gota de agar (10 g^l⁻¹) com 30 mg^l⁻¹ de BAP no gomo axilar dez dias após o início da indução de rizogénese.

4. Substratos

Após 4 semanas do início do tratamento rizogénico as plantas enraizadas foram colo-

cadras, durante os primeiros trinta dias, num substrato de turfa e perlite (3:1), esterilizado em autoclave durante 10 m a 121°C e fertilizado com 0.2 g de osmocote por planta, após o que foram colocadas em vaso numa mistura de terra e perlite (1:1), também fertilizada com osmocote (3 g por vaso).

IV. TRANSPLANTE E ACLIMATAÇÃO

Após a indução e desenvolvimento do sistema radicular, as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio, já na estufa de campo, e colocadas em água destilada para limpeza de restos de agar. Seguidamente foram submersas durante 20 s em fungicida (Benlate a .3 gl⁻¹) após o que foram colocadas em tabuleiros de esferovite com alvéolos de 6x6x8 cm com o substrato atrás referido saturado de água. Estes foram colocados sob túnel de aclimatação, com rede de ensombramento, no interior da estufa, com base aquecida a 22°C e com sistema de nebulização fina com controle de humidade, que de 100% inicial foi sendo gradualmente reduzida durante trinta dias. Após este período as plantas foram transplantadas para vasos com substrato de terra e perlite, fertilizado com osmocote e colocadas sob sistema de rega por aspersão com duração de 4 s em ciclos de 20 m.

V. EXPRESSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Para quantificar os efeitos dos factores em estudo sobre o tipo de respostas regenerativas deste género, quer na fase de multiplicação quer na fase de enraizamento, foram utilizadas, para todos os tratamentos, amostras com 17 replicações e duas repetições, tendo o registo sido efectuado entre a 4 e a 5 semana de cultura, após o início do tratamento.

1. Fase de estabelecimento

O principal objectivo desta fase da micropropagação, consiste na obtenção de boas taxas de reacção dos explants colocados pela primeira vez nas condições *in vitro*.

Para obter tais resultados, factores como as características genotípicas e fisiológicas do material vegetal utilizado, a metodologia de desinfectação a que se sujeitou o material vegetal, os cuidados na sua manipulação e a composição das formulações nutritivas utilizadas, são determinantes.

Os parâmetros quantificados foram a % de infecções, a % de explants inviáveis, onde se incluem os explants mortos com libertação de fenóis, a % de explants com reacção, a taxa

de multiplicação, ou seja o número de rebentos formados por cada explant reactivo e o comprimento médio dos rebentos formados.

2. Fase de multiplicação

Na fase de multiplicação torna-se importante determinar a capacidade de proliferação, isto é, de formação de novos rebentos a partir do explant colocado em cultura, bem como algumas características morfológicas desses mesmos rebentos. Em termos quantitativos determinou-se a taxa de multiplicação, ou seja, o número de rebentos maiores que 5 mm formados por explant, a seguir referido por NR, o comprimento do maior rebento, a seguir referido por CM e ainda o número de segmentos, com iguais características às do explant de multiplicação, possíveis de obter na totalidade dos rebentos formados por explant, a seguir referido por NS. O facto de se contabilizarem apenas os rebentos maiores que 5 mm, no cálculo da taxa de multiplicação, tem a ver com a possibilidade de utilizar directamente estes rebentos em novo ciclo de multiplicação, não fazendo uso de uma fase de alongamento independente. Para além destes parâmetros quantitativos, atendeu-se ainda a alguns aspectos qualitativos, tais como, características morfológicas das folhas, coloração, intumescimento, orientação no crescimento dos rebentos, aspecto hídrico dos rebentos e distribuição dos nós.

3. Fase de enraizamento

Nesta fase foi quantificado o número de plantas enraizadas, o número de raízes formado em cada rebento, a seguir referido por NRa, o comprimento da maior raiz, a seguir referido por CMra e o comprimento médio de todas as raízes formadas por cada rebento, a seguir referido por Cmra.

4. Fase de transplante e aclimação

Nesta fase registou-se o número de plantas sobreviventes aos 30 e 60 dias, após terem sido colocadas na estufa de aclimação, tendo sido quantificada apenas para o clone M2.

5. Interpretação estatística dos resultados

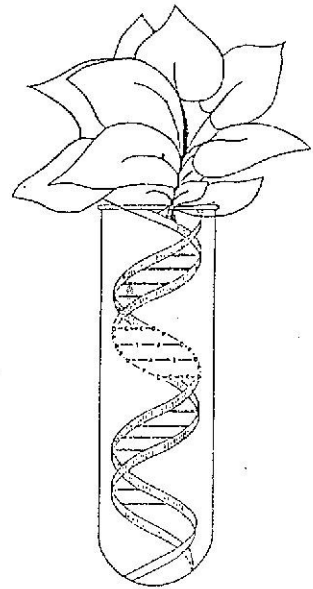
Os ensaios da fase de multiplicação pretenderam avaliar a capacidade de regeneração através da análise de três variáveis resposta (taxa de multiplicação, comprimento do maior rebento e número de segmentos) sob influência dos factores clone, meio de cultura e concentração de BAP. Para tal estabeleceu-se um ensaio tri-factorial completo, com todas as 54 combinações possíveis ($3 \times 3 \times 6$), com 17 replicações cada e duas repetições, num total de 1836 observações.

Na fase de enraizamento pretendeu-se analisar o efeito de duas formulações nutritivas, combinadas com 3 concentrações de AIB adicionado ao meio de cultura, tendo para isso sido delineado um ensaio bi-factorial completo com todas as 6 combinações possíveis (2×3) com 17 replicações cada e duas repetições, num total de 204 observações. Pretendeu-se também analisar a capacidade rizogénica induzida por imersão basal dos rebentos numa solução concentrada de AIB em função de 3 tempos de aplicação para dois clones, com igual delineamento ao anterior.

Os diferentes tratamentos efectuados em cada ensaio, foram analisados por análise de variância, calculada pelos programas P-STAT para os resultados da fase de multiplicação e STATGRAPHICS para os restantes. Como se tratava de ensaios multifactoriais, foram estudados os efeitos principais e todas as possíveis interacções entre os factores envolvidos nas variáveis resposta. Nos casos de valores de F significativos, o estudo foi feito através da análise da significância da soma dos quadrados e confrontando as médias dos tratamentos para cada um dos níveis dos factores em estudo (Mize e Chun, 1988), sendo ainda determinado o valor da mínima diferença significativa (LSD) entre as médias, para um nível de significância de 5% e 1%, embora toda a discussão seja feita com base no nível de 5%.

RESULTADOS

C



I. FASES DE ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO

1. Estabelecimento

Dos 160 explants iniciais do clone M2 e 120 do clone QR2 após uma primeira semana sem alterações visíveis na sua morfologia, começaram o seu desenvolvimento, detectado pelo intumescimento dos gomos axilares, atingindo estes o comprimento médio de 12.05 mm para o clone M2 e 10.23 mm para o clone QR2 após 32 dias de cultivo (Tab. C1).

Tab. C1 - Resultados obtidos na fase de estabelecimento dos clones M2 e QR2 (\pm Desvio padrão)

Clone	infectados %	Inviáveis %	com reacção %	taxa de multiplicação	comprimento médio (mm)
M2	24	8.7	67.3	2.12	12.05 \pm 1.21
QR2	25	9.2	65.8	1.84	10.23 \pm 1.85

Os valores das taxas de infecção obtidas para qualquer dos dois clones, 24 e 25% (Tab. C1), parecem-nos perfeitamente aceitáveis, dada a natureza leve do processo de desinfecção, o que se traduz numa taxa de inviabilidade por toxicidade bastante baixa, e também devido ao facto dos rebentos das estacas se terem desenvolvido em estufa de campo. De referir ainda que os valores apresentados na Tabela C1 para as taxas de inviáveis incluem também os explants mortos por libertação de substâncias de natureza fenólica. Face a estes valores parece-nos ser relativamente fácil a obtenção de taxas de explants com reacção na ordem dos 65 a 75% e, talvez melhor, se a indução dos rebentos axilares das estacas se fizer em estufa de laboratório com ambiente controlado.

A passagem dos explants por água esterilizada antes de serem colocados no meio de cultura, parece ter efeitos benéficos no que diz respeito ao evitar a libertação de substâncias

de natureza fenólica, embora este aspecto esteja muito relacionado com o genótipo, meio de cultura (Vieitez *et al.*, 1983) e época do ano na qual é recolhido o material vegetal (Biondi *et al.*, 1981).

Os valores obtidos para a taxa de multiplicação e comprimento médio dos rebentos obtidos por explant viável, revelam uma certa dificuldade na reacção do material vegetal, aspecto característico quando se utiliza material adulto (Vieitez *et al.*, 1983).

Perante os resultados obtidos nesta fase de estabelecimento parece-nos que as metodologias utilizadas são susceptíveis de serem generalizadas para outros clones.

2. Multiplicação

Os resultados obtidos com os ensaios cujo delineamento foi descrito em Material e Métodos, tinham por objectivo determinar a capacidade de multiplicação *in vitro* de material adulto de castanheiro. Para tal, estudaram-se os efeitos de dois factores qualitativos, clone e meio de cultura, e um quantitativo, concentração de benzilaminopurina, através da quantificação de três parâmetros, número de rebentos maiores que 5 mm, comprimento do maior rebento e número de segmentos. A apresentação dos resultados, foi então estruturada tendo por base, os efeitos dos factores em estudo e as respectivas interacções, para cada um dos parâmetros referidos.

2.1 - Taxa de multiplicação

O número de rebentos maiores que 5 mm (NR), também referido por taxa de multiplicação, ou taxa de proliferação após ter sido submetido a análise de variância (Anexo I-Tab. C1) para as médias dos tratamentos, apresenta-nos valores de F significativos quer para os efeitos principais, quer para as diferentes interacções possíveis ($P > 0.0001$), pelo que a taxa de multiplicação se encontra fortemente dependente das combinações utilizadas entre cada um dos factores.

Em termos de explicação da variância registada nos factores principais e interacções (com base na soma dos quadrados), é de referir que o principal responsável pela explicação da variabilidade foi o factor concentração de BAP (com 34%) apresentando-se assim como o factor determinante na capacidade de resposta do material vegetal no que diz respeito à taxa de multiplicação. O factor clone contribui com 5%, o factor meio com 1.8% e as possíveis interacções no seu conjunto explicam 6.8%. O restante é dado pelo erro experimental, o que mostra a grande variabilidade intrínseca ao próprio material vegetal, podendo esta variabili-

dade ser atribuída ao facto de se ter utilizado aleatoriamente como explants de multiplicação todos os segmentos nodais desde a base até à extremidade do rebento e que possuem diferentes estados fisiológicos (Vieitez, A. M., comunicação pessoal), pois não é credível que este erro se possa atribuir a outros factores, já que as condições de cultivo, tais como meios, concentração de reguladores de crescimento e ambiente de crescimento se pressupõem ser uniformes.

Face à existência de valores de F altamente significativos, faremos uma apresentação para cada um dos factores que influenciam a taxa de multiplicação.

A Fig. C1 (e Anexo I-Tab. C2) indica as taxas de multiplicação obtidas por clone na totalidade de meios e concentrações utilizadas. As médias obtidas não são significativamente diferentes para os clones 431 e M2, com 2.03 e 2.11 respectivamente, mas já a média obtida para o clone QR2, 1.46, é significativamente diferente. O factor meio de cultura, também originou diferenças significativas na capacidade de proliferação dos explants (Fig. C2 e Anexo I-Tab. C3). De facto os meios

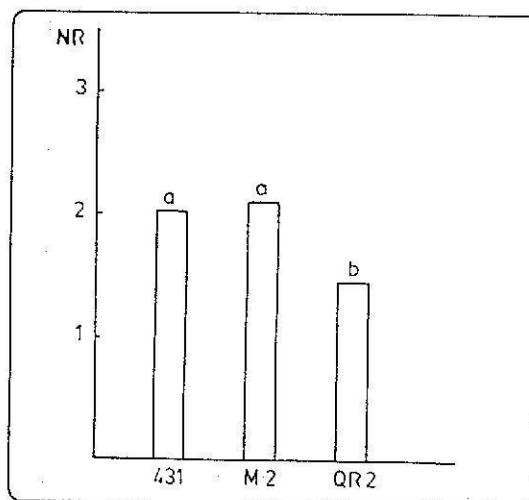


Fig. C1 - Número de rebentos formados por clone

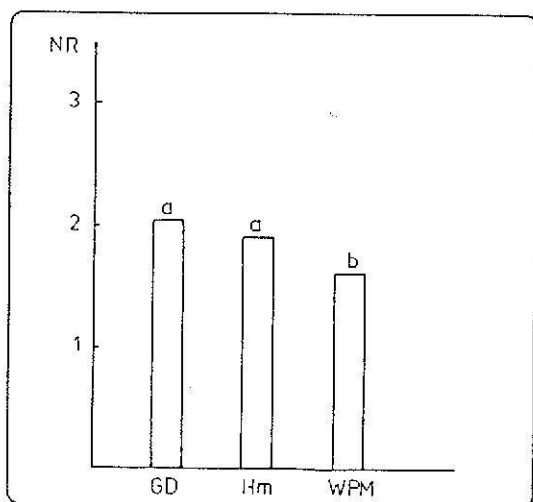


Fig. C2 - Efeito do meio de cultura no número de rebentos

Hm e GD mostraram-se mais indicados, permitindo não só um melhor desenvolvimento das culturas como também uma taxa de proliferação mais elevada em relação ao meio WPM (1.93 e 2.04 para Hm e GD respectivamente, sem diferença significativa e 1.62 para WPM significativamente diferente). De referir ainda que a utilização do meio WPM origina com frequência em todos os clones, algumas alterações a nível morfológico, tais como possível vitrificação, intumescimento das folhas e crescimento plagiotrópico dos rebentos.

O factor concentração de BAP, mostrou ser o factor mais importante na variação do tipo de resposta dos explants, demonstrado pela análise de variância e, num sentido prático, podemos referir que a variação obtida entre o máximo e o mínimo de rebentos, como consequência dos níveis de BAP, foi de 2.36 (2.90 - 0.54), contra 0.42 (2.05 - 1.63) e 0.65 (2.11 - 1.46) obtida por acção do factor meio e clone respectivamente. A variação para cada um dos

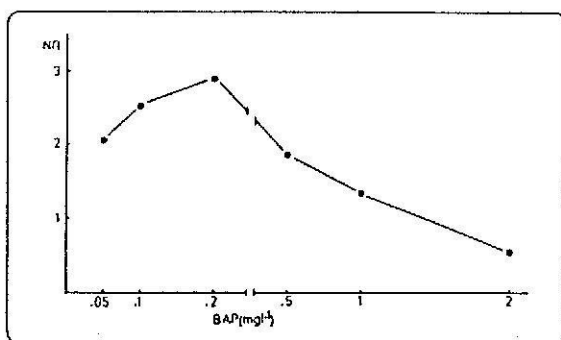


Fig. C3 - Efeito da concentração de BAP no número de rebentos formados por explant

níveis utilizados está indicada na Fig. C3 e Anexo I-Tab. C4, e todos eles apresentam diferenças significativas entre si. É de referir que as concentrações mais baixas, 0.05, 0.1 e 0.2 mg l^{-1} , se mostraram como as mais favoráveis para a formação de novos rebentos maiores que 5 mm com 2.06, 2.53 e 2.90 respectivamente. As concentrações de BAP mais elevadas permitiram o desenvolvimento de múltiplos rebentos mas impediram o seu alongamento, apresentando-se a cultura com um aspecto de cacho com vários rebentos diferenciados mas de dimensões muito reduzidas e com um nítido incremento no desenvolvimento do *callus*.

Tal como atrás referimos as interacções entre estes factores apresentaram valores de F altamente significativos, pelo que o efeito simples de um factor se altera à medida que o outro, ou outros factores se alteram, isto é, o número de rebentos maiores que 5 mm está dependente do tipo de clone, meio de cultura e concentração de BAP utilizada. Com a análise de cada uma das interacções possíveis, Clone * Meio, Clone * BAP, Meio * BAP e Clone * Meio * BAP, ser-nos-á possível avaliar a variação da taxa de multiplicação em resposta às combinações específicas de cada factor. Assim, na Fig. C4 e Anexo I-Tab. C5, estão indicadas as médias do número de rebentos maiores que 5 mm obtidos como resultado da interacção Clone * Meio. Da sua análise podemos verificar que há uma relação significativa entre a taxa de multiplicação e o meio de cultura utilizado, contudo os valores obtidos variam significativamente de clone para clone, de tal modo que os melhores resultados são obtidos para os clones M2, nos meios de GD e Hm (2.45 e 2.24 respectivamente, sem diferença significativa) e 431, também nos meios de GD e Hm (2.14 e 2.16 respectivamente, sem diferença significativa). O meio WPM, na globalidade dos níveis utilizados apresenta-se, como o menos indicado para estes dois clones, e apenas para o clone QR2 apresenta valores idênticos aos outros dois meios, embora com valores absolutos bastante inferiores.

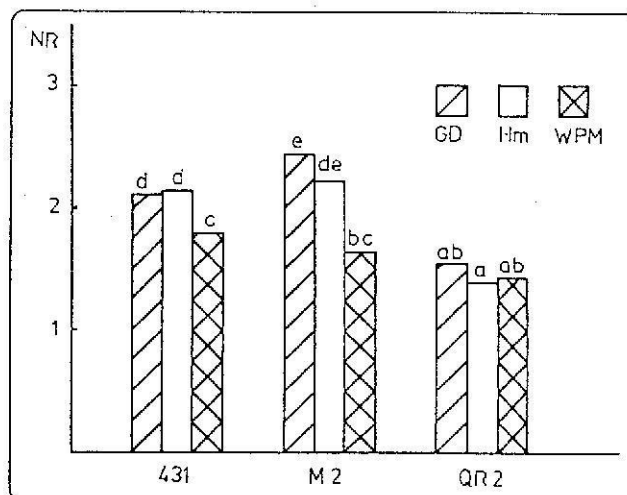


Fig. C4 - Efeito dos diferentes meios de cultura no número de rebentos formados por clone

Os resultados da interacção Clone * BAP, estão indicados na Fig. C5 e Anexo I-Tab. C6. Esta interacção permite-nos analisar as variações na taxa de multiplicação de cada um

dos clones, segundo os níveis de concentração de BAP utilizados nos três meios nutritivos. Se compararmos estes resultados com os obtidos através da interacção Meio * Clone, verificamos que o factor concentração de BAP provoca maiores amplitudes de resposta na taxa de multiplicação do que as variações das formulações nutritivas, bem como entre os clones utilizados, e isto porque a variação da taxa de multiplicação em função dos meios de cultura foi de 1.06 (2.45 - 1.39) ao passo que em função da

concentração de BAP foi de 2.86 (3.25 - 0.39) o que aliás foi indicado pela análise de variância. Da análise da Fig. C5, é de fácil percepção que as concentrações de efeito mais positivo se situam na ordem dos 0.1 e 0.2 mg l^{-1} para qualquer dos clones, registando-se uma nítida inflexão a partir desta concentração. Mais uma vez aparecem os clones 431 e M2 com melhores resultados do que o clone QR2, para qualquer das concentrações de BAP.

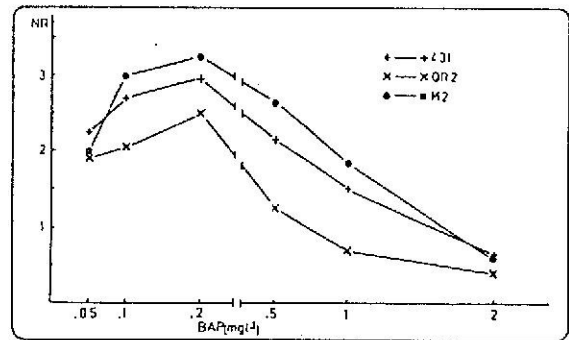


Fig. C5 - Efeito da concentração de BAP no número de rebentos formados por clone

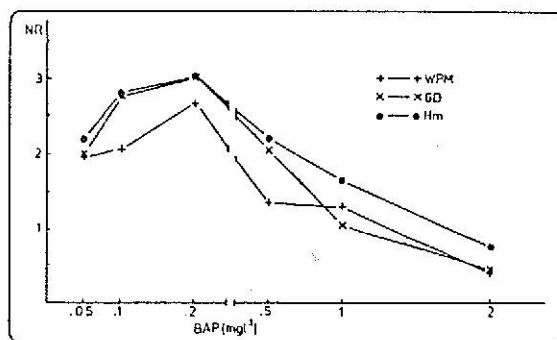


Fig. C6 - Efeito da concentração de BAP no número de rebentos formados por meio de cultura

lhantes às resultantes da interacção Clone * BAP, o que confirma o papel determinante da concentração de BAP na capacidade proliferativa dos explants e uma muito menor influência quer do clone quer do meio de cultura utilizados. Em termos de valores absolutos, referência para os melhores resultados obtidos nos meios de GD e Hm (3.00 e 3.02, sem diferença significativa) na concentração de 0.2 mg l^{-1} , e também na combinação Hm + 0.1 mg l^{-1} , com 2.79 e não significativamente diferente das anteriores. Mais uma vez se confirma a menor adaptação do meio WPM na capacidade de facilitar a promoção e permitir o desenvolvimento de rebentos. A amplitude da variação obtida, 2.59 (3.02 - 0.43) quando comparada com a provocada pela interacção Clone * BAP, 2.86, confirma o igual contributo para a explicação da variabilidade total dada pela análise de variância (Anexo I-Tab. C1). As concentrações mais elevadas de BAP provocam também, qualquer que seja a formulação nutritiva utilizada, um acentuado decréscimo na taxa de multiplicação, tal como já havia sido verificado em função do clone.

A interacção Meio * BAP permite-nos generalizar, dentro dos níveis utilizados destes factores, os resultados obtidos na taxa de multiplicação a sistemas de propagação *in vitro*, com base nas respostas dos três clones utilizados. Os valores obtidos para as médias estão indicados no Anexo I-Tab. C7 e representados graficamente na Fig. C6. Da sua análise verificamos um traçado de curvas em tudo muito seme-

A análise dos resultados das médias obtidas na interacção Clone * Meio * BAP, permite-nos analisar as variações das taxas de multiplicação para cada uma das combinações específicas entre estes factores. Esta interacção apresentou um valor de F significativo ($P > 0.0001$), como tal torna-se importante saber como varia a taxa de multiplicação de cada clone em

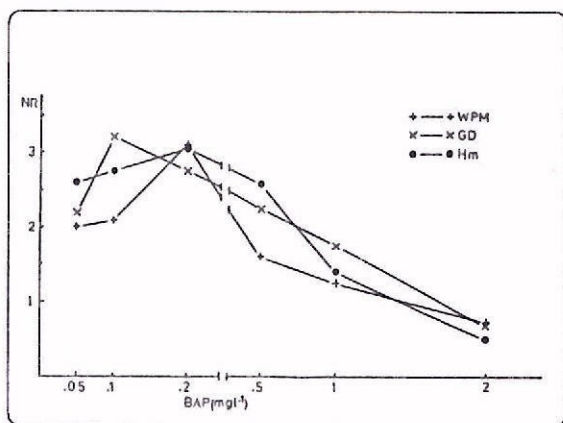


Fig. C7 - Efeito da concentração de BAP em cada um dos meios de cultura, no número de rebentos formados para o clone 431

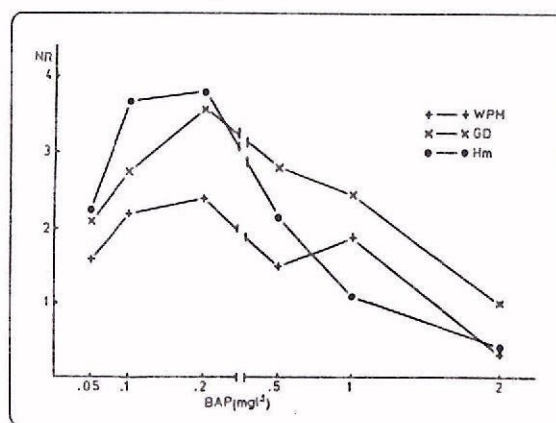


Fig. C8 - Efeito da concentração de BAP em cada um dos meios de cultura no número de rebentos formados para o clone M2

função do meio e da concentração de BAP utilizada para a sua multiplicação *in vitro*. Os resultados estão indicados no Anexo I-Tab. C8 e representados graficamente nas Fig. C7, C8 e C10.

Estes resultados confirmam e permitem esclarecer alguns dos aspectos que anteriormente temos vindo a referir. De facto os resultados obtidos na taxa de multiplicação do

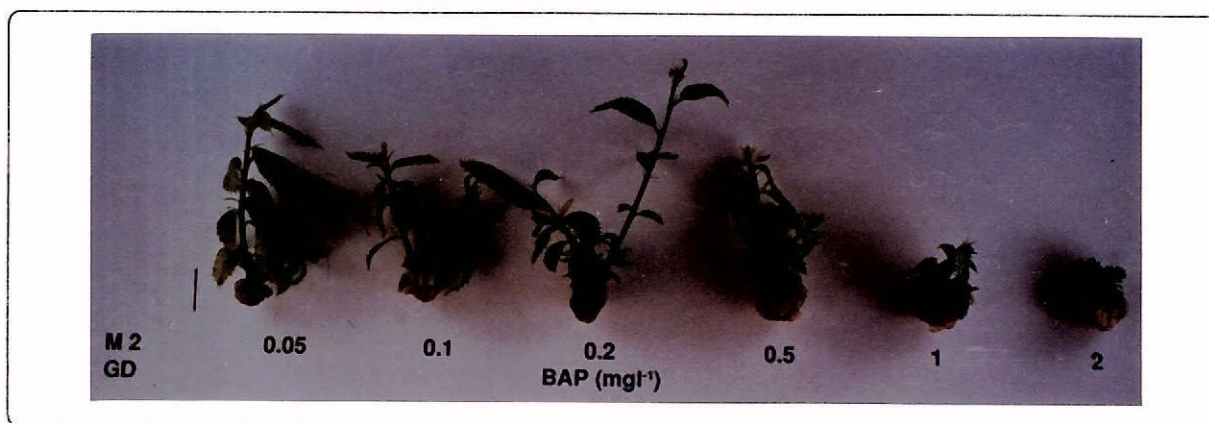


Fig. C9 - Efeito das concentrações de BAP na morfologia dos rebentos no clone M2 (o traço indica 1 cm).

clone M2 (Fig. C8 e C9), são os mais elevados e registaram-se na combinação de GD + 0.2 mg/l de BAP, e em Hm + 0.1 e 0.2 mg/l de BAP (3.56, 3.79 e 3.68 respectivamente, sem diferenças significativas). Em relação ao clone 431 (Fig. C7), nenhum dos melhores valores obtidos conseguiu igualar os do clone M2, já que a melhor taxa de multiplicação se obteve nas combinações de GD + 0.1 mg/l de BAP, WPM + 0.2 mg/l de BAP e Hm + 0.2 mg/l de

BAP, com 3.21, 3.09 e 3.06 respectivamente e sem diferença significativa. O meio WPM, que através das análises anteriores se havia mostrado como muito pouco favorável ao desenvol-

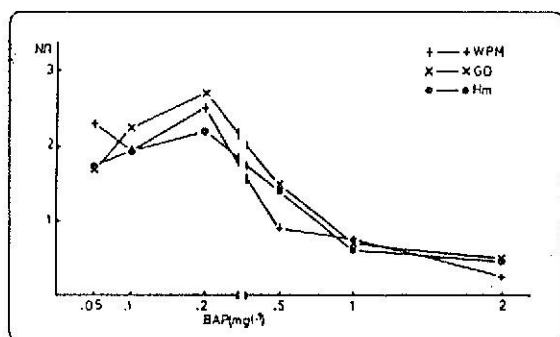


Fig. C10 - Efeito da concentração de BAP em cada um dos meios de cultura no número de rebentos formados para o clone QR2

vimento dos rebentos, aparece aqui numa combinação muito específica, a permitir obtenção de uma taxa de multiplicação idêntica aos valores mais altos obtidos com as outras formulações. Devemos no entanto voltar a referir o aparecimento de alterações morfológicas frequentes com este meio, o que desaconselha a sua utilização.

Para o clone QR2 (Fig. C10), confirma-se a sua menor capacidade de reacção para todas as combinações utilizadas, sendo os valores máximos obtidos na combinação de GD + 0.2 mg l⁻¹ de BAP (2.71) e WPM + 0.2 mg l⁻¹ de BAP (2.53), sem diferença significativa. Também neste clone, com a utilização do meio WPM, se registaram alterações a nível morfológico.

2.2 - Comprimento do maior rebento

A análise deste parâmetro permite-nos inferir quais os efeitos dos factores meio e concentração de BAP nos genótipos dos clones utilizados, por forma a permitir o alongamento dos rebentos formados, condição essencial para a obtenção de populações stock por subcultivos sucessivos e, obtenção de rebentos com possibilidade de serem sujeitos a tratamentos indutores de rizogénese.

Os resultados da análise de variância efectuada (Anexo I-Tab. C9), mostra-nos valores de F altamente significativos ($P > 0.0001$) para todas as fontes capazes de induzir variabilidade (para Meio * BAP, $P > 0.0012$). Como tal, também o comprimento do maior rebento está dependente dos efeitos dos factores estudados e das suas interacções.

É de referir a importância determinante da concentração de BAP na explicação da variabilidade registada (34%) e também da influência do clone (11%). Os meios de cultura, apesar de apresentarem valores de F significativos, contribuem muito pouco para a explicação da variabilidade, e as interacções no seu conjunto contribuem com 14.9%. O erro experimental comprova a variabilidade da resposta do material vegetal já referida anteriormente (cf. 2.1 - Taxa de multiplicação).

Os valores das médias obtidas para o comprimento do maior rebento por clone, estão indicados na Fig. C11 e Anexo I-Tab. C10, apresentando o clone 431 um valor de 23.38 mm,

que se distingue dos outros dois clones. Esta análise apresenta valores de alongamento para os clones M2 e QR2 sem diferença significativa, e com valores absolutos relativamente baixos, o que poderia deixar antever uma certa dificuldade de alongamento e, como tal, comprometer o processo global de micropropagação. Se de facto para o clone QR2 assim é,

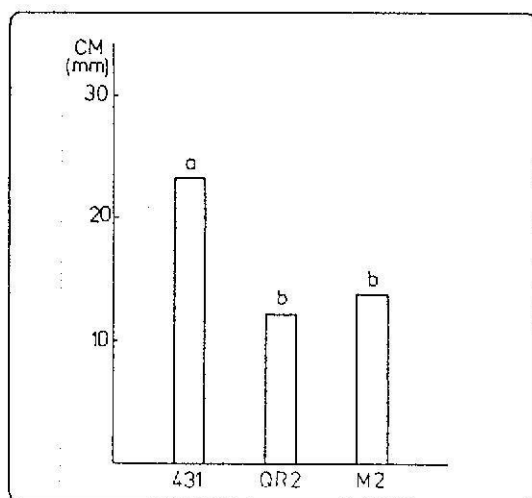


Fig. C11 - Comprimento do maior rebento formado em cada um dos clones

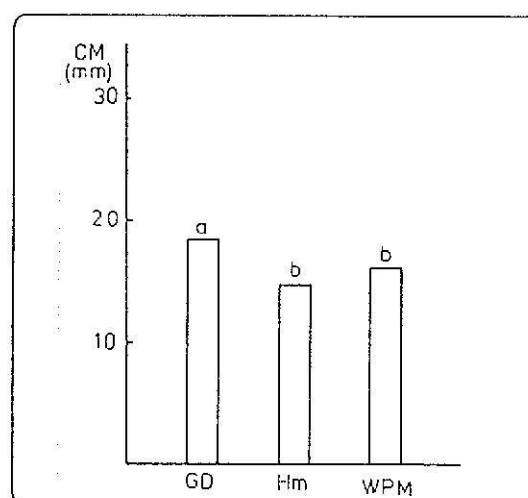


Fig. C12 - Efeito do meio de cultura no comprimento do maior rebento

já o mesmo não acontece com o clone M2, onde se regista uma influência determinante da concentração de BAP como se irá referir.

Em relação aos meios de cultura utilizados, a variabilidade provocada é muito baixa, 3.67 mm (18.41 - 14.74), sendo no entanto de destacar a influência significativa da formulação de GD sobre as outras duas (Fig. C12 e Anexo I-Tab. C11).

Pela análise da Fig. C13 e Anexo I-Tab. C12, verificamos a importante variação provocada pelos diferentes níveis de concentração de BAP utilizados, 22.59 mm (26.18 - 3.59), o que confirma na prática a informação dada pela análise de variância. As concentrações mais baixas mostraram-se mais favoráveis ao alongamento dos rebentos, 26.18 e 25.34 mm com 0.05 e 0.1 mg l⁻¹ de BAP respectivamente e sem diferença significativa, com um aspecto morfológico normal mas com entrenós muito alongados (Fig. C18), tendo a concentração de 0.2 mg l⁻¹ permitido um alongamento superior aos 20 mm. A partir desta concentração regista-se de novo um acréscimo significativo do declive da curva, o que traduz um forte efeito inibidor no alongamento de rebentos dos clones para os meios utilizados.

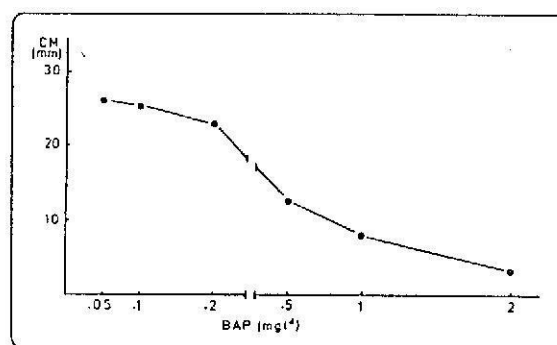


Fig. C13 - Efeito da concentração de BAP no comprimento do maior rebento

A interacção Clone * Meio, de pouca importância para a explicação da variabilidade registada, permite-nos verificar a relação destes factores no alongamento, e as médias obtidas estão indicadas no Anexo I-Tab. C13 e representados graficamente na Fig. C14. Assim registou-se o valor mais elevado na combinação de GD e WPM com o clone 431 (com 23.97 e 25.01, sem diferença significativa), valores bastante baixos para o clone QR2 em qualquer dos meios e um efeito bastante benéfico da formulação de GD para o clone M2. De referir ainda a maior variabilidade registada em função do clone do que em relação ao meio de cultura, 11.07 contra 3.67, previsto na análise de variância.

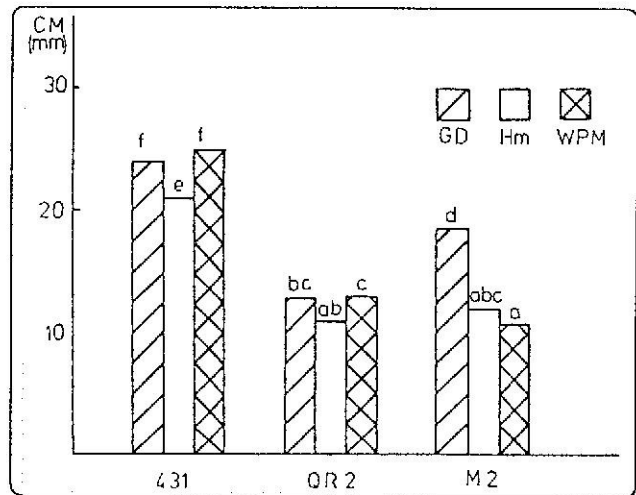


Fig. C14 - Efeito dos meios de cultura no comprimento do maior rebento em cada um dos clones

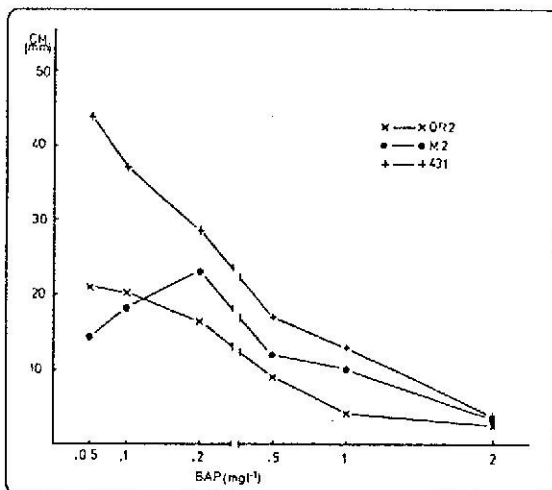


Fig. C15 - Efeito da concentração de BAP no comprimento do maior rebento em cada clone

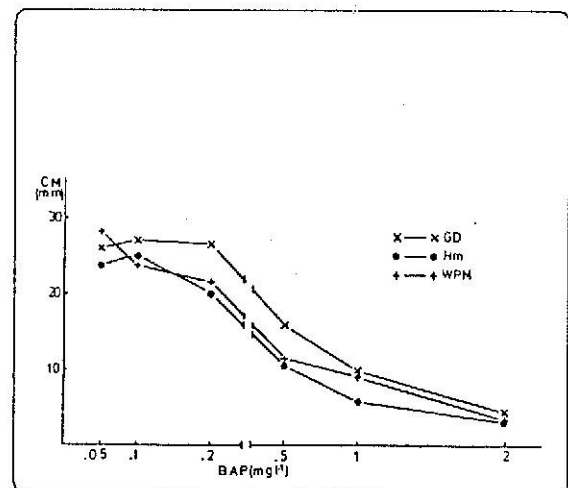


Fig. C16 - Efeito da concentração de BAP e do meio de cultura no comprimento do maior rebento

A interacção Clone * BAP, cujos resultados estão indicados na Fig. C15 e Anexo I-Tab. C14, permite obter uma percepção mais concreta da variação deste parâmetro, já que estão em análise os factores que mais contribuem para a variabilidade existente. Assim, para os clones 431 e QR2, regista-se uma resposta com sucessivos decréscimos à medida que a concentração de BAP aumenta, embora com valores absolutos muito diferentes, pois que para o clone 431 se atingiu uma média para o valor máximo de 42.98 mm, para o clone QR2 o melhor valor foi de 20.97 mm. Em relação ao clone M2, os valores obtidos não seguem este decréscimo gradual à medida que a concentração aumenta (Fig. C9), pois que se registou um valor crescente até à concentração de 0.2 mg l⁻¹ de BAP, inflectindo de novo a partir deste

ponto. Este comportamento poderá ter a ver com a forte dependência deste clone com o meio de cultura (Fig. C14).

A interação Meio * BAP cujas médias obtidas estão indicadas no Anexo I-Tab. C15 e representadas graficamente na Fig. C16, indicam-nos a pouca variabilidade provocada pelos meios de cultura, sendo a maior de 6.63 mm na concentração de 0.2 mg l^{-1} (26.73 - 20.10), em relação à provocada pela concentração de BAP, que é de 25.23 no meio WPM (28.36 - 3.13).

Nas Fig. C17, C19 e C20 estão as representações gráficas das médias obtidas no comprimento do maior rebento, indicadas no Anexo I-Tab. C16, da interação Clone * Meio * BAP, permitindo assim observar os resultados para cada uma das combinações específicas dos factores estudados. Também o comprimento do maior rebento mostrou uma forte dependência das combinações específicas dos níveis dos diferentes factores ($P > 0.0001$) e, como tal, torna-se importante extrair quais as combinações mais favoráveis para cada um dos clones.

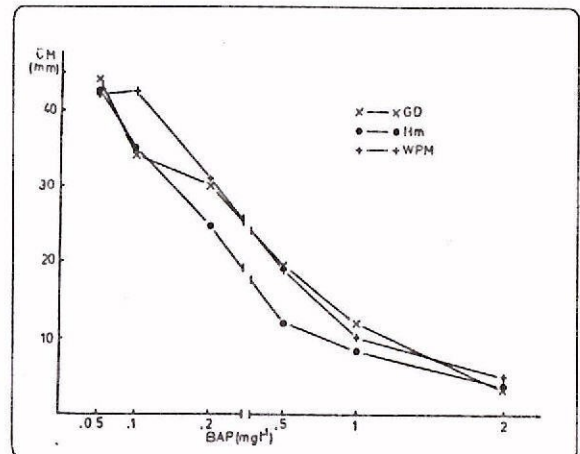


Fig. C17 - Efeito da concentração de BAP em cada um dos meios de cultura, no comprimento do maior rebento para o clone 431

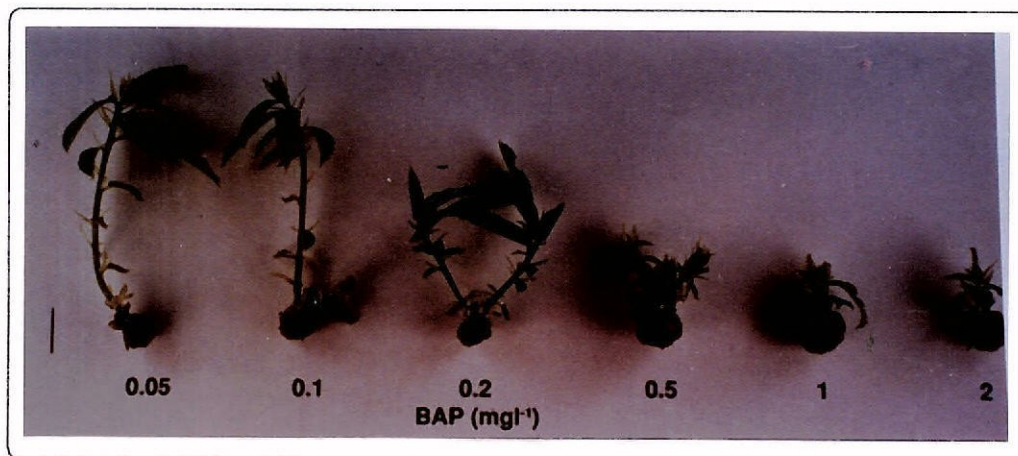


Fig. C18 - Variação no comprimento dos rebentos provocada pelas diferentes concentrações de BAP no clone 431, em Hm (o traço indica 1 cm)

Em relação ao clone 431, os traçados das curvas resultantes do efeito dos meios de cultura para cada uma das concentrações de BAP, apresentam-se, de certa forma muito semelhantes (Fig. C17), com os máximos a serem obtidos na concentração de 0.05 mg l^{-1} de BAP, para qualquer dos meios e sem diferença significativa (42.38, 42.53 e 42.03 mm para os meios de GD, Hm e WPM respectivamente), e com um decréscimo gradual à medida que a concentração de BAP aumenta (Fig. C17 e C18).

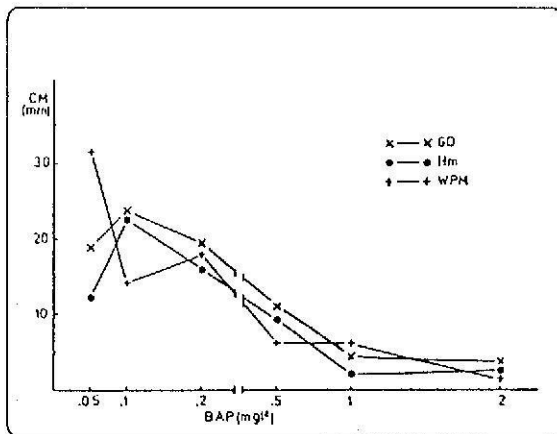


Fig. C19 - Efeito da concentração de BAP em cada um dos meios de cultura no comprimento do maior rebento para o clone QR2

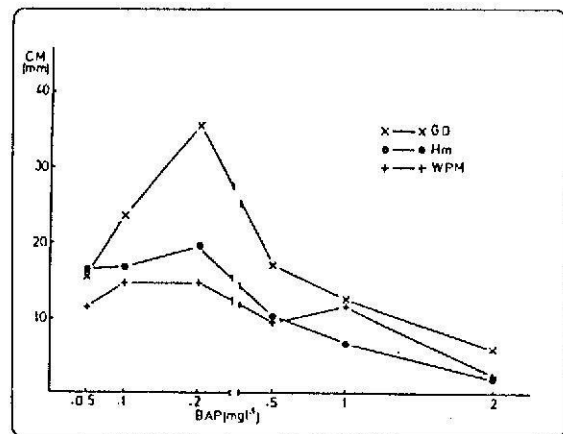


Fig. C20 - Efeito da concentração de BAP em cada um dos meios de cultura no comprimento do maior rebento para o clone M2

Para o clone QR2 (Fig. C19), registou-se uma variação bastante aleatória, com o máximo absoluto a ser conseguido no meio de WPM + 0.05 mg/l⁻¹ de BAP, mas apresentando uma variação morfológica muito grande, aparecendo os rebentos com aspecto estiolado e hidratados, tendo nos meios de GD e Hm o alongamento sido máximo na concentração de 0.1 mg/l⁻¹ de BAP, com um aspecto fenotípico dos rebentos aparentemente normal.

Para o clone M2, tal como havia sido anteriormente previsto pelas interações Clone * BAP e Meio * BAP, regista-se o máximo de alongamento, para qualquer das formulações nutritivas, em 0.2 mg/l⁻¹ de BAP (Fig. C20), embora nos meios Hm e WPM as concentrações de 0.05 e 0.1 mg/l⁻¹ de BAP tenham apresentado valores não diferentes significativamente, mas já na formulação de GD a combinação com 0.2 mg/l⁻¹ de BAP destaca-se, em relação às restantes, como forte promotora do alongamento neste clone com 35.62 mm.

Para qualquer dos clones, a utilização de concentrações elevadas de BAP, provoca um efeito inibidor no alongamento dos rebentos, qualquer que seja a formulação nutritiva utilizada.

2.3 - Número de segmentos

A utilização do parâmetro número de segmentos como quantificador da capacidade de multiplicação de uma determinada espécie vegetal é, sem dúvida, de grande importância, quando se utilizam subcultivos sucessivos de rebentos regenerados *in vitro* para a obtenção de populações. Nestas circunstâncias é, talvez, mais importante determinar o número de explants possíveis de obter, do que o número de rebentos, pois que estes apenas se tornam determinantes na fase de passagem para rizogénese. É no entanto evidente que este parâmetro está não só directamente relacionado com a capacidade de multiplicação do explant e do

alongamento dos rebentos formados por este, mas também com a própria morfologia desses mesmos rebentos, fundamentalmente a distância entre nós, que implica uma variação no número de gomos axilares formados.

A análise de variância do número de segmentos, definidos em Material e Métodos como tendo 5 a 8 mm de comprimento e um mínimo de dois gomos axilares, forneceu valores de F altamente significativos ($P > 0.0001$) quer para o efeito dos factores em estudo, quer para as possíveis interacções (Anexo I-Tab. C17), o que significa uma forte dependência do número de segmentos para os factores clone, meio de cultura, concentração de BAP e respectivas interacções. No entanto, também o factor concentração de BAP é o principal responsável na variabilidade existente em relação ao número de segmentos obtidos por explant, tal como havia já acontecido para a taxa de multiplicação e alongamento. De facto, ela é responsável por 41% da variação registada, sendo o restante atribuído ao factor clone (10%), meio de cultura (1.5%), interacções (11%) e o restante dado pelo erro experimental. Estes valores são bastante semelhantes aos obtidos para a explicação da variabilidade registada quer na taxa de multiplicação quer no alongamento, resultado previsível uma vez que, como dissemos, o número de segmentos está muito directamente relacionado com aqueles parâmetros.

O valor de 3.3 segmentos obtidos como grande média, traduz um valor relativamente baixo para este parâmetro, mas, como se irá verificar, ele resulta das grandes amplitudes nos intervalos de resposta muito de acordo com as combinações específicas dos factores em estudo, daí se terem registado grandes diferenças significativas.

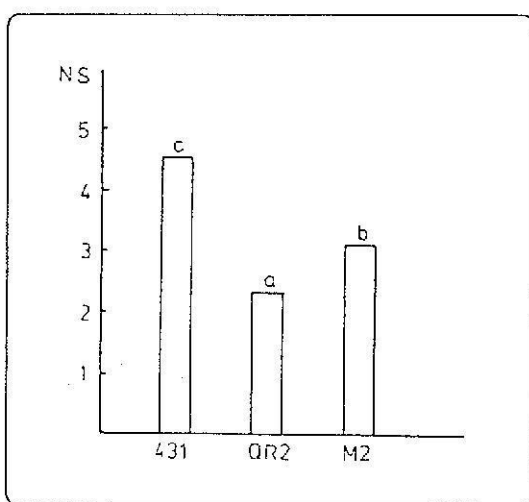


Fig. C21 - Número de segmentos obtidos em cada um dos clones

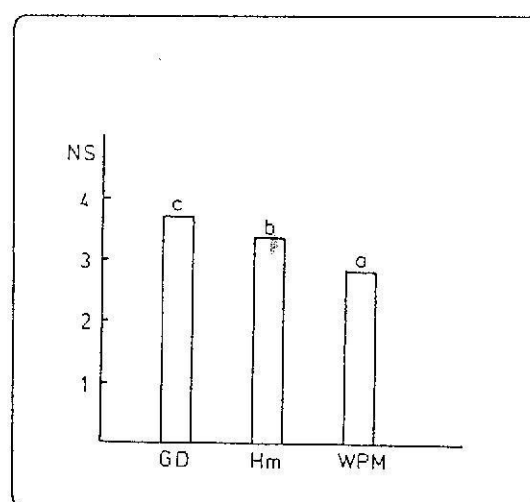


Fig. C22 - Efeito do meio de cultura no número de segmentos obtidos

Na Fig. C21 apresenta-se graficamente a variação no número de segmentos obtidos para cada um dos clones, sendo de destacar as diferenças significativas entre todos eles

(4.51, 3.09 e 2.30 para 431, M2 e QR2 respectivamente), com uma diferença máxima de 2.21 (4.51 - 2.30).

Menor variabilidade, tal como havia sido indicado pela análise de variância, se registou por influência das formulações nutritivas, com um valor de 0.89 segmentos. O meio GD mostrou ser o mais favorável no global de todas as combinações possíveis, tendo o meio WPM apresentado o valor mais baixo (Fig. C22 e Anexo I-Tab. C19).

Em relação aos efeitos provocados pelos diferentes níveis de BAP, a Fig. C23 mostra claramente as grandes diferenças que se registam no número de segmentos possíveis de obter em cada um deles. De facto, de um máximo de 5.54 obtido com 0.2 mg l^{-1} de BAP (embora sem diferença significativa da concentração de 0.1 mg l^{-1}), passamos para 0.59 obtido com 2 mg l^{-1} , ou seja uma amplitude de 4.95, confirmando-se assim este factor como principal responsável na variabilidade do número de segmentos possíveis de obter por explant em cada ciclo de cultura.

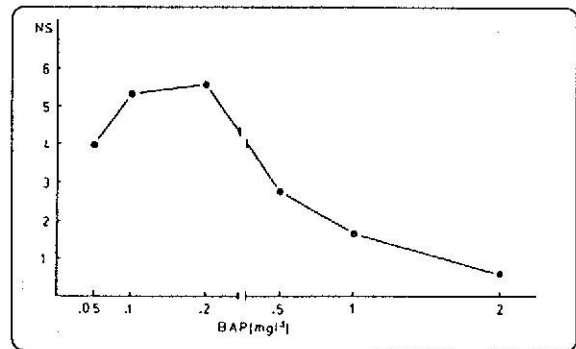


Fig. C23 - Efeito da concentração de BAP no número de segmentos obtidos

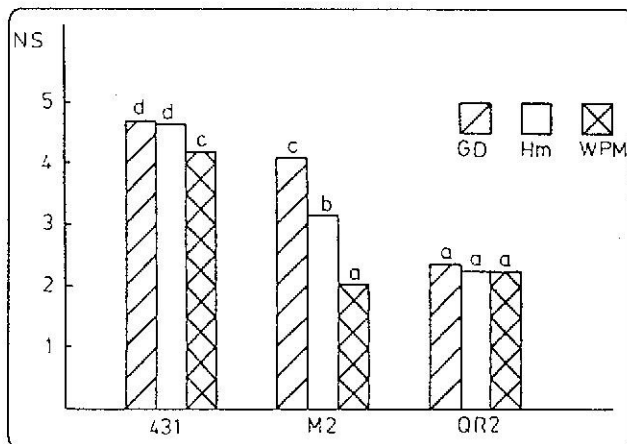


Fig. C24 - Efeito dos diferentes meios de cultura no número de segmentos obtidos por clone

A interacção Clone * Meio, representada graficamente na Fig. C24, permite-nos associar as melhores formulações nutritivas para cada um dos clones. Se para o clone QR2 não se registam quaisquer diferenças significativas provocadas pelas variações nutritivas, já o mesmo não acontece em relação aos outros dois clones. Assim para o 431 os meios GD e Hm são os mais favoráveis, sem diferença significativa e, para o clone M2 o efeito provocado pelo meio GD é significativamente diferente dos restantes (4.09, 3.16 e 2.03).

As Fig. C25 e C26, representam a variação do número de segmentos obtidos na interacção Clone * BAP e Meio * BAP, e o traçado das curvas é algo semelhante àquela que descreve o comportamento desta variável em função exclusiva da concentração de BAP (Fig. C23), já que a interacção se dá com os dois factores que pouca variabilidade provocam no número de segmentos possíveis de obter, como anteriormente referimos. Estas interacções permitem-nos analisar o comportamento para cada um dos clones e meios utilizados. Assim, no primeiro caso confirma-se o melhor resultado obtido pelo clone 431, sendo de referir os elevados valores obtidos na combinação com 0.1 mg l^{-1} de BAP (7.83) e 0.2 mg l^{-1} (7.14),

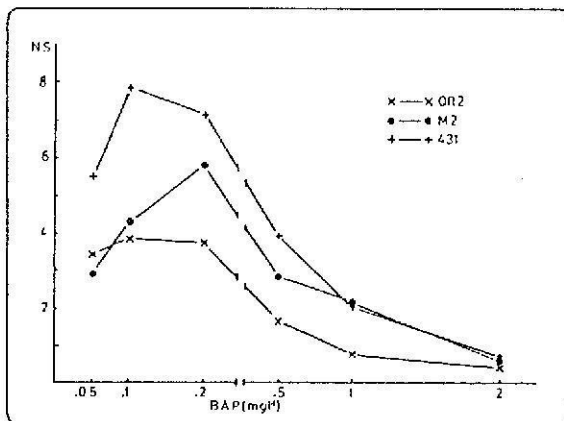


Fig. C25 - Efeito da concentração de BAP no número de segmentos obtidos para cada um dos clones

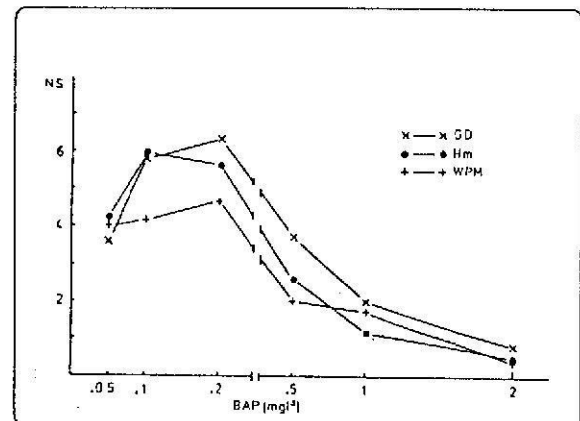


Fig. C26 - Efeito da concentração de BAP no número de segmentos obtidos em cada um dos meios de cultura

sem diferença significativa. Também a combinação de 0.2 mg l^{-1} de BAP permitiu um valor bastante elevado para o clone M2, 5.77 e significativamente diferente de todos os outros. O clone QR2 apresentou os valores mais baixos, sendo as concentrações de 0.1 e 0.2 mg l^{-1} de BAP as que permitiram melhores resultados (3.85 e 3.70 respectivamente e sem diferença significativa). Em relação à influência dos meios de cultura utilizados as variações registadas não foram tão acentuadas. De facto entre os meios GD e Hm destacam-se significativamente as combinações de GD + 0.2 e de Hm + 0.1 mg l^{-1} de BAP com 6.34 e 5.99 respectivamente, registando-se depois uma série de valores bastante semelhantes. Em relação ao meio WPM confirmam-se os menores valores absolutos no geral das combinações de BAP, como consequência da menor capacidade em permitir um bom desenvolvimento dos rebentos. O número de segmentos possíveis de obter sofre acentuado decréscimo quando as concentrações de BAP se incrementam acima dos 0.2 mg l^{-1} , e isto quer em função do clone quer em função do meio.

Por último, as Fig. C27, C28 e C29, são a representação gráfica das médias do número

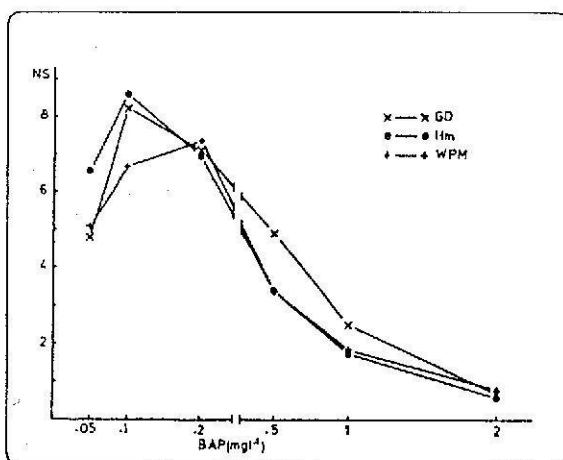


Fig. C27 - Efeito da concentração de BAP em cada um dos meios de cultura no número de segmentos obtidos para o clone 431

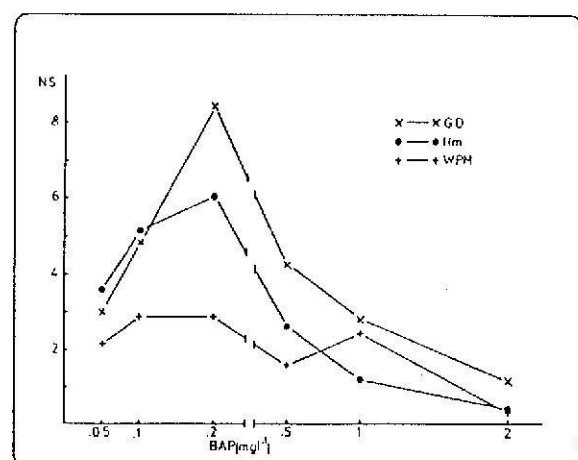


Fig. C28 - Efeito da concentração de BAP em cada um dos meios de cultura no número de segmentos obtidos, para o clone M2

de segmentos obtidos em função de cada uma das combinações dos factores utilizados, e indicadas no Anexo I-Tab. C24. Em relação ao clone 431 (Fig. C27), os melhores resultados foram os obtidos nas formulações de Hm e GD com 0.1 mg l^{-1} (8.59 e 8.24 respectivamente e sem diferença significativa), apresentando-se ainda outras combinações com valores relativamente elevados. Para o clone M2 (Fig. C28), destaca-se o valor obtido na combinação GD + 0.2 mg l^{-1} , 8.44 segmentos, ficando as restantes médias mais próximas praticamente a metade deste valor. Estes resultados traduzem uma maior adaptabilidade ou tolerância do genótipo do clone 431 em relação ao clone M2. Para o clone QR2 (Fig. C29), o máximo de segmentos

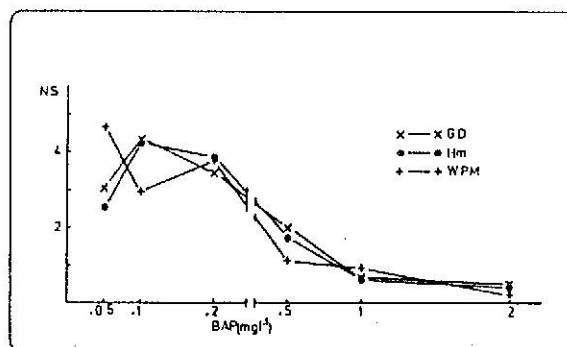


Fig. C29 - Efeito da concentração de BAP em cada um dos meios de cultura no número de segmentos obtidos, para o clone QR2

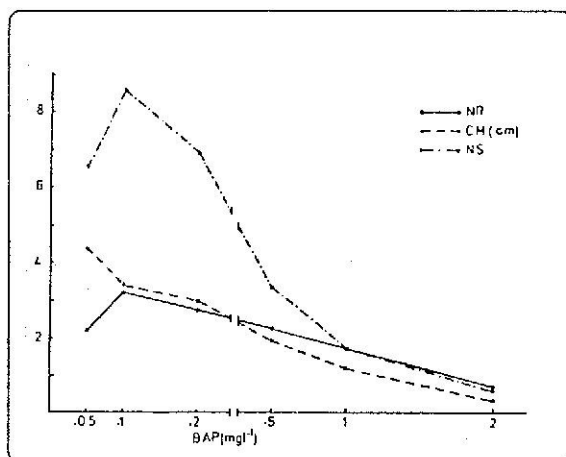


Fig. C30 - Variação do número de rebentos (NR), comprimento do maior rebento (CM) e número de segmentos (NS) obtidos nos melhores meios de cultura em cada uma das concentrações de BAP para o clone 431

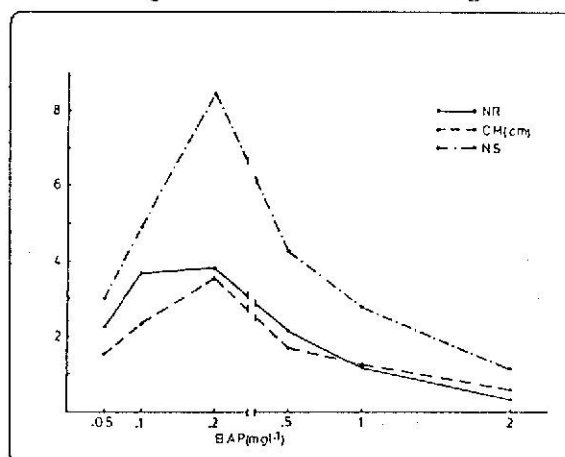


Fig. C31 - Variação do número de rebentos (NR), comprimento do maior rebento (CM) e número de segmentos (NS) obtidos nos melhores meios de cultura em cada uma das concentrações de BAP para o clone M2

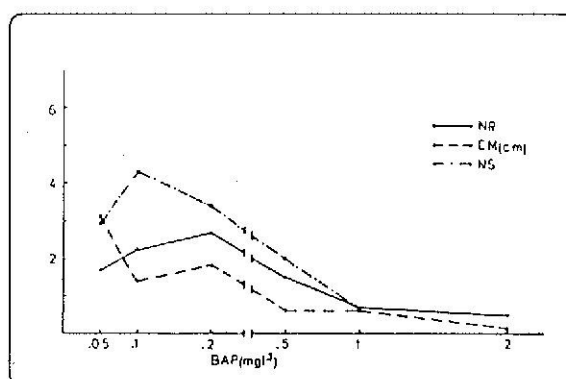


Fig. C32 - Variação do número de rebentos (NR), comprimento do maior rebento (CM) e número de segmentos (NS) obtidos nos melhores meios de cultura em cada uma das concentrações de BAP para o clone QR2

foi obtido na combinação WPM + 0.05 mg l^{-1} de BAP, com 4.65, embora sem diferença significativa para as combinações Hm e GD + 0.1 mg l^{-1} de BAP, com 4.24 e 4.38 respectivamente.

Dada a confirmação estatística da forte interacção que exercem os factores em estudo nos diferentes parâmetros que acabamos de analisar, elaborámos as representações gráficas das Fig. C30, C31 e C32 que indicam as melhores combinações absolutas obtidas para cada um dos clones 431, M2 e QR2, por forma a dar uma ideia global do comportamento de cada

um dos parâmetros quantificadores que nos permitiram analisar a fase de multiplicação nestes três genótipos.

II. FASE DE ENRAIZAMENTO

Os ensaios de enraizamento tiveram por objectivo avaliar a capacidade de indução de um sistema radicular adventício nos rebentos obtidos na fase de multiplicação, por acção de uma auxina, o ácido 3-indol butírico (AIB), aplicado por duas metodologias diferentes, inclusão no meio de cultura e utilização de uma solução concentrada de AIB, segundo o descrito em Material e Métodos. Analisou-se também a influência da solução nutritiva no desenvolvimento do sistema radicular bem como as possíveis diferenças interclonais. As tabelas das análises de variância e das médias obtidas para cada um dos parâmetros quantificadores, são apresentadas em Anexo (Tabela C25 e seguintes), e foram elaboradas tendo em conta a dimensão total da amostra.

1. Aplicação de AIB no meio de cultura

Em relação ao número de raízes formadas, após 30 dias, verificamos que quer o meio de cultura quer a concentração de AIB provocam efeitos significativos, bem como a sua interacção (Anexo I-Tab. C25), sendo de referir a maior variabilidade provocada pelo nível de AIB utilizado. Dos valores das médias obtidas, destaca-se a combinação $1/2GD + 5 \text{ mg l}^{-1}$ de AIB que permitiu a formação de uma média de 4 raízes na globalidade dos 34 rebentos colocados em cultura e de 4.8 raízes se considerarmos apenas os rebentos enraizados (Tab. C2), tendo-se registado um decréscimo quando se utilizaram concentrações mais baixas. Com o meio MSm a variação entre o número de raízes não apresentou qualquer diferença significativa entre as diferentes concentrações de AIB utilizadas.

Também o alongamento radicular é influenciado pela concentração de AIB utilizada na indução de rizogénese, pela solução nutritiva onde esse alongamento teve lugar e pela interacção entre estes dois factores (Anexo I-Tab. C29). A combinação de $1/2GD + 5 \text{ mg l}^{-1}$ de AIB permitiu o maior alongamento radicular (Anexo I-Tab. C32) com 29.82 mm, embora sem diferença significativa da combinação $1/2GD + 3 \text{ mg l}^{-1}$ de AIB, com 24.68 mm. Estes valores são relativamente diferentes se analisarmos o comprimento da maior raiz em relação ao número de rebentos enraizados (Tab. C2), onde o melhor alongamento, com diferença significativa, se deu na combinação $1/2GD + 3 \text{ mg l}^{-1}$ de AIB, com 49.35 mm. Com a formulação de MSm os valores obtidos foram inferiores e sem diferença significativa entre eles.

Tab C2 - Efeito da formulação nutritiva e concentração de AIB no meio de cultura, no número de raízes formadas por rebento enraizado (NRa), comprimento médio (mm) da maior raiz, por rebento enraizado (CMRa), comprimento médio (mm) de todas as raízes formadas por rebento enraizado (Cmra) e percentagem de enraizamento (%), no clone 431

AIB (mg l ⁻¹)	Meio							
	1/2 GD				MSm			
	NRa	CMRa	Cmra	%	NRa	CMRa	Cmra	%
1.5	1.00b	20.50c	20.50b	5.9c	3.33a	21.00a	9.53a	8.9c
3	2.53b	49.35a	38.04a	50.0b	2.64a	13.90a	10.11a	32.4b
5	4.86a	36.21b	23.80b	82.4a	3.14a	19.46a	14.00a	82.4a

Separação de médias na coluna por LSD 5%. Percentagens analisadas após transformação em arcsen.

Os valores das médias de todas as raízes que um rebento formou (Cmra), apresentam um comportamento em tudo idêntico aos valores da maior raiz, sendo influenciado pela concentração de AIB, meio de cultura e interação entre eles (Anexo I-Tab. C33). Este parâmetro dá-nos uma imagem mais concreta da morfologia radicular do rebento enraizado e, com a formulação de 1/2GD, podemos considerá-la como bastante equilibrada e suficientemente desenvolvida (Fig. C33).

Finalmente, um aspecto essencial na determinação da eficiência de um tratamento para induzir rizogénese, diz respeito ao número de plantas que conseguem desenvolver um sistema radicular funcional. E neste caso registámos percentagens de enraizamento relativamente semelhantes para qualquer das formulações utilizadas, mas diferentes com base na concentração de AIB, permitindo a concentração de 5 mg l⁻¹ de AIB uma percentagem de 82.4% (Tab. C2). Para material de origem adulta, e para este género, pode-se considerar bastante elevada, tendo as concentrações de 1.5 e 3 mg l⁻¹ de AIB registado percentagens significativamente inferiores.

A Tab. C2, já anteriormente referenciada, indica-nos as médias dos parâmetros quantificados, obtidas em relação apenas aos rebentos enraizados. Se para o caso de combinações



Fig. C33 - Rebentos enraizados em 1/2 GD com 5 mg l⁻¹ de AIB

que permitem elevadas percentagens de enraizamento, os valores obtidos não se alteram em muito, já o mesmo não acontece para as médias que são obtidas nos tratamentos que permitem fracas percentagens de enraizamento.

2. Aplicação de AIB por imersão basal do rebento

Com esta metodologia obteve-se um comportamento muito mais homogéneo dos parâmetros quantificados relativamente aos tratamentos com AIB no meio de cultura.

Em relação ao número de raízes formadas, verificámos que a acção dos factores clone e tempo de exposição do rebento à solução concentrada de AIB por si só, não provocaram efeitos significativos, mas apenas se registaram diferenças na sua interacção (Anexo I-Tab. C37). Assim, registou-se a obtenção de 1.65 raízes na combinação do clone M2 com exposição de 60 s (sem diferença significativa para 120 s), tendo para o clone 431 o tempo de 30 s de exposição sido o mais favorável, embora sem diferença para os restantes tempos (Anexo I-Tab. C38). Se considerarmos as médias obtidas apenas em relação ao número de rebentos enraizados, os valores absolutos obtidos sobem bastante, e deixa de se registar qualquer diferença significativa entre eles, quer por acção do clone quer por acção do tempo de exposição (Tab. C3).

Tab C3 - Efeito do tempo de imersão em AIB 1 gr⁻¹, no enraizamento de dois clones, no meio 1/2GD. (NRa, número de raízes formadas por rebento enraizado; CMRa, comprimento médio (mm) da maior raiz, por rebento enraizado; Cmra, comprimento médio (mm) de todas as raízes formadas por rebento enraizado; %, percentagem de enraizamento)

Tempo (s)	Clone							
	M2				431			
	NRa	CMRa	Cmra	%	NRa	CMRa	Cmra	%
30	2.14a	23.71a	17.04a	21.0b	2.16a	29.52a	26.53a	74.0a
60	3.29a	23.00a	19.21a	50.0a	2.44a	28.33a	23.30a	53.0ab
120	3.00a	23.00a	18.21a	44.0a	2.73a	26.86a	23.18a	44.0b

Separação de médias na coluna por LSD 5%. Percentagens analisadas após transformação em arcsen

Para o comprimento da maior raiz, registou-se efeito significativo do factor clone e da sua interacção com o tempo de exposição (Anexo I-Tab. C39). A diferença obtida entre os dois clones foi de 7.35 mm (16.19 para o clone 431 e 8.84 mm para o clone M2), tendo a aplicação de 30 s de exposição ao AIB permitido o melhor alongamento no clone 431 (sem diferença significativa para o tempo de 60 s), com 21.71 mm, não tendo o clone M2 ultrapassado os 11.50 mm como melhor alongamento (Anexo I-Tab. C41). Na análise feita com base

apenas no número de rebentos enraizados (Tab. C3), verificamos que os clones deixam de apresentar um comportamento tão diferente, já que as médias para o clone M2 atingem os 23.71 mm no tempo de exposição de 30 s, sem diferença significativa dos outros dois tempos, e para o clone 431 os valores oscilam entre 26.86 mm e 29.52 mm, sem diferença significativa.

O comprimento médio de todas as raízes obtidas por rebento apresentou-se também como um parâmetro influenciado pelo tipo de clone e pela sua interacção com o tempo de exposição à solução de AIB (Anexo I-Tab. C43), não tendo este factor, só por si, gerado diferenças significativas. Como seria de prever, face aos resultados obtidos para o comprimento da maior raiz, também o clone 431 obteve os melhores valores, tendo a utilização de 30 s de exposição apresentado o melhor resultado, 19.51 mm (Anexo I-Tab. C44). Se analisarmos os resultados com base no número de rebentos enraizados (Tab. C3), mais uma vez desaparecem as diferenças significativas entre as médias obtidas por acção dos níveis dos factores utilizados e, como tal, os valores apresentam-se bastante homogéneos.

As percentagens obtidas por este método, no enraizamento dos dois clones utilizados, não se mostraram tão discrepantes em relação às obtidas com a utilização de AIB no meio de cultura, tendo no clone M2 variado entre os 21 e os 50% e, para o clone 431, entre 44 e 74% (Tab. C3). Se para este clone o valor obtido com a utilização de um tempo de 30 s, 74%, se pode considerar como satisfatório, atendendo a que se trata de material adulto, já os 50% obtidos para o clone M2 ficam muito aquém do desejável num sistema de micropropagação.

3. Efeito da aplicação da gota de BAP

Este registo efectuou-se em simultâneo com os ensaios de enraizamento, e os resultados apresentados na Tab. C4, foram obtidos com o clone 431 no meio de 1/2GD.

Tab. C4 - Efeito da aplicação da gota de agar com BAP em rebentos decapitados. (Clone 431, meio de cultura 1/2 GD, \pm erro padrão da média).

AIB (mg l ⁻¹)	% enraizamento	% abrolhamento	comprimento do rebento (mm)
1.5	5.9	100	14.5 \pm 1.16
3	50.0	94	7.7 \pm 1.02
5	82.4	71	8.5 \pm 1.21

Parece poder afirmar-se que a capacidade da gota de BAP agarizada provocar o abrolhamento no rebento decapitado, não é muito afectada pela concentração de AIB que foi utilizada para induzir rizogénese (Fig. C33), embora se registre um decréscimo à medida que a concentração de AIB aumenta. Este facto sugere uma leve relação inversa entre o enraiza-

mento e o abrolhamento, bem como com o alongamento do novo gomo. De facto registou-se 100% de eficácia na desenvolvimento do gomo, com um alongamento máximo de 14.5 mm ao fim de 3 semanas após a colocação da gota de agar com BAP, no tratamento em que se havia utilizado uma concentração de 1.5 mg l^{-1} de AIB e, com a qual, apenas se obteve 5.9 % de enraizamentos.

III. FASE DE TRANSPLANTE E ACLIMATAÇÃO

A transferência de rebentos enraizados para as condições de aclimação, deu-se após 30 dias do início do tratamento de indução rizogénica. Apesar de alongamento radicular nesta data não ser ainda muito acentuado, registaram-se algumas dificuldades no sentido de colocar os rebentos no substrato sem provocar danos nas raízes, já que elas se quebram com enorme facilidade, pelo que será aconselhável fazer o transplante dos rebentos pouco depois da emergência dos primórdios radiculares. Dos 70% de plantas sobreviventes após 30 dias do início da aclimação, cerca de 17% dessas plantas não apresentavam evidências de crescimento, embora ainda se apresentassem com aspecto verde. Da sua observação, verificámos que não havia sido formada nenhuma nova raiz durante esse período, e que as já existentes se apresentavam com um aspecto muito rugoso e flácidas e, provavelmente, não funcionais. Outra causa de morte das plantas foi o apodrecimento do caule na zona junto à superfície do substrato, talvez devido ao aparecimento de fungos e algas, como consequências dos elevados valores de humidade e da pouca eficácia dos tratamentos preventivos.

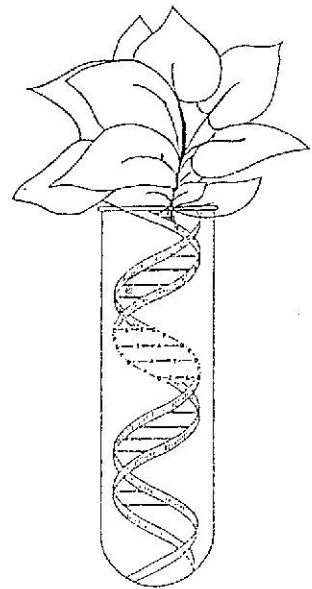
Após 60 dias, registou-se uma percentagem de sobrevivência na ordem dos 52%, parecendo o aspecto morfológico das plantas como normal (Fig. C34).



Fig. C34 - Planta de castanheiro regenerada *in vitro* após 60 dias de aclimação

DISCUSSÃO

D



I. FASE DE MULTIPLICAÇÃO

O trabalho publicado em 1983 por Vieitez e colaboradores, demonstrou a possibilidade de estabelecer e multiplicar *in vitro* material adulto de castanheiro, abrindo assim caminho a novas vias de investigação que permitissem não só confirmar como também desenvolver as metodologias então propostas.

Os estudos agora apresentados, pretendem contribuir para a compreensão do comportamento do castanheiro quando submetido a sistemas de propagação *in vitro* por rebentamento axilar, no que diz respeito à variabilidade que se regista em diferentes parâmetros quantificadores da sua capacidade regenerativa, tais como o número de rebentos formados maiores que 5 mm, o seu alongamento e o número de segmentos por explant, determinantes para avaliar o sucesso do efeito dos factores considerados como capazes de influenciar a fase de multiplicação e que são o genótipo, o meio de cultura e a concentração de citocininas (Vieitez e Vieitez, 1982; Biondi *et al.*, 1981; Vieitez *et al.*, 1983, 1986).

Para tal estudo utilizámos três clones de castanheiro, designados por 431, M2 e QR2, híbridos de *C. sativa* x *C. crenata*, três meios de cultura, de Greshoff e Doy (1972) (GD), Woody Plant Medium (WPM) (McCown e Lloyd, 1981) e de Heller (1953) (Hm) modificado por Vieitez *et al.*, (1983) e seis concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), a citocinina considerada mais eficaz na promoção de rebentamento axilar no castanheiro (Vieitez e Vieitez, 1982; Vieitez *et al.*, 1983), tentando assim avaliar de uma forma bastante lata o efeito destes factores em cada um dos parâmetros quantificadores.

Embora referido em Material e Métodos, consideramos importante acentuar o facto de termos utilizado como material vegetal para iniciar as culturas, rebentos de amontoa de árvores seleccionadas, consideradas resistentes à doença da tinta e, como tal, com certas características consideradas juvenis, e isto porque a utilização de outro tipo de material vegetal, nomeadamente da copa, obriga à utilização prévia de métodos de rejuvenescimen-

to, sem os quais as respostas regenerativas são muito deficientes, se não impossíveis (Balles-ter *et al.*, 1989)

1. Efeitos da concentração de benzilaminopurina

Em relação a todos os factores ensaiados, a concentração de BAP mostrou ser o mais importante no condicionamento do tipo de resposta regenerativa ($P > 0.0001$ para qualquer dos parâmetros), sendo considerada indispensável e determinante, quer para a capacidade de proliferação e alongamento, quer para o número de segmentos possíveis de obter. O efeito desta substância na micropropagação de espécies vegetais está bem demonstrado na profusão de trabalhos publicados, sendo a sua acção na regulação do crescimento e formação de órgãos o efeito mais divulgado e estudado (Skoog e Miller, 1957; Zaerr e Mapes, 1982).

A exposição de tecidos vegetais a este regulador de crescimento deverá iniciar uma sequência programada de acontecimentos a nível celular, provavelmente por activação da síntese de RNA, proteínas e acréscimo da actividade enzimática, que as leva a obter um padrão altamente controlado de divisões celulares que irão originar futuros complexos meristemáticos. No entanto, a compreensão das bases bioquímicas da acção deste regulador de crescimento, mesmo em modelos de sistemas experimentais, é ainda muito incompleto (Minocha, 1987).

Em relação aos resultados obtidos verificámos que, embora dependente do genótipo e tipo de meio utilizado, as concentrações mais baixas de BAP, da ordem das 0.1 e 0.2 mg l⁻¹, se mostraram as mais favoráveis na formação e desenvolvimento de rebentos maiores que 5 mm. Em relação ao alongamento, a concentração de 0.05 mg l⁻¹ de BAP mostrou ser a mais favorável, permitindo a formação de rebentos com média superior a 4 cm (Fig. C20), atingindo valores individuais de 8 a 10 cm. Tal facto pode explicar-se pela existência de um menor número de rebentos formados e como tal a possibilidade de um desenvolvimento mais acentuado de um deles, já que a concentração de BAP, insuficiente para promover melhor proliferação, permitia o alongamento, sendo a própria distribuição dos nutrientes muito menos repartida. No entanto, a este alongamento não correspondeu um aumento no número de segmentos já que estes rebentos possuíam entrenós muito alongados e, como tal, poucos gomos axilares (Fig. C23). O número de segmentos mostrou-se mais directamente relacionado com a maior capacidade de proliferação, pois que ele apresenta máximos coincidentes com os máximos de proliferação, com excepção do clone QR2, em que o máximo de segmentos foi obtido nas concentrações mais baixas de BAP, a que correspondeu o maior alongamento. De facto, este clone mostrou-se muito sensível à concentração de BAP, e as próprias

concentrações de 0.1 e 0.2 mg l⁻¹ não permitiram um alongamento susceptível de se conseguir elevado número de segmentos.

Em relação ao clone M2, verificou-se também que as concentrações mais baixas de BAP não foram as que permitiram melhor alongamento (Fig. C14), sendo este obtido na concentração de 0.2 mg l⁻¹. Tal tipo de resposta pode ser considerada genótipo dependente, pois há evidências que mostram que não é só a concentração do regulador de crescimento o único responsável pelas diferenças quantitativas nas respostas esperadas, mas também a sensibilidade das células para esse regulador de crescimento (Trewavas, 1981, 1982), sendo essa sensibilidade definida em termos de número de receptores presentes e determinada genotipicamente. Para além deste facto, também a interacção entre o regulador de crescimento endógeno e as concentrações exógenas de reguladores análogos que se adicionam ao meio de cultura podem influenciar o tipo de resposta. Este clone mostrou-se ainda muito específico em relação às combinações dos factores utilizadas e, embora em relação ao número de rebentos maiores que 5 mm não haja diferenças significativas entre as combinações GD + 0.1 mg l⁻¹ e Hm + 0.1 e 0.2 mg l⁻¹ de BAP (Anexo I-Tab. C8) já o comprimento do maior rebento e o número de segmentos são fortemente beneficiados pela combinação GD + 0.2 mg l⁻¹ de BAP (Anexo I-Tab. C16 e C24).

As concentrações mais elevadas de BAP mostraram-se, para todos os clones e meios, como fortemente inibidoras do alongamento e, como tal, o número de rebentos maiores que 5 mm contabilizados foi também drasticamente reduzido, apresentando as culturas um aspecto de cacho com diferenciação de ápices mas sem alongamento (Fig. C9 e C18). Tal efeito confirma os resultados referidos por Vieitez *et al.* (1983), pelo que estas concentrações apenas poderão ser úteis se forem utilizados posteriores sistemas de alongamento dos rebentos, o que torna o processo de propagação *in vitro* mais oneroso, para além destas concentrações aumentarem a probabilidade de variabilidade genética pela possibilidade de promoverem a formação de rebentos adventícios directamente do *callus* que se forma na base do explant e que nestas concentrações se desenvolve muito mais.

Os valores obtidos nestes parâmetros como resposta à acção da benzilaminopurina, podem ser considerados como dentro dos valores já referidos noutros trabalhos (Gonçalves, 1990), apesar de na maioria deles, se fazer referência á totalidade de rebentos formados e não apenas aos maiores que 5 mm. Assim, Vieitez *et al.*, (1983) apresentam um máximo de 4.3 rebentos com o comprimento do maior de 21.1 mm na concentração de 0.1 e 0.2 mg l⁻¹ de BAP. Em relação aos trabalhos de Biondi *et al.* (1981) e Mullins (1987), apenas referem que estas concentrações de BAP são as que deram melhores resultados, embora não tenham quantificado. Em *C. molissima* e com material juvenil, Qi-Guang *et al.* (1986) apresentam igualmente um valor para a taxa de multiplicação de 4.3 rebentos e com comprimentos da

ordem dos 35 mm.

Em outras fagáceas, por exemplo *Q. robur*, os melhores resultados foram obtidos com doses de 0.1 e 0.2 mg l⁻¹ de BAP (San-José *et al.*, 1985; Favre e Juncker, 1987) assim como as doses mais elevadas (1 e 2 mg l⁻¹) tiveram efeito fortemente negativo sobre o alongamento e desenvolvimento dos gomos axilares. Já em *Q. rubra*, San-José *et al.* (1985), referem que a concentração de 0.5 mg l⁻¹ de BAP se mostrou como a mais eficaz em conjunto com a adição de uma auxina. Também em *Q. suber*, Manzanera e Pardos (1990), consideram importante a combinação entre uma citocinina e uma auxina para a taxa de multiplicação, mas já para o alongamento referem que a concentração de BAP é o único factor que influencia este parâmetro. A necessidade da presença de uma auxina nesta fase de multiplicação de espécies lenhosas é muito variável de acordo com as espécies (Davies e Keathley, 1987), sendo sugerido que para o caso do castanheiro ela é dispensável (Vieitez *et al.*, 1983; Chevre, 1985).

Em relação ao número de segmentos, ele é também fortemente dependente da concentração de BAP ($P > 0.0001$), o que aliás seria de prever, já que este valor está directamente relacionado não só com a capacidade de proliferação dos explants, como também com o seu alongamento e, como já foi referido, estes parâmetros são também fortemente dependentes dos níveis de BAP utilizados. Nos trabalhos já citados, sobre micropropagação de castanheiro, não é feita referência a este parâmetro, embora o seja em outras espécies (San-José *et al.*, 1988, 1990) sendo considerado um parametro muito esclarecedor sobre a verdadeira capacidade de multiplicação de uma cultura por rebentamento axilar durante as fases de subcultivos sucessivos. Os valores obtidos para os clones 431 e M2 na melhor combinação, 8.59 em Hm + 0.1 mg l⁻¹ de BAP e 8.44 em GD + 0.2 mg l⁻¹ de BAP respectivamente, indicam que estas concentrações são, sem dúvida, as mais indicadas para a fase de multiplicação de cada um destes clones. Também para o clone QR2 as concentrações de BAP mais reduzidas se mostraram mais favoráveis, embora os valores absolutos para qualquer dos parâmetros quantificados tenham ficado muito longe dos obtidos para os outros dois clones, o que talvez signifique a possibilidade de inadequação das formulações nutritivas utilizadas, já que não nos parece credível que as necessidades em BAP se situem fora da gama de concentrações utilizada.

2. Influência do clone

O factor clone foi, para qualquer dos parâmetros quantificados, o segundo principal responsável pela variabilidade que se registou nas respostas regenerativas, embora influenciando também fortemente essas mesmas respostas ($P > 0.0001$). A influência do genótipo

havia já sido referida por vários autores, quer para este género quer para outros (Vieitez *et al.*, 1983; Biondi *et al.*, 1986; Davies e Keathley, 1987; Rutledge e Douglas, 1988; Juncker e Favre, 1989; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1990), confirmando-se assim como mais uma dificuldade no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de espécies lenhosas. Dos três genótipos utilizados, verificou-se que o clone 431 foi o que se comportou como mais tolerante para uma maior gama de combinações de meios e concentrações de BAP apresentando valores de resposta muito positivos. O clone M2 mostrou-se muito mais sensível a combinações particulares daqueles factores, nomeadamente no alongamento e número de segmentos (Fig. C20 e C28). Em relação ao clone QR2 trata-se de um clone que, como se referiu, se comportou como recalcitrante para as combinações dos factores utilizados e, como tal, com respostas regenerativas tanto quantitativas como qualitativas, muito aquém do aceitável nesta fase da propagação *in vitro*.

As diferenças referidas entre os clones 431 e M2 podem também ser explicadas com base no número de subcultivos a que as culturas haviam sido sujeitas até serem estabelecidos os ensaios, pois que como é referido por vários autores (Boulay, 1978; Francllet *et al.*, 1980; Gupta *et al.*, 1981; Fouret *et al.*, 1984; Francllet *et al.*, 1987), os subcultivos sucessivos a que se sujeita uma cultura podem provocar um certo carácter de rejuvenescimento e, como tal, facilitar a adaptação e proliferação nas condições *in vitro*.

3. Efeitos das formulações nutritivas

As formulações nutritivas utilizadas mostraram ser o factor responsável por provocar menor variabilidade quantitativa nas respostas regenerativas. O mesmo já não aconteceu com os aspectos morfológicos associados às culturas. De facto, a análise dos resultados facilmente demonstrou que a substituição da solução nutritiva, poucas alterações globais provocava.

Das três formulações utilizadas, a que permitiu, de um modo geral, piores resultados quer quantitativos quer qualitativos (cf. Resultados) foi a do meio WPM. Este meio de cultura, desenvolvido especificamente por Lloyd e McCown (1981) para espécies lenhosas, não se mostrou muito favorável à multiplicação destes clones de castanheiro. Idêntico resultado foi referido por San-José *et al.* (1985, 1988) em *Q. robur* e *Q. rubra*. Tal facto poderá ficar a dever-se à presença de nitrato de amónio que, tal como na formulação de Murashige e Skoog (1962), parece causar um efeito negativo nas culturas de castanheiro, originando culturas de aspecto suculento, com folhas verde escuro e dobradas, de crescimento muito mais lento e com alterações morfológicas, incluindo vitrificação (Vieitez *et al.*, 1983). No entanto, conside-

ra-se que o ião amónio é indispensável para o bom desenvolvimento das culturas, pois que ensaios sem NH_4^+ produziram os piores resultados no tabalho de Vieitez *et al.* (1983). Esta necessidade de iões amónio é, de resto, inquestionável, já que parece difícil a subsistência de tecidos vegetais *in vitro* exclusivamente à base de nitrato como única fonte de azoto, e isto porque as culturas são tipicamente heterotróficas e a redução de nitrato é um processo altamente endergónico exigindo uma actividade elevada da via dos fosfatos de pentose para a produção de coenzimas reduzidos (Steward e Rhodes, 1977). Além disso, a absorção de iões nitrato provoca um acentuado incremento do pH do meio (Bayley *et al.*, 1972), com todas as consequências que daí advêm para as culturas.

Assim, parece, que não só a concentração, como a forma em que são administrados os compostos que fornecem azoto inorgânico, são determinantes no tipo de resposta fisiológica. A apoiar este facto estão os resultados obtidos com os meios GD e Hm, em que não só a concentração do azoto total é bastante inferior à do meio WPM, 12.9, 10.8 e 14.7 mM respectivamente (Anexo I-Tab. D1), como também é administrado sob a forma de sulfato de amónio em vez de nitrato de amónio como acontece no meio WPM. A razão $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ é normalmente utilizada como indicadora da relação que deve existir entre as concentrações destes dois iões e, para o caso do castanheiro parece assim aconselhável utilizar formulações em que esta razão seja baixa, da ordem dos 0.2 a 0.3 (Anexo I-Tab. D1), como acontece com os meios GD e Hm, ao contrário do meio WPM em que essa razão é de 0.5.

A importância determinante que assume a assimilação de azoto inorgânico e a compreensão do seu papel na diferenciação das células vegetais, é um assunto chave na compreensão do crescimento e desenvolvimento das culturas (Hageman, 1979; Kirby *et al.*, 1987). De facto trata-se de um elemento indispensável, mas que em concentrações elevadas pode ser tóxico e, como tal, não pode ser acumulado no citoplasma.

Em *Quercus suber* os resultados apontam também para estas conclusões (Manzanera e Pardos, 1990). Os meios em que foram obtidos os melhores resultados foram os de Heller (1953) com igual modificação à utilizada nos presentes ensaios e a de Sommer *et al.* (1975), este com uma formulação e razões iónicas muito semelhantes às do meio GD, tendo-se registado forte efeito negativo em formulações em que as razões $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ são elevadas, ou se fornece nitrato de amónio. Idênticos resultados são apontados por Seckinger *et al.* (1979) em *Q. rubra* e Vieitez *et al.* (1985) igualmente em *Q. robur*, o que parece confirmar a necessidade de utilização de razões baixas destes dois iões e a utilização vantajosa do sulfato de amónio em substituição do nitrato de amónio, na fase de multiplicação de fagáceas.

Outra grande diferença entre estes meios reside na razão $\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$ (4.2, 13.9 e 20.8 mM respectivamente para o meio WPM, GD e Hm) parecendo indicar que a utilização de valores elevados nesta relação permite um melhor desenvolvimento das culturas, ou que estas não

são afectadas pelo excesso de iões K^+ em relação aos iões Ca^{++} .

Em termos de concentração iónica total, esta parece não ter influência directa na capacidade de resposta das células vegetais destes genótipos, já que se comportaram como tolerantes quer para os potenciais baixos (39.2 e 41.6 mM para GD e WPM respectivamente) quer para potenciais mais elevados (52.2 mM para Hm).

Em relação às formulações de micronutrientes e vitaminas utilizadas, torna-se extraordinariamente difícil discutir as suas implicações no metabolismo vegetal e, como tal, nas respostas morfo genéticas daí resultantes, principalmente quando os ensaios não são especificamente orientados para esse fim, como aconteceu neste trabalho, pelo que evitamos quaisquer considerações sobre os seus efeitos no desenvolvimento das culturas.

II. FASE DE ENRAIZAMENTO

A fase de enraizamento continua a revelar-se como sendo uma fase relativamente difícil na micropropagação de castanheiro. Não tanto pela capacidade dos tratamentos utilizados desencadear o processo rizogénico, embora esta sub-fase mereça investigações complementares, mas pelo facto de surgirem outras dificuldades nesta fase, como sejam a manutenção de um bom estado fisiológico da planta, a fim de permitir obter sucesso na fase de transplante e aclimação.

De facto, a necrose do gomo apical, uma das desordens fisiológicas mais marcantes, não só neste mas também como em outros géneros, surge em percentagens muito elevadas (Biondi *et al.*, 1984; Chevre, 1985; Mullin, 1987; Sha *et al.*, 1985), o que condiciona fortemente o bom estado fisiológico. Não estando no âmbito dos ensaios delineados o estudo desta anomalia, utilizámos no entanto uma metodologia proposta por Vieitez (comunicação pessoal) mais tarde publicada (Vieitez *et al.*, 1989) (cf. Material e Métodos), que consistiu em decapitar o ápice no dia zero, isto é, quando do início da indução rizogénica e aplicação de uma gota de BAP (30mg l^{-1}) agarizada no gomo axilar. Da análise dos resultados obtidos com esta metodologia, os valores das percentagens de abrolhamento parecem não ser muito influenciados pelo teor de AIB utilizado previamente no tratamento rizogénico embora, tal como se referiu, se tenha verificado um decréscimo nesta percentagem à medida que a concentração de AIB aumentou, o que parece confirmar mais uma vez os efeitos antagónicos entre auxinas e citocininas no desenvolvimento fisiológico de rebentos de castanheiro. Os valores obtidos são muito idênticos aos citados por Vieitez *et al.* (1989) que obtiveram para este mesmo clone, 82% de enraizamento e 79% de abrolhamento, não sendo referidas as dimensões atingidas por estes gomos. A uma menor percentagem de enraizamento, correspondeu um

maior alongamento no gomo que se desenvolveu (Tab. C4), o que poderá pressupor um certo antagonismo entre o desenvolvimento radicular e o desenvolvimento do novo rebento. De qualquer forma parece-nos que esta metodologia não é impeditiva de um desenvolvimento radicular eficaz, tal como é referido por Vieitez *et al.* (1989). O mesmo já não se poderá dizer da sua execução em termos práticos, tendo em vista a sua possível utilização sob o ponto de vista da propagação em escala comercial, pois que a aplicação da gota de BAP agarizada é algo de moroso e de relativa dificuldade de execução.

Em relação ao processo de rizogénese propriamente dito, este pode ser visto como um processo que se desenvolve em duas fases: indução e alongamento. Na primeira considera-se necessária a presença de uma auxina para desencadear o processo de rizogénese; para o alongamento dos primórdios formados, considera-se como sendo desnecessária a auxina exógena, sendo nalguns casos inibidora (Mohammed e Erikson, 1974; Mitsunashi-Kato, 1978).

Nos ensaios efectuados a aplicação de AIB foi feita segundo duas metodologias (cf. Material e Métodos): adicionado ao meio de cultura e, através do contacto do rebento com uma solução de AIB concentrada. Analisando os resultados obtidos, verificamos comportamentos diferentes consoante as metodologias utilizadas. Com AIB no meio de cultura, a capacidade de enraizamento é fortemente influenciada pela sua concentração, independentemente do meio de cultura utilizado, tendo o valor máximo, 82.4% para os dois meios, sido registado com a concentração de AIB mais elevada, 5 mg l⁻¹, o mesmo já não acontecendo em relação a outros parâmetros como o número de raízes, o comprimento da maior raiz e o comprimento médio de todas as raízes formadas por rebento, onde se regista já uma influência do meio de cultura. Com a utilização do meio 1/2GD registam-se diferenças significativas por efeito da concentração de AIB, resultado que já não se verificou com a utilização do meio MSm (Tab. C2). Parece assim que este regulador de crescimento é determinante na formação de zonas meristemáticas radiculares e, como tal, condiciona o número de primórdios possíveis de se diferenciarem, competindo depois às formulações nutritivas promoverem, ou não, o conseqüente desenvolvimento de todos os primórdios diferenciados bem como as características subsequentes desses mesmos primórdios. Apesar de terem sido já executados estudos anatómicos sobre o processo de rizogénese desencadeado por aplicação de auxina exógena (Vieitez e Vieitez, 1983), pensamos que seria útil delinear esses estudos em função de diferentes concentrações de AIB.

Em relação à utilização da imersão basal do rebento numa solução concentrada de AIB durante períodos de tempo variáveis, como forma de induzir o desenvolvimento radicular, verificámos que, para os clones utilizados e para a concentração de 1 g l⁻¹, o efeito do tempo de exposição não provocou diferenças significativas nos parâmetros quantificados, sendo

muito semelhantes entre os dois clones. No entanto, a percentagem de enraizamento mostrou um comportamento distinto já que para o clone 431 se obteve 74%, após 30 s de exposição e para o clone M2 apenas 50% após 60 s. A percentagem de enraizamento e o comprimento da maior raiz obtidas para o clone 431 são muito semelhantes às referidas por Vieitez *et al.* (1983), enquanto o número de raízes é bastante inferior, 4.8 contra 2.16. Nesta metodologia foram utilizados dois clones e, se tivermos como base a análise dos resultados obtidos no total da amostra, verificamos diferenças significativas no seu comportamento. No entanto, considerando exclusivamente os rebentos enraizados, essas diferenças desaparecem, permanecendo apenas a percentagem de enraizamento como única diferença.

Em relação às formulações nutritivas utilizadas, parece-nos que a formulação 1/2GD se mostrou mais adaptada às necessidades do desenvolvimento do sistema radicular. No entanto ambas as formulações possuem um baixo teor em sais, característica vantajosa na fase de enraizamento de lenhosas (Quoirin *et al.*, 1977; Constantine, 1978; Vieitez e Vieitez, 1982; Vieitez *et al.*, 1983; Skirvin *et al.*, 1980a; Manzanera e Pardos, 1990), sendo também importantes as razões e a forma dos compostos azotados que são disponibilizados para os rebentos. Assim, verificamos que o meio 1/2GD tem uma razão $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, sensivelmente metade em relação á formulação MSm, 0.29 contra 0.52 respectivamente (Anexo I-Tab.D1). Também na formulação de MSm o azoto é fornecido na forma de nitrato de amónio enquanto em 1/2GD é adicionado na forma de sulfato de amónio. A influência da concentração e razões dos compostos de azoto inorgânico nos meios de enraizamento parece, por si só, ser susceptível de modificar o padrão de desenvolvimento radicular (Sriskandarajah *et al.*, 1990).

Relativamente aos efeitos das formulações nutritivas, estas fizeram-se sentir mais ao nível da morfologia do sistema radicular isto é, número e alongamento das raízes, do que ao nível das percentagens de enraizamento, as quais, como atrás foi referido, estarão muito mais dependentes da influência da auxina exógena utilizada.

Outro ião importante no processo de rizogénese é o ião cálcio, já que desempenha um importante papel na prevenção da diminuição de compostos que actuam como protectores auxínicos durante o processo rizogénico (Stonier, 1971), embora tenha sido já demonstrado nalgumas espécies, que o incremento na sua concentração não tem efeito estimulador da rizogénese (Németh, 1978).

Parece assim evidente a necessidade de continuar a desenvolver estudos relacionados com os efeitos parciais de alguns nutrientes, em particular os fornecedores de azoto e de cálcio, na tentativa de melhorar não só a quantidade como também a qualidade do enraizamento e, em simultâneo, procurar respostas para corrigir desequilíbrios fisiológicos que são frequentes nesta fase, em particular a necrose apical, onde actuam factores como citocininas, auxinas e cálcio entre outros (Vieitez *et al.*, 1989; Singha *et al.*, 1990). O estudo integrado

justifica-se, tanto mais que se tem verificado que a presença de um sistema radicular vigoroso parece impedir o evoluir da necrose apical.

Resultados algo promissores, quer em relação a percentagens de enraizamento, quer em relação à solução do problema da necrose apical, foram apresentados por Miranda *et al.* (1990) que, a confirmarem-se, poderão dar um importante contributo para a solução de alguns problemas que se deparam nesta fase, apesar de os autores não terem conseguido evitar o apodrecimento frequente ao nível do colo do rebento durante a fase de aclimação.

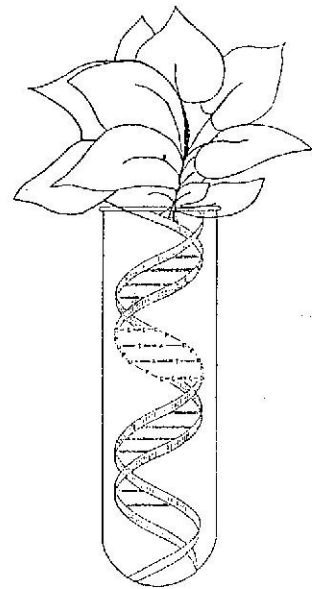
III. FASE DE ACLIMATAÇÃO

As dificuldades levantadas pela necrose apical durante o processo de rizogénese, embora parcialmente solucionadas com a aplicação de uma gota de BAP agarizada, parecem continuar a condicionar o bom estado fisiológico da planta a fim de que possa resistir a esta fase determinante para o sucesso de qualquer metodologia de micropropagação. A percentagem de sobreviventes obtida, 53,7, continua ainda muito longe do desejável e, se outros ensaios, com diferentes substratos e condições ambientais, deverão ser desenvolvidos, parece-nos que particular atenção deve continuar a ser dada às metodologias de enraizamento, nomeadamente o enraizamento *in vivo*, pois que, como já foi anteriormente referido, esta fase condiciona fortemente a capacidade da planta resistir à aclimação.

Em relação ao facto de se ter verificado a ocorrência de plantas que após 30 dias de transplante, se apresentavam com uma coloração verde, embora sem crescimento aparente, poderá atribuir-se à não funcionalidade do sistema radicular. A sua incapacidade de absorver nutrientes indispensáveis ao metabolismo celular, leva a que a planta subsista, provavelmente, à custa de escassas reservas endógenas. A não funcionalidade do sistema radicular formado *in vitro* tem sido referida frequentemente como uma importante causa de não sobrevivência dos rebentos durante a aclimação (McClelland *et al.*, 1990).

Com a utilização do transplante directo dos rebentos para o substrato de aclimação, logo após a indução do sistema radicular, ou ainda com a utilização dos recentes sistemas de suporte sintéticos para desenvolvimento do sistema radicular e aclimação dos rebentos, do tipo "rock wool plugs", espera-se vir a conseguir obter melhores taxas de sobrevivência.

CONCLUSÕES



E

Com base na discussão que foi apresentada, podemos agora colocar em destaque alguns dos aspectos referidos e que podem constituir a síntese global da actividade experimental desenvolvida. Assim:

- i) a concentração de BAP é determinante no condicionamento do tipo de resposta regenerativa e mostrou ser o factor mais importante na indução de variabilidade.
 - ◇ embora dependente do genótipo e do meio de cultura, no que diz respeito aos valores absolutos obtidos, as concentrações de 0.1 e 0.2 mg l⁻¹ de BAP mostraram ser as mais favoráveis na capacidade de formação e desenvolvimento dos rebentos;
 - ◇ a concentração de 0.05 mg l⁻¹ embora permitindo, nalguns casos, os máximos de alongamento, provoca a formação de rebentos com entrenós muito longos, o que implica um decréscimo no número de segmentos possíveis de obter e, como tal, menor número de explants secundários de multiplicação;
 - ◇ as concentrações mais elevadas mostraram ser fortemente inibidoras do alongamento dos rebentos, embora permitam, de um modo geral, um maior número de gomos diferenciados menores que 5 mm, o que apenas poderá ter utilidade com aplicação de uma fase posterior de alongamento, não devendo no entanto esquecer que a utilização continuada destas concentrações pode proporcionar uma alteração na estabilidade genética do material vegetal.
- ii) confirmaram-se as diferenças nas respostas regenerativas de acordo com os genótipos utilizados.

- ✧ Para dois dos três clones utilizados, 431 e M2, os melhores valores obtidos nos parâmetros quantificadores podem ser considerados como susceptíveis de permitirem estabelecer rotinas de propagação *in vitro*. Já para o clone QR2 tal não aconteceu;
 - ✧ nestas situações e, apesar de se ter registado uma melhoria na capacidade de resposta desde o seu estabelecimento até terem sido iniciados os ensaios, provavelmente pelo certo carácter rejuvenescedor da benzilaminopurina, será necessário proceder a manipulações das condições de cultura.
- iii) as formulações nutritivas, embora tendo sido de todos os factores estudados o que provocou menor variabilidade, parece-nos de grande importância na influência que exerce no desenvolvimento dos rebentos.
- ✧ a natureza das substâncias e a relação entre os iões fornecedores de azoto inorgânico exerce papel determinante, tendo a presença de nitrato de amónio causado um efeito negativo no processo de regeneração, quer quantitativo quer qualitativo, sendo aconselhável a utilização de sulfato de amónio em baixas concentrações (2 a 3 mM) com uma razão $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ também relativamente baixa (0.2 a 0.3), características estas apresentadas pelos meios GD e Hm;
 - ✧ razões elevadas entre os iões potássio e iões cálcio parecem ser benéficas para o desenvolvimento das culturas, ou que estas não são afectadas pelo excesso de iões K^+ em relação aos iões Ca^{++} ;
 - ✧ a concentração iónica total, face às concentrações dos meios utilizados, parece não influenciar a capacidade de resposta destes genótipos, parecendo antes fundamental o tipo de nutriente utilizado e as razões entre eles.
- iv) na formação do sistema radicular adventício é determinante a presença de uma auxina
- ✧ a utilização de AIB na concentração de 5 mg l^{-1} permitiu o máximo de enraizamento, com uma percentagem considerada elevada, 82%, independentemente da formulação nutritiva;
 - ✧ a composição do meio de cultura parece-nos ter papel importante no desenvolvimento posterior da morfologia do sistema radicular, tendo este apresentado melhores características em 1/2GD;

- ◇ o enraizamento por imersão basal do rebento numa solução concentrada de AIB, provoca diferenças significativas na capacidade rizogénica dos dois clones, de acordo com o tempo de imersão utilizado, embora sem variação no que diz respeito às características do sistema radicular formado;
 - ◇ a imersão basal, apesar de ter proporcionado percentagens de enraizamento inferiores às obtidas com AIB no meio de cultura, apresenta-se como mais vantajosa pois permite a supressão de um passo de manipulação.
- v) os valores de sobrevivência obtidos na fase de aclimação das plantas, estão ainda muito aquém do necessário.
- ◇ nesta fase de aclimação, parece-nos determinante a influência que exerce a fase de enraizamento na manutenção de um bom estado fisiológico dos rebentos, condicionando assim a capacidade de resistência a todas as alterações ambientais e de sistemas de nutrição a que as plantas ficam sujeitas;

Em termos futuros parece-nos haver necessidade de continuar a desenvolver trabalhos que levem à optimização das metodologias utilizadas, nomeadamente:

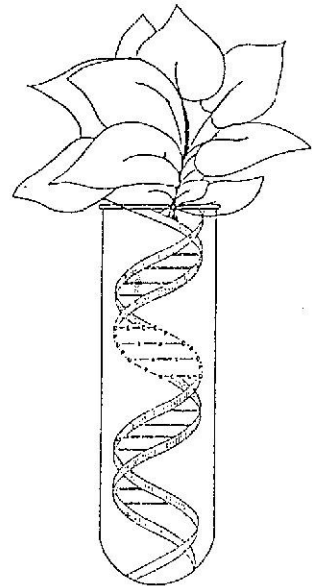
- i) necessidade de procurar métodos de rejuvenescimento alternativos à utilização de rebentos de amontôa, como fonte inicial de explants a estabelecer *in vitro*;
- ii) pré-tratamentos que induzam rejuvenescimento em clones que se mostrem recalcitrantes nas respostas *in vitro*, se as características fenotípicas assim o justificarem;
- iii) análise do rendimento da fase de multiplicação com utilização de baixas concentrações de benzilaminopurina, comparativamente á utilização de altas concentrações e posterior fase de alongamento;
- iv) a nível do enraizamento, estudo de balanços nutritivos que possibilitem não só uma boa morfologia radicular, mas também um estado fisiológico dos rebentos que lhes permita resistir à ausência de citocinina e posterior aclimação;

- v) optimização da concentração de AIB e tempo de exposição que permita, através da imersão basal do rebento, a utilização da metodologia de enraizamento *in vivo*, que é, sem dúvida, a mais promissora sob o ponto de vista da utilização da propagação *in vitro* em sistemas comerciais;
- vi) progressiva adaptação das fases de micropropagação a uma execução mecanizada, fundamentalmente a de enraizamento/aclimatação.

O desenvolvimento e optimização destas linhas de investigação, poderão assim contribuir para a resolução de problemas que afectam a expansão da cultura do castanheiro, espécie nobre do nosso panorama agro-florestal; nomeadamente a multiplicação de genótipos eleitos pela qualidade do lenho, características de resistência a doenças e outras, em condições economicamente viáveis com todos os benefícios que daí irão advir, deixando estas técnicas de ser simplesmente atractivas e motivantes para os investigadores.

BIBLIOGRAFIA

F



- Ammirato, P.V. (1983). Embryogenesis. *In: Handbook of Plant Cell Culture* (Evans, D.A; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. eds.), Vol. 1, pp.82-123, Macmillan Pub. Company, New York.
- Ahuja, M.R. (1987). Somaclonal Variation. *In: Cell and Tissue Culture in Forestry* (Bonga, J.M.; Durzan, D.J. eds.), Vol. 1, pp.272-285, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Areses, M.L.; Vieitez, E. (1970). Monthly variations in the content of growth substances and inhibitors in cuttings leaf buds and leaves of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Ann. Edafol. Agrobio.*, 29:625-630.
- Bajaj, Y.P.S. (1983). *In Vitro* Production of Haploids. *In: Handbook of Plant Cell Culture* (Evans, D.A; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. eds.), Vol. 1, pp.228-287, Macmillan Pub. Company, New York.
- Ball, E.A. (1950). Differentiation in *callus* cultures of *Sequoia sempervirens*. *Growth*, 14:295-325.
- Ballester, A.; Sánchez, M.C.; Vieitez, A.M. (1989). Etiolation as a pretreatment for *in vitro* establishment and multiplication of mature chestnut. *Physiol. Plant.*, 77:395-400.
- Bayley, J.M.; King, J.; Gamborg, O.L. (1972). The ability of amino compounds and conditioned medium to alleviate the reduced nitrogen requirement of soybean cells grown in suspension cultures. *Planta*, 105:25-32.

- Bazzigher, G.; Lawrenze, K.P.; Ritter, F. (1982). Vermehrung und Aufzucht der Kastanie. Eidg. Anstalt Forstl. Versuchsw. Ber., 240:5-35. (Cit. Vieitez *et al.*, 1986).
- Bekkaoui, F.; Franclet, A.; Walker, N. (1984). Culture *in vitro* des meristèmes de Douglas âgé et juvenile. *Annales Afocel* (ed.), pp.45-73.
- Biondi, S.; Canciani, L.; De-Paoli, G.; Bagni, N. (1981). Shoot formation from bud cultures of mature chestnut. *In: Colloque International sur la Culture In Vitro des Essences Forestières*, AFOCEL, pp.181-186, Fontainebleau, France.
- Biondi, S.; Canciani, L.; De-Paoli, G.; Bagni, N. (1984). Studio della micropropagazione di cultivar da legno di *Castanea sativa* Mill.. *In: Propagazione in vitro: Ricerche su Alcune Specie Forestali* (Savoia, G. ed.), Azienda Regionale delle Foreste, Bologna, pp.108-114.
- Bolstad, P.V.; Libby, W.J. (1982). Comparison of radiata pine cuttings of hedge and tree-farm origin after growing seasons. *Silvae Genetica*, 31:9-13.
- Bonga, J.M. (1982). Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. *In: Tissue Culture in Forestry* (Bonga, J.M.; Durzan, D.J. eds.), pp.387-412, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- Bonga, J.M.; Durzan, D.J. (eds.) (1982). *Tissue Culture in Forestry*. 420pp. Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers, The Hague.
- Bonga, J.M.; Durzan, D.J. (eds.) (1987). *Cell and Tissue Culture in Forestry*, 3 Vol., 1285pp., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Borrod, G. (1971). Contribution à l'étude des cultures *in vitro* des tissus de châtaignier. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 272:56-58.
- Boulay, M. (1978). Multiplication rapide du *Sequoia sempervirens* en culture *in vitro*. *Annales Afocel* (ed.), pp.36-65.
- Bourgein, J.P.; Nitsch, J.P. (1967). Obtention de *Nicotiana* haploids a'partir d'elamines cultivees *in vitro*. *Ann. Physiol. Veg.*, 9(4):377-382.

- Bouriquet, R.; Tsogas, M.; Blaselle, A. (1984). Essais de rajeunissement de l'épicéa par les cytokinins. *Annales Afocel* (ed.), pp.173-185.
- Boxus, P.; Druart, P. (1986). Virus-Free Trees Through Tissue Culture. *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj, Y.P.S. ed.), Vol.1, pp.24-30, Springer-Verlag, Berlin.
- Burnham, C.R.; Rutter, P.A.; French, D.W. (1986). Breeding blight-resistant chestnuts. *Plant Breeding Reviews*, 4:347-397.
- (1988). The restoration of the american chestnut. *American Scientist*, 76:478-487.
- Caplin, S.M.; Steward, F.C. (1948). *Science*, 108:655-657. (Cit. Gautheret, 1982).
- Carlisle, A.; Teich, A.H. (1971). The costs and benefits of tree improvement programs. *Can. For. Serv.*, 1302.
- Chalupa, V. (1987). European Hardwoods. *In: Cell and Tissue Culture in Forestry* (Bonga, J.M.; Durzan, D.J. eds.), Vol. 1, pp.224-246, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Chevre, A.M.; Gill, S.S.; Mouras, A.; Salesses, G. (1983). *In vitro* vegetative multiplication of chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58:23-29.
- (1985). *Recherches sur la Multiplication Végétative In Vitro Chez le Châtaignier*. These Dctoral, Université de Bordeaux, II, 100pp.
- Constantine, D. (1978). *In vitro* multiplication of woody species. *Round⁶ Table Conf.*, Gembloux, Belgium. p.134.
- Crocorno, O.J.; Aquarone, E.; Gottlieb, O.R. (1981). Biosynthesis of Secondary Products *in Vitro*. *In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* (Thorpe, T.A. ed.), pp.359-372, Academic Press Inc., London.
- Davies. J.M.; Keathley, D.E. (1987). Differential responses to *in vitro* bud culture in mature *Robinia pseudoacacia* L. (black locust). *Plant Cell Reports*, 6:431-434.

- Debergh, P.C.; Maene, L. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hort.*, 14:335-345.
- Dermen, H.; Diller, J.D. (1962). Colchipoideity of chestnuts. *For. Sci.*, 8:43:50.
- Direcção Geral das Florestas (ed.) (1989). Distribuição da Floresta em Portugal Continental. **Estudos e Informação**, 229, 29pp.
- Dolcet-Sanjuan, R.; Mok, D.W.S.; Mok, M.C. (1990). Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21:191-199.
- Dulieu, H.; Barbier, M. (1982). High Frequency of Genetic Variant Plants Regenerated from Cotyledons of Tobacco. *In: Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture* (Earle, L.; Demarly, Y. eds.), pp.211-219, Praeger Press, New York.
- Evans, D.A; Sharp, W.R.; Flick, C.E. (1983). Growth and Behaviour of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis. *In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* (Thorpe, T.A. ed.), pp.45-113, Academic Press Inc., London.
- Favre, J.M.; Juncker, B. (1987). *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L.. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8:49-60.
- Fernandes, C.T. (1953). Ensaios experimentais tendo em vista o repovoamento pelo castanheiro de regiões muito afectadas pela doença da tinta. *Pub. Dir. Geral Serv. Flor. Aquíc.*, Vol XX, Tomo I.
- (1966). A doença da tinta dos castanheiros. *Direcção Ger. Ser. Flor. Aquí. Centro de Inv. Flor.*, pp.7-95, Alcobaça.
- (1972). Aspects de l'Amélioration du châtaignier pour la Résistance à la "Maladie de l'Encre". *In: Actas III Cong. Un. Fit. Med.*, pp.314-320, Oeiras.
- Finkle, B.; Ulrich, J. (1983). Protocols of Cryopreservation. *In: Handbook of Plant Cell Culture* (Evans, D.A; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. eds.), Vol. 1, pp.806-815, Macmillan Pub. Company, New York.

- Fouret, Y.; Arnaud, Y.; Larrien, C. (1984). Rajeunissement *in vitro* de *Sequoia sempervirens* - effect du nombre et de la fréquence des repiquages - recherches de critères procesés de juvénilité. *Annales Afocel* (Ed.), 111-137.
- Francllet, A.; David, A.; David, H.; Boulay, M. (1980). Première mise en évidence morphologique d'un rajeunissement de méristèmes primaires caulinaires de Pin maritime âgé (*Pinus pinaster* Sol.). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 290:927-930.
- (1981). Rajeunissement et propagation végétative de lignieux. *Annales Afocel* (Ed.), pp.12-39.
- ; Boulay, M.; Bekkaoui, F.; Fouret, Y.; Verschoore-Martouzet, B.; Walker, N. (1987). Rejuvenation. *In: Cell and Tissue Culture in Forestry* (Bonga, J.M.; Durzan, D.J. eds.), Vol. 1, pp.232-248, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. (1968). *Exp. Cell Res.*, 50:151-158.
- ; Shyluk, J.P.; Shahin, E.A. (1981). Isolation, Fusion and Culture of Plant Protoplasts. *In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* (Thorpe, T.A. ed.), pp.115-153, Academic Press Inc., London.
- Gautheret, R.J. (1934). Culture du tissue cambial. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 198:2195-2196.
- (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 208:118-119.
- (1940). Recherches sur le bourgeonnement du tissue cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 210:632-634.
- (1982). Plant Tissue Culture: The History. *In: Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*, pp.7-12, Tokyo.
- George, E.F.; Sherrington, P.D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture*, 710pp., Exegetics Ltd., England.

- Gingas, V.M.; Lineberger, R.D. (1989). Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17:191-203.
- Gomes, A.L. (1982). *Revisão Crítica Sobre a Cultura do Castanheiro em Portugal*. Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, pp.49-55.
- (1988). Programa para o melhoramento genético do castanheiro para produção. *Anais da UTAD*, 1:141-147.
- Gonçalves, J.C.D. (1990). Multiplicação *in vitro* de castanheiro (*Castanea Miller*) por rebentamento axilar. Resumo, II Congresso Florestal Nacional, p.74, Porto.
- Gonzalez, M.L.; Vieitez, A.M.; Vieitez, E. (1985). Somatic embryogenesis from chestnut cotyledon tissue cultured *in vitro*. *Sci. Hortic.*, 27:97-103.
- Greenwood, M.S. (1986). Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation*, 6:1-12.
- Grente, J. (1975a). La lutte biologique contre le chancre du châtaignier par "hypovirulence contagieuse". *Ann. Phytopatol.*, 7:216-218.
- (1975b). Deux maladies redoutables: l'encre et le chancre. *In: Châtaignes et Marrons*, pp.125-135, INFUVLEC, Paris.
- Greshoff, P.M.; Doy, C.H. (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*, 107:161-170.
- Guha, S.; Maheshwari, S.C. (1964). *Nature*, 204:497. (Cit. Gautheret, 1982).
- Gupta, P.K.; Mascarenhas, A.F.; Jagannathan, V. (1981). Tissue culture of forest tree: Clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook by tissue culture. *Plant Sc. Lett.*, 20:195-201.
- Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellsn. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.- Nat. Kl.*, 111:69-92. (Cit. Gautheret, 1982).
- Hackett, W.P. (1985). Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Hort. Reviews*, 7:109-155.

- Hageman, R.H. (1979). Integration of Nitrogen Assimilation in Relation to Yield. *In: Nitrogen Assimilation in Plants* (Hewitt, E.J.; Cutting, C.W. eds.), pp.591-611, Academic Press Inc., New York.
- Hammerschlag, F.A. (1982a). Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 107:44-47.
- Handro, W. (1981). Mutagenesis and *in Vitro* Selection. *In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* (Thorpe, T.A. ed.), pp.155-180, Academic Press Inc., London.
- Hartman, H.T.; Kester, D.E. (eds.) (1984). General Aspects of Asexual Propagation. *In: Plant Propagation, Principles and Practices*, 4th Ed., pp.199-234, Prentice-Hall International Inc., London.
- Heller, R. (1953). Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, 14:1-22.
- Horsch, R.B.; Fraley, R.T.; Odgers, S.; Saunders, P.R.; Lloyd, A.; Hoffman, D. (1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 223:496-498.
- IAPTC (1985). Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Organ Culture Terminology. *Newsletter*, 45:15-22.
- Ingram, D.S. (1977). Applications in Plant Pathology. *In: Plant Tissue and Cell Culture*. (Street, E. ed.), Vol. 2, pp.463-500, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Jacquot, C. (1947). Effet inhibiteur des tannins sur le développement des cultures *in vitro* du cambium des certains arbres forestiers. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 225:434-436.
- (1950). Sur la culture *in vitro* du tissu cambial du châtaignier (*Castanea vesca* Gaertn). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 231:1080-1081.
- (1956). Sur les besoins en auxine et les caractères morphologiques externes des cultures de tissu cambial de quelques espèces d'arbres. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 243:510-512.

- (1970). Nouvelles recherches sur l'action de quelques dérivés de l'adénine sur la croissance du tissu cambial d'essences forestières cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270:493-495.
- Jaynes, R.A. (1962). Chestnut chromosomes. *For. Sci.*, 8:372-377.
- (1963a). Male sterility in *Castanea*. In: *Proc. 11th Int. Cong. Genetics*, p.203 (abstr.), The Hague.
- (1964). Interspecific crosses in the genus *Castanea*. *Silvae Genet.*, 13:146-154.
- (1976). New developments in chestnut research. In: *Proc. of the 23th North-Eastern For. Tree Imp. Conf.*, pp.36-41.
- ; Messner, G.A. (1967). Four years of nut grafting chestnut. In: *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, pp.305-310.
- Juncker, B.; Favre, J.M. (1989). Clonal effects in propagation oak trees via *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19:267-276.
- Kartha, K.K. (1981). Meristem culture and cryopreservation: Methods and Applications. In: *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* (Thorpe, T.A. ed.), pp.181-211, Academic Press Inc., London.
- Keys, R.N.; Cech, F.C. (1981). Plantlet formation in American chestnut embryonic tissue *in vitro*. In: *Proc. of 2nd North and Central Trees Imp. Conf.*, pp.189-194.
- ; ----- (1982). Propagation of American chestnut *in vitro*. In: *Proc. of USDA For. Service Chestnut Research Cooperators Meeting*, pp.106-110, Morgantown.
- Kirby, E.G.; Leustek, T.; Lee, M.S. (1987). Nitrogen Nutrition. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry* (Bonga, J.M.; Durzan, D.J. eds.), Vol. 1, pp.67-88, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Klee, H.; Horsch, R.; Rogers, S. (1987). *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to biology. *Ann Rev. Plant Physiol.*, 38:467-486.

- Larkin, P.J.; Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60:197-214.
- Ledoux, L. (1965). *In: Progr. Nucl. Acid Res.*, 4:231-267, Acad. Press. (Cit. Gautheret, 1982).
- Levin, R.; Vasil, I.K. (1989). Progress in reducing the cost of micropropagation. *Newsletter*, 59:2-12.
- Levine, M. (1950). *Am. J. Bot.*, 37:445-458. (Cit. George e Sherrington, 1984).
- Lindsey, K.; Jones, M.G.K. (eds.) (1989). *Plant Biotechnology in Agriculture*, 241pp., Open University Press, Milton Keynes.
- Lyrene, P.M. (1981). Juvenility and production of fast-rooting cuttings from blueberry shoot cultures. *J. Amer. Hort. Soc.*, 106:396-398.
- Manzanera, J.A.; Pardos, J.A. (1990). Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L.. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21:1-8.
- McClelland, M.T.; Smith, M.A.L.; Carothers, Z.B. (1990). The effects of *in vitro* and *ex vitro* rooting initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23:115-123.
- McCown, B.H.; Lloyd, G. (1981). Woody Plant Medium (WPM). A mineral nutrient formula for microculture of woody plant species. *HortScience*, 16:453.
- McKay, J.W. (1942). Self-sterility in the Chinese chestnut (*Castanea molissima*). *In: Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 41:156-160.
- Miller, C.O.; Skoog, F.; Von-Saltza, M.H.; Strong, E.M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 77:1392.
- ; -----; Okumana, F.S.; -----; ----- (1955a). Structure and synthesis of kinetin. *J. Am. Chem. Soc.*, 77:2662-2663.

- Minocha, C. (1978). Plant Growth Regulators and Morphogenesis in Cell and Tissue Culture of Forest Trees. *In: Cell and Tissue Culture in Forestry* (Bonga, J.M.; Durzan, D.J. eds.), Vol. 1, pp.50-60, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Miranda, M.E.; Fernández, J.; Vega, G. (1990). Estudio de las condiciones para el enraizamiento en brotes de castaños híbridos obtenidos por cultivo *in vitro*. Resúmen, II Congreso Florestal Nacional, pp. 72-73, Porto.
- Misson, J.P.; Giot-Wirgot, P. (1984). Rajeunissement d'un clone de thuja en vue de sa multiplication *in vitro*. *Annales Afocel* (Ed.), pp.187-197.
- Mitsubishi-Kato, M.; Shibaoka, H.; Shimokoryama, M. (1978). The nature of the dual effect of auxin on root formation in *Azuki* cuttings. *Plant Cell Physiol.* 19:1535-1542.
- Mize, C.W.; Chun, Y.W. (1988). Analysing treatment means in plant tissue culture research. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 13:201-217.
- Mohammed, S.; Eriksen, E.N. (1974). Root formation in pea cuttings. IV. Further studies on the influence of indol-3-acetic acid at different developmental stages. *Physiol. Plant.* 32:94-96.
- Moore, J.C. (1963). Propagation of chestnut and camellia by nurse seed grafts. *In: Proc. Int. Plant Propag. Soc.*, pp.141-143.
- Morel, G.M. (1960). Producing virus-free cymbidiums. *Amer. Orch. Soc. Bul.*, 29:495-497.
- (1964). Tissue culture: A new means of clonal propagation of orchids. *Amer. Orch. Soc. Bul.*, 33:473-478.
- Mullins, K.V. (1987). Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Horticulturae*, 212:525-530.
- Mullins, M.G.; Nair, Y.; Simpet, P. (1979). Rejuvenation *in vitro*: induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L.. *Ann. Bot.*, 44:623-627.

- Murai, N.; Sutton, D.W.; Murray, M.G.; Slightour, J.L.; Merlo, D.J.; Reichert, N.A.; Sengupta-Goopalan, C.; Stock, C.A.; Barker, R.F.; Kemp, J.D.; Hall, T.C. (1983). Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science*, 222:476-482.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plantarum*, 15:473-497.
- (1974). Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Phys.*, 25:135-166.
- Néméth, G. (1986). Induction of Rooting. *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj, Y.P.S. ed.), Vol. 1, pp.49-64, Springer-Verlag, Heidelberg.
- (1978). *In vitro* multiplication of woody species. *Round Table Conf.*, Gembloux, Belgium, pp.135-137, 238-242.
- Nitsch, C. (1981). Production of Isogenic Lines: Basic Technical Aspects of Androgenesis. *In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* (Thorpe, T.A. ed.), pp.241-252, Academic Press Inc., London.
- Nobécourt, P. (1939). Sur la perennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C. R. Soc. Biol.*, 130:1270-1271.
- Ohyama, K. (1983). Genetic Transformation in Plants. *In: Handbook of Plant Cell Culture* (Evans, D.A; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. eds.), Vol. 1, pp.501-519, Macmillan Pub. Company, New York.
- Oono, K. (1981). *In vitro* methods applied to rice. *In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* (Thorpe, T.A. ed.), pp.273-298, Academic Press Inc., London.
- Park, K.S. (1967). New method of juvenile tissue grafting of some special use trees. I. Studies on the juvenile tissue grafting of some crop tree species (walnut, chestnut, ginkgo and oak). *Research Rep. Inst. For. Gen.*, 5:75-84.

- (1968). Studies on juvenile tissue grafting of some special use trees. II. An experiment on inverted radical grafting of crop tree species. *J. Bot.*, 11:8-17.
- (1969). Studies on juvenile tissue grafting and modified nurse nut grafting of chestnut. *Research Rep. Inst. For. Gen.*, 63-80.
- Pierik, R.L.M. (1987). *In Vitro Culture of Higher Plants*. 344pp., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Qi-Guang, Y.; Read, P.E.; Cynthia, D.F.; Hosier, M.A. (1986). Effect of cytokinin, IBA and rooting regime on chinese chestnut cultured *in vitro*. *HortScience*, 21:133-134.
- Quoirin, M.; Lepoivre, P.H.; Boxus, P. (1977). Un premier bilan de 10 années de recherches sur la culture de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. *C. R. Rech. 1976-1977. Stn. Cult. Fruit Maraichers*, pp.93-117, Gembloux.
- Reinert, J.; Bajaj, Y.P.S. (eds.) (1977). *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 803pp., Springer-Verlag, Berlin.
- Rhodes, L.H. (1983). Mycorrhizae. *In: Handbook of Plant Cell Culture* (Evans, D.A; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. eds.), Vol. 1, pp.924-940, Macmillan Pub. Company, New York.
- Rodriguez, R. (1982). *In vitro* propagation of *Castanea sativa* Mill. through meristem-tip culture. *HortScience*, 17(6):888-889.
- (1982a). Multiple shoot-bud formation and plantlet regeneration on *Castanea sativa* Mill. seeds in culture. *Plant Cell Reports*, 1:161-164.
- Rutledge, C.B.; Douglas, G.C. (1988). Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of poplar *in vitro*. *Physiol. Plantarum*, 72:367-373.
- Salkowski, E. (1885). *Z. Physiol. Chem.* 9:8-23. (Cit. Gautheret, 1982).
- San-José, M.C.; Vieitez, A.M.; Vieitez, E. (1983). Propagacion del roble mediante cultivo *in vitro* de yemas axilares. *Bol. Acad. Gal. Ciênc.*, II:65-72.

- San-José, M.C.; Vieitez, A.M.; Vieitez, E. (1984). *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds of chestnut. *J. Hort. Sci.*, 59(3):359-365.
- ; Vieitez, A.M.; Vieitez, E. (1985). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de brotes del género *Quercus*. *Phyton*, 45:31-40.
- ; Ballester, A.; Vieitez, A.M. (1988). Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus robur*. *Tree Physiol.*, 4:281-290.
- ; Vieitez, A.M. (1990). *In vitro* regeneration of *Camellia reticulata* cultivar "Captain Rawes" from adult material. *Sci. Horticulturae*, 43:155-162.
- Schad, C.; Solignat, G.; Grente, J.; Venot, P. (1952). Recherches sur le chataignier à la Station de Brive. *Ann. Amél. Plantes*, 2:369-458.
- Schenk, R.V.; Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50:199-204.
- Seckinger, G.R.; McCown, B.H.; Sturckmeyer, B.E. (1979). Production of anomalous structures in *Quercus rubra* L. *callus* cultures. *Amer. J. Bot.*, 66:993-996.
- Sederoff, R.; Stomp, A.M.; Guynn, B.; Ford, E.; Loopstra, C.; Hodgskiss, P.; Chirlton, W.S. (1987). Application of Recombinant DNA Techniques to Pines: A Molecular Approach to Genetic Engineering in Forestry. *In: Cell and Tissue Culture in Forestry* (Bonga, J.M.; Durzan, D.J. eds.), Vol. 1, pp.314-329, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sha, L.; McCown, B.H.; Peterson, L.A. (1985). Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 110:631-634.
- Shafer, J. (1966). A chestnut challenge. *Ann. Rep. North Nut Growers Assoc.*, 57:32-35.
- Shull, C.H. (1912). "Phenotype" and "Clone". *Science*, 35:182-183. (Cit. Hartman e Kester, 1984).

- Sibi, M. (1976). Genetic program in higher plants. Part 2: Experimental aspects, production of variants by *in vitro* tissue culture of *Lactuca sativa*. Increase in vigor in outcrosses. *Ann. Amelior. Plant.*, 26:523-547.
- Singha, S.; Townsed, E.C.; Oberly, G.H. (1990). Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 23:135-142.
- Skirvin, R.M.; Chu, M.C.; Rukan, H. (1980a). Rooting studies with *Prunus sp. in vitro*. *Hort-Science*, 15:83-415.
- (1981). Fruit Crops. *In: Cloning Agricultural Plants via In Vitro Techniques* (Conger, B.V. ed.), pp.51-139, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Skoog, F.; Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, N°11, *The Biological Action of Growth Substances*, pp.118-131.
- Sommer, H.E.; Brown, C.L.; Kormanik, P.P. (1975). Differentiation of plantlets in longleaf pines (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*. *Bot. Gaz.*, 136:196-200.
- Sriskandarajah, S.; Skirvin, R.M.; Abu-Qaoud, H. (1990). The effect of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21:185-189.
- St-Claire, J.B.; Kleinschmit, J. Svolba, J. (1985). Juvenility and serial vegetative propagation of Norway spruce clones (*Picea abies* Karst.). *Silvae Gen.*, 42-48.
- Stern, W.T. (1943). The use of the term "clone". *Jour. Roy. Hort. Soc.*, 74:41-47. (Cit. Hartman and Kester, 1984).
- Steward, G.R.; Rhodes, D. (1977). Control of enzyme levels in the regulation of nitrogen assimilation. *In: Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants* (Smith, H. ed.), pp.1-22, Academic Press Inc., New York.
- Stonier, T. (1971). The Role of Auxin Protectors in Autonomous Growth. *In: Les Cultures de Tissus de Plantes* (Centre Nat. Rech. Sci., ed.), pp.423-435, Paris.

- Tabata, M.; Ogino, T.; Yoshioka, N.; Hiraoka, N. (1979). Selection of Cell Lines With Higher Yield of Secondary Products. *In: Frontiers of Plant Tissue Culture*, pp.213-222, Int. Assoc. Plant Tissue Culture, Univ. Calgary, Alberta. (Cit. Ahuja, 1987).
- Takabee, I.; Labib, G.; Melchers, G. (1971). Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58:318-320. (Cit. Reisch, 1983).
- Trewavas, A. (1981). How do plant growth substances work. *Plant Cell Envir.*, 4:203-228.
- (1982). Growth substances sensitivity: The limiting factor in plant development. *Physiol. Plant.*, 55:60-72
- Tulecke, W.R. (1953). *Science*, 117:599-600. (Cit. Gautheret, 1982).
- Urquijo, P. (1946). (Ed.). *Hacia la solución del problema del castaño*. Lombardero Press, La Coruña. (Cit. Vieitez *et al.*, 1987).
- (1952). Multiplicación asexual de castaños. *An. Inst. Nac. Invest. Agron.*, 1:317-323.
- Vieitez, E. (1952). Ensayos de reproducción vegetativa de híbridos de castaño: *Castanea sativa* x *C. crenata*. *An. Edafol. Fisiol. Veg.*, 11:185-209.
- (1955). El empleo de sustancias de acción hormonal en el enraizamiento del castaño por el acodo bajo. *An. Edaf. Fisiol. Veg.*, 15:1-31.
- (1960). Obtención de Castaños Resistentes a la Enfermedad de la "Tinta". *Centr Reg. Ens. Inv. Exp. For. de Lourizan*, pp.5-29, Madrid.
- (1961). Actúa la hidrazida maleica como sinergista de la acción rizógena de las auxinas?. *Inst. Fores. Inv. Exp.*, 1:10-32.
- (1963). Enraizamiento de estaquillas juveniles de castaño. *Montes*, 12:331-333.
- (1981). Current knowledge of the physiology of the vegetative propagation of chestnut. *In: Proc. of the 17th IUFRO World Congress*, pp.61-71, Kyoto.

- Vieitez, A.M.; Ballester, A.; Vieitez, E. (1975). Coniferyl alcohol from *callus* of *Castanea sativa* cultured *in vitro*. *Separatum Experientia*, 31:1163.
- ; Gonzalez, M.L.; Vieitez, E. (1978a). *In vitro* culture of cotyledon tissue of *Castanea sativa* Mill. *Scientia Hortic.*, 8:243-247.
- ; -----; ----- (1978b). Root formation on cotyledon tissue of chestnut cultured *in vitro*. In: *Abstr. Inaugural Meet. FESPP*, pp.552-553, Edinburgh.
- ; Vieitez, M.L. (1980a). Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut growing *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 50:127-130.
- ; ----- (1980b). Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.*, 55:83-84.
- ; ----- (1982). *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *Sci. Hortic.*, 18:343-351.
- ; ----- (1983). Secuencia de cambios anatómicos durante el rizogénesis *in vitro* del castaño. *Phyton*, 43:185-191.
- ; Ballester, A.; Vieitez, M.L.; Vieitez, E. (1983). *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58(4):457-463.
- ; San-José, M.C.; Vieitez, E. (1985). *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L.. *J. Hort. Sci.*, 60:99-106.
- ; Vieitez, M.L.; Vieitez, E. (1986). Chestnut (*Castanea* spp.). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj, Y.P.S., ed.), Vol. 1, pp.393-414, Springer-Verlag, Berlin.
- ; Sánchez, C.; San-José, C. (1989). Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. *Scientia Hortic.*, 41:151-159.
- Vieitez, M.L.; Vieitez, A.M. (1981b). Injerto en hipocótilo de plántulas de castaño. *An. Edafol. Agrobio.*, 40:647-655.
- Vieitez, F.J.; San-José, M.C.; Ballester, A.; Vieitez, A.M. (1990). Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos in chestnut. *J. Plant Physiol.*, 136:253-256.

- Went, F.W. (1927). *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam* 30:10-19. (Cit. Gautheret, 1982).
- White, P.R. (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.*, 9:585-600.
- (1939). Potentially unlimited growth of excised plant *callus* in an artificial nutrient. *Amer. J. Bot.*, 26:59-64.
- (1963). *The cultivation of animal & plant cells*. 2ndEd. Ronald Press, New York. (Cit. George e Sherrington, 1984).
- Winton, L.L. (1968). Plantlets from aspen tissue cultures. *Science*, 160:1234-1235.
- Yeung, E.C.; Thorpe, T.A.; Jensen, C.J. (1981). *In Vitro* Fertilization and Embryo Culture. *In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* (Thorpe, T.A. ed.), pp.253-271, Academic Press Inc., London.
- Zaerr, J.B.; Mapes, M.O. (1982). Action of Growth Regulators. *In: Tissue Culture in Forestry* (Bonga, J.M.; Durzan, D.J. eds.), pp. 231-255. Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publ. The Hague.

ANEXOS

G

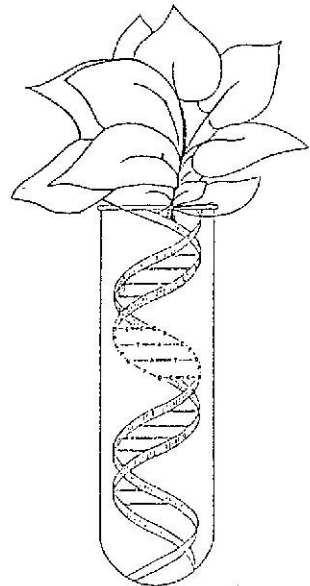


Tabela C1. ANÁLISE DE VARIÂNCIA: número de rebentos (NR).

Origem da Variação	df	SS	MS	F	Pr>F
Clone	2	155.23	77.61	80.90	.0001
Meio	2	57.32	28.66	29.87	.0001
BAP	5	1095.58	219.12	228.40	.0001
Clone * Meio	4	33.05	8.26	8.61	.0001
Clone * BAP	10	52.35	5.24	5.46	.0001
Meio * BAP	10	51.95	5.20	5.42	.0001
Clone * Meio * BAP	20	85.62	4.28	4.46	.0001
Resíduo	1782	1709.53	.96		
Total ajustado	1835	3240.63			
Grande Média			1.87		
Nº de Observações		1836			

Tabela C2. Número de rebentos obtidos para os clones 431, QR2 e M2.

Clone	431	QR2	M2	Média
NR	2.03	1.46	2.11	1.87

LSD .05 = .11

LSD .01 = .14

Tabela C3. Número de rebentos obtidos nos meios GD, Hm e WPM.

Meio	GD	Hm	WPM	Média
NR	2.05	1.93	1.63	1.87

LSD .05 = .11

LSD .01 = .14

Tabela C4. Número de rebentos obtidos para as diferentes concentrações de BAP (mg/l).

BAP	.05	.1	.2	.5	1	2	Média
NR	2.06	2.53	2.90	1.86	1.33	.54	1.87

LSD .05 = .16

LSD .01 = .20

Tabela C5. Número de rebentos obtidos na interação Clone * Meio.

Meio		GD	Hm	WPM	Média
Clone	431	2.14	2.16	1.79	2.03
	QR2	1.55	1.39	1.44	1.46
	M2	2.45	2.24	1.65	2.11
	Média	2.05	1.93	1.63	1.87

LSD .05 = .19

LSD .01 = .25

Tabela C6. Número de rebentos obtidos na interação Clone * BAP (BAP em mg/l).

BAP		.05	.1	.2	.5	1	2	Média
Clone	431	2.26	2.69	2.96	2.15	1.48	.66 ^{ab}	2.03
	QR2	1.92	2.04	2.48	1.26	.67	.39	1.46
	M2	1.99	2.87	3.25	2.16	1.84	.58	2.11
	Média	2.06	2.53	2.90	1.86	1.33	.54	1.87

LSD .05 = .27

LSD .01 = .35

Tabela C7. Número de rebentos obtidos na interação Meio * BAP (BAP em mg/l).

BAP		.05	.1	.2	.5	1	2	Média
Meio	GD	2.00	2.74	3.00	2.19	1.63	.75	2.05
	Hm	2.22	2.79	3.02	2.04	1.06	.45	1.93
	WPM	1.99	2.87	3.25	2.16	1.84	.58	1.63
Média		2.06	2.53	2.90	1.86	1.33	.54	1.87

LSD .05 = .27

LSD .01 = .35

Tabela C8. Número de rebentos obtidos na interação Clone * Meio * BAP (BAP em mg/l).

Clone	Meio	BAP						Média
		.05	.1	.2	.5	1	2	
431	GD	2.21	3.21	2.74	2.24	1.76	.71	2.14
	Hm	2.62	2.76	3.06	2.59	1.41	.53	2.16
	WPM	1.97	2.09	3.09	1.62	1.26	.74	1.79
QR2	GD	1.71	2.24	2.71	1.50	.68	.50	1.55
	Hm	1.76	1.94	2.21	1.38	.59	.44	1.39
	WPM	2.29	1.94	2.53	.91	.74	.24	1.44
M2	GD	2.09	2.76	3.56	2.82	2.44	1.03	2.45
	Hm	2.26	3.68	3.79	2.15	1.18 [†]	.38	2.24
	WPM	1.62	2.18	2.38	1.50	1.91	.32	1.65
Média		2.06	2.53	2.90	1.86	1.33	.54	1.87

LSD .05 = .47

LSD .01 = .61

Tabela C9. ANÁLISE DE VARIÂNCIA: comprimento do maior rebento (CM).

Origem da Variação	df	SS	MS	F	Pr>F
Clone	2	44256.73	22128.37	239.97	.0001
Meio	2	4161.47	2080.74	22.56	.0001
BAP	5	140552.72	28110.54	304.85	.0001
Clone * Meio	4	4911.93	1227.98	13.32	.0001
Clone * BAP	10	36218.34	3621.83	39.28	.0001
Meio * BAP	10	2690.32	269.03	2.92	.0012
Clone * Meio * BAP	20	13448.88	672.44	7.29	.0001
Resíduo	1782	164322.21	92.21		
Total ajustado	1835	410562.60			
Grande Média			16.49		
Nº de Observações			1836		

Tabela C10. Comprimento do maior rebento para os clones 431, QR2 e M2.(1)

Clone	431	QR2	M2	Média
CM	23.38	12.31	13.77	1.87

LSD .05 = 1.07

LSD .01 = 1.41

Tabela C11. Comprimento do maior rebento obtido nos meios GD, Hm e WPM.(1)

Meio	GD	Hm	WPM	Média
CM	18.41	14.74	16.31	16.49

LSD .05 = 1.07

LSD .01 = 1.41

(1) médias do comprimento em mm

Tabela C12. Comprimento do maior rebento obtido nas diferentes concentrações de BAP (mg/l).(1)

BAP	.05	.1	.2	.5	1	2	Média
CM	26.18	25.34	22.79	12.69	8.32	3.59	16.49

LSD .05 = 1.52

LSD .01 = 2.00

Tabela C13. Comprimento do maior rebento obtido na interacção Clone * Meio.(1)

Meio		GD	Hm	WPM	Média
Clone	431	23.97	21.15	25.01	23.38
	QR2	12.83	10.95	13.15	12.31
	M2	18.44	12.11	10.75	13.77
	Média	18.41	14.74	16.31	16.49

LSD .05 = 1.86

LSD .01 = 2.45

Tabela C14. Comprimento do maior rebento obtido na interacção Clone*BAP (BAP em mg/l).(1)

BAP		.05	.1	.2	.5	1	2	Média
Clone	431	42.98	37.29	28.57	16.84	10.34	4.24	23.38
	QR2	20.97	20.30	16.50	8.95	4.37	2.72	12.31
	M2	14.60	18.41	23.29	12.61	10.25	3.78	13.77
	Média	26.18	25.34	22.79	12.69	8.32	3.59	16.49

LSD .05 = 2.64

LSD .01 = 3.46

(1) médias do comprimento em mm.

Tabela C15. Comprimento do maior rebento obtido na interação Meio * BAP (BAP em mg/l).(1)

BAP		.05	.1	.2	.5	1	2	Média
Meio	GD	26.30	27.21	26.73	15.93	9.75	4.55	18.41
	Hm	23.88	24.94	20.10	10.55	5.84	3.11	14.74
	WPM	28.36	23.86	21.54	11.58	9.37	3.13	16.31
	Média	26.18	25.34	22.79	12.69	8.32	3.59	16.49

LSD .05 = 2.64

LSD .01 = 3.46

Tabela C16. Comprimento do maior rebento obtido na interação Clone * Meio * BAP (BAP em mg/l).(1)

Clone	Meio	BAP						Média
		.05	.1	.2	.5	1	2	
431	GD	44.38	34.24	30.00	19.44	12.24	3.50	23.97
	Hm	42.53	35.24	24.71	12.15	8.47	3.82	21.15
	WPM	42.03	42.41	31.00	18.94	10.32	5.38	25.01
QR2	GD	18.91	23.82	14.56	11.26	4.56	3.85	12.83
	Hm	12.44	22.71	16.12	9.24	2.32	2.88	10.95
	WPM	31.56	14.38	18.82	6.35	6.24	1.56	13.15
M2	GD	15.62	23.56	35.62	17.09	12.47	6.29	18.44
	Hm	16.68	16.88	19.47	10.26	6.74	2.62	12.11
	WPM	11.50	14.79	14.79	9.44	11.56	2.44	10.75
Média		26.18	25.34	22.79	12.69	8.32	3.59	16.49

LSD .05 = 4.56

LSD .01 = 6.00

(1) médias do comprimento em mm.

Tabela C17. ANÁLISE DE VARIÂNCIA: número de segmentos (NS).

Origem da Variação	df	SS	MS	F	Pr>F
Clone	2	1537.96	768.98	256.30	.0001
Meio	2	243.98	121.99	40.66	.0001
BAP	5	6083.42	1216.68	405.51	.0001
Clone * Meio	4	222.15	55.54	18.51	.0001
Clone * BAP	10	799.30	79.93	26.64	.0001
Meio * BAP	10	325.72	32.57	10.86	.0001
Clone * Meio * BAP	20	414.07	20.70	6.90	.0001
Resíduo	1782	5346.62	3.00		
Total ajustado	1835	14973.23			
Grande Média			3.30		
Nº de Observações			1836		

Tabela C18. Número de segmentos obtidos para os clones 431, QR2 e M2.

Clone	431	QR2	M2	Média
NS	4.51	2.30	3.09	3.30

LSD .05 = .19

LSD .01 = .26

Tabela C19. Número de segmentos obtidos nos meios GD, Hm e WPM.

Meio	GD	Hm	WPM	Média
NS	3.72	3.35	2.83	3.30

LSD .05 = .19

LSD .01 = .26

Tabela C20. Número de segmentos obtidos para as diferentes concentrações de BAP (mg/l).

BAP	.05	.1	.2	.5	1	2	Média
NS	3.94	5.33	5.54	2.77	1.65	.59	3.30

LSD .05 = .27

LSD .01 = .36

Tabela C21. Número de segmentos obtidos na interação Clone * Meio.

Meio		GD	Hm	WPM	Média
Clone	431	4.71	4.64	4.19	4.51
	QR2	2.37	2.25	2.28	2.30
	M2	4.09	3.16	2.03	3.09
	Média	3.72	3.35	2.83	3.30

LSD .05 = .34

LSD .01 = .44

Tabela C22. Número de segmentos obtidos na interação Clone * BAP (BAP em mg/l).

BAP		.05	.1	.2	.5	1	2	Média
Clone	431	5.49	7.83	7.14	3.87	2.03	.72	4.51
	QR2	3.41	3.85	3.70	1.64	.78	.42	2.30
	M2	2.92	4.29	5.77	2.81	2.13	.63	3.09
	Média	3.94	5.33	5.54	2.77	1.65	.59	3.30

LSD .05 = .48

LSD .01 = .62

Tabela C23. Número de segmentos obtidos na interação Meio * BAP (BAP em mg/l).

BAP		.05	.1	.2	.5	1	2	Média
Meio	GD	3.63	5.83	6.34	3.73	2.00	.80	3.72
	Hm	4.23	5.99	5.61	2.58	1.21	.50	3.35
	WPM	3.97	4.16	4.66	2.02	1.74	.46	2.83
Média		3.94	5.33	5.54	2.77	1.65	.59	3.30

LSD .05 = .48

LSD .01 = .62

Tab. C24. Número de segmentos obtidos na interação Clone * Meio * BAP (BAP em mg/l).

		BAP						
Clone	Meio	.05	.1	.2	.5	1	2	Média
431	GD	4.82	8.24	7.12	4.88	2.50	.71	4.71
	Hm	6.56	8.59	6.94	3.38	1.76	.62	4.64
	WPM	5.09	6.68	7.35	3.35	1.82	.82	4.19
QR2	GD	3.06	4.38	3.47	2.03	.71	.56	2.37
	Hm	2.53	4.24	3.85	1.76	.68	.47	2.25
	WPM	4.65	2.94	3.76	1.12	.97	.24	2.28
M2	GD	3.00	4.88	8.44	4.26	2.79	1.15	4.09
	Hm	3.59	5.15	6.03	2.59	1.18	.41	3.16
	WPM	2.18	2.85	2.85	1.59	2.41	.32	2.03
Média		3.94	5.33	5.54	2.77	1.65	.59	3.30

LSD .05 = .82

LSD .01 = 1.08

Tabela C25. ANÁLISE DE VARIÂNCIA: número de raízes (NRa), com AIB no meio de cultura.

Origem da Variação	df	SS	MS	F	Pr>F
Meio	1	14.29	14.29	4.10	.0442
AIB	2	351.21	175.61	50.38	.0001
Meio * AIB	2	23.41	11.71	3.36	.0368
Resíduo	198	690.05	3.49		
Total ajustado	203	1078.98			
Grande Média			1.51		
Nº de Observações			204		

Tabela C26. Número de raízes formadas nos meios 1/2GD e MSm, com AIB no meio.

Meio	1/2GD	MSm	Média
NRa	1.77	1.24	1.51

LSD .05 = .51

LSD .01 = .67

Tabela C27. Número de raízes formadas para as diferentes concentrações de AIB (mg/l), no meio de cultura.

AIB	1.5	3	5	Média
NRa	.18	1.06	3.29	1.51

LSD .05 = .63

LSD .01 = .83

Tabela C28. Número de raízes obtidas na interação Meio * AIB (AIB em mg/l).

AIB		1.5	3	5	Média
Meio	1/2GD	.06	1.26	4.00	1.77
	MSm	.29	.85	2.58	1.24
	Média	.18	1.06	3.29	1.51

LSD .05 = .89

LSD .01 = 1.17

Tabela C29. ANÁLISE DE VARIÂNCIA: comprimento da maior raiz (CMra) com AIB meio de cultura.

Origem da Variação	df	SS	MS	F	Pr>F
Meio	1	6292.59	6292.59	26.46	.0001
AIB	2	15818.91	7909.91	33.26	.0001
Meio * AIB	2	3869.77	1934.89	8.14	.0004
Resíduo	198	47081.68	237.78		
Total ajustado	203	73062.96			
Grande Média			13.01		
Nº de Observações			204		

Tabela C30. Comprimento da maior raiz nos meios 1/2GD e MSm, com AIB no meio.(1)

Meio	1/2GD	MSm	Média
CMra	18.57	7.46	13.01

LSD .05 = 4.23

LSD .01 = 5.56

Tabela C31. Comprimento da maior raiz obtida nas diferentes concentrações de AIB (mg/l), com AIB no meio.(1)

AIB	1.5	3	5	Média
CMra	1.53	14.59	22.93	13.01

LSD .05 = 5.18

LSD .01 = 6.81

Tabela C32. Comprimento da maior raiz obtida na interação Meio * AIB (AIB em mg/l).(1)

AIB		1.5	3	5	Média
Meio	1/2GD	1.21	24.68	29.82	18.57
	MSm	1.85	4.50	16.02	7.46
	Média	1.53	14.59	22.91	13.01

LSD .05 = 7.33

LSD .01 = 9.63

(1) médias do comprimento em mm.

Tabela C33. ANÁLISE DE VARIÂNCIA: comprimento médio de todas as raízes (Cmra) formadas por rebento, com AIB no meio de cultura.

Origem da Variação	df	SS	MS	F	Pr>F
Meio	1	3311.77	3311.77	23.82	.0001
AIB	2	7559.21	3779.61	27.19	.0001
Meio * AIB	2	2011.63	1005.82	7.24	.0009
Resíduo	198	27523.17	139.00		
Total ajustado	203	40405.78			
Grande Média			9.24		
Nº de Observações			204		

Tabela C34. Comprimento médio de todas as raízes formadas por rebento, nos meios 1/2GD e MSm, com AIB no meio.(1)

Meio	1/2GD	MSm	Média
Cmra	13.27	5.22	9.25

LSD .05 = 3.23

LSD .01 = 4.25

Tabela C35. Comprimento médio de todas as raízes formadas por rebento, nas diferentes concentrações de AIB (mg/l), com AIB no meio.(1)

AIB	1.5	3	5	Média
Cmra	1.02	11.15	15.57	9.25

LSD .05 = 3.96

LSD .01 = 5.21

(1) médias do comprimento em mm.

Tabela C36. Comprimento médio de todas as raízes formadas por rebento, na interação Meio * AIB (AIB em mg/l).(1)

AIB		1.5	3	5	Média
Meio	1/2GD	1.21	19.02	19.60	13.28
	M5m	.84	3.27	11.54	5.22
	Média	1.03	11.15	15.57	9.25

LSD .05 = 5.60

LSD .01 = 7.36

(1) médias do comprimento em mm.

Tabela C37. ANÁLISE DE VARIÂNCIA: número de raízes (NRA) por imersão basal em AIB.

Origem da Variação	df	SS	MS	F	Pr>F
Clone	1	2.59	2.59	.75	.3967
Tempo	2	7.09	3.54	1.03	.3606
Clone * Tempo	2	22.13	11.06	3.20	.0420
Resíduo	198	684.44	3.46		
Total ajustado	203	716.25			
Grande Média			1.25		
Nº de Observações			204		

Tabela C38. Número de raízes obtidas na interação Clone * Tempo (Tempo em s).

Tempo		30	60	120	Média
Clone	M2	.44	1.65	1.32	1.14
	431	1.59	1.29	1.21	1.36
	Média	1.02	1.47	1.27	1.25

LSD .05 = .88

LSD .01 = 1.16

Tabela C39. ANÁLISE DE VARIÂNCIA: comprimento da maior raiz (CMra) obtida por imersão basal em AIB.

Origem da Variação	df	SS	MS	F	Pr>F
Clone	1	2750.00	2750.00	11.24	.0010
Tempo	2	234.08	117.04	.48	.6204
Clone * Tempo	2	2319.25	1159.62	4.74	.0097
Resíduo	198	48429.62	244.59		
Total ajustado	203	53732.96			
Grande Média			12.51		
Nº de Observações			204		

Tabela C40. Comprimento da maior raiz obtida nos clones M2 e 431, por imersão basal em AIB.(1)

Clone	M2	431	Média
CMra	8.84	16.19	12.51

LSD .05 = 4.29

LSD .01 = 5.64

Tabela C41. Comprimento da maior raiz obtida na interação Clone * Tempo (Tempo em s), por imersão basal.(1)

Tempo		30	60	120	Média
Clone	M2	4.88	11.50	10.15	8.84
	431	27.71	15.00	11.85	16.19
	Média	13.30	13.25	11.00	12.51

LSD .05 = 7.43

LSD .01 = 9.77

(1) médias do comprimento em mm.

Tabela C42. ANÁLISE DE VARIÂNCIA: comprimento médio de todas as raízes obtidas por rebento (Cmra), por imersão basal em AIB.

Origem da Variação	df	SS	MS	F	Pr>F
Clone	1	2479.44	2479.44	13.47	.0003
Tempo	2	211.54	105.77	.57	.5639
Clone * Tempo	2	2080.55	1040.28	5.65	.0041
Resíduo	198	36455.06	184.12		
Total ajustado	203	41226.60			
Grande Média			10.54		
Nº de Observações			204		

Tabela C43. Comprimento médio de todas as raízes obtidas nos clones M2 e 431, por imersão basal em AIB.(1)

Clone	M2	431	Média
Cmra	7.05	14.02	10.54

LSD .05 = 3.72

LSD .01 = 4.89

Tabela C44. Comprimento médio de todas as raízes obtidas na interação Clone * Tempo (Tempo em s), por imersão basal em AIB.(1)

Tempo		30	60	120	Média
Clone	M2	3.51	9.61	8.04	7.05
	431	19.51	12.34	10.23	14.03
	Média	11.51	10.98	9.14	10.54

LSD .05 = 6.45

LSD .01 = 8.48

(1) médias do comprimento em mm.

Tabela D1. Composição iônica das soluções de macronutrientes utilizadas.

-as concentrações iônicas estão em mM.

-considera-se a concentração iônica total proporcional ao potencial osmótico.

Iões	Meios				
	GD	Hm	WPM	1/2GD	MSm
NO ₃ ⁻	9.9	8.8	9.7	4.9	9.8
H ₃ PO ₄ ⁻	1.0	1.1	1.3	0.5	0.6
SO ₄ ⁻	2.5	2.3	7.2	1.2	0.8
Cl ⁻	6.0	13.7	1.3	3.0	3.0
K ⁺	13.9	12.5	12.6	6.9	5.3
Ca ⁺⁺	1.0	0.6	3.0	0.5	1.5
Na ⁺	1.1	9.9	---	0.5	---
Mg ⁺⁺	1.0	1.3	1.5	0.5	0.8
NH ₄ ⁺	3.0	2.0	5.0	1.5	5.1
Conc. Total	39.2	52.2	41.6	19.5	26.9
N total	12.90	10.80	14.70	6.40	14.90
NH ₄ ⁺ /N total	0.23	0.19	0.34	0.23	0.34
NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻	0.30	0.23	0.51	0.30	0.52
K ⁺ /Ca ⁺⁺	13.90	20.83	4.20	13.90	3.50