

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**PROPAGAÇÃO DO SOBREIRO (*Quercus suber* L.)
POR ESTACARIA**

Maria Margarida Chagas de Ataíde Ribeiro

CURSO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

LISBOA, 1994

Dissertação realizada na Escola Superior Agrária de Castelo Branco sob orientação da Professora Sara Amâncio e apresentada no Instituto Superior de Agronomia para obtenção do Grau de Mestre do Curso de Mestrado em Produção Vegetal

Ao Luis, à Filipa e a
meus Pais

..." A colleague recently suggested that he would rather have poor measuring equipment but a good question to ask than the reverse...rooting research on cuttings during this century has...two broad questions: 1) How do cells form primordia that will develop into functional roots?; and 2) How does whole plant biology affect rooting of cuttings?"

Bruce Haissig (1988) in Future Directions in Adventitious Rooting

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A FLORESTA, O SOBREIRO E O HOMEM.....	1
1.1.1. Caracterização da espécie	1
1.1.2. Enquadramento histórico	4
1.1.3. O sobreiro na economia nacional	6
1.1.4. Declínio do montado.....	9
1.2. MELHORAMENTO E PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DO SOBREIRO	12
1.2.1. Melhoramento florestal.....	12
1.2.2. Propagação vegetativa	16
1.2.3. A problemática da maturação.....	18
1.2.4. Estratégia de melhoramento para o sobreiro	21
1.2.5. A propagação vegetativa no sobreiro	25
1.2.6. Objectivos do trabalho	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	30
2.2. ENSAIOS DE ENRAIZAMENTO	30
2.2.1. Caracterização dos ensaios.....	30
2.2.1.1. Primeiro ensaio	31

2.2.1.2. Segundo ensaio	31
2.2.1.3. Terceiro ensaio	32
2.2.2. Preparação das estacas	32
2.2.3. Condições de enraizamento.....	34
2.2.4. Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	35
2.3. ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PROCESSO RIZOGÉNICO.....	38
2.3.1. Colheita do material.....	38
2.3.2. Técnicas histológicas	38
2.3.3. Observações e microfotografias	39
3. RESULTADOS	41
3.1. ENSAIOS DE ENRAIZAMENTO	41
3.1.1. Resultados individuais para cada ensaio	41
3.1.1.1. Resultados do primeiro ensaio	41
3.1.1.2. Resultados do segundo ensaio	45
3.1.1.2.1. Estimulação de gomos axilares.....	47
3.1.1.3. Resultados do terceiro ensaio.....	48
3.1.2. Comparação parcial dos ensaios.....	50
3.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PROCESSO RIZOGÉNICO.....	52
3.2.1. Descrição das microfotografias	52
3.2.2. Análise das alterações observadas.....	55
4. DISCUSSÃO	59
4.1. ENSAIOS DE ENRAIZAMENTO	59
4.1.1. Aplicação de auxinas	60
4.1.1.1. Concentração de AIB, época do ano e aplicação de ANA.	61
4.1.1.2. Número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada.....	64
4.1.2. Descasque do centímetro basal da estaca.....	65
4.1.3. Escurecimento e estiolamento (número de dias às escuras)	67
4.1.4. Origem da estaca	69
4.1.5. Aplicação de BAP	69
4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PROCESSO RIZOGÉNICO.....	71
5. CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

ANEXOS I - Análises de variância	94
ANEXOS II - Interações	106

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar publicamente o meu agradecimento a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco, na pessoa do Presidente da Comissão Instaladora, Prof. Vergílio Pinto de Andrade, que permitiu a execução do trabalho experimental e ofereceu todas as condições para que o mesmo fosse levado a bom termo.

À Profª Sara Amâncio, minha orientadora científica, cujo acompanhamento e perspectiva crítica muito contribuíram para esta dissertação.

Ao Prof. Francisco Rego pela ajuda sempre pronta em todos os problemas surgidos com o tratamento estatístico dos dados.

Aos meus colegas Eng.ºs José Graça e José Carlos Rodrigues que possibilitaram a realização da parte do trabalho referente o acompanhamento anatomo-histológico do processo rizogénico.

À Encarregada de Trabalhos Maria Ângela Lima Antunes e à aluna Maria Isabel Silva Mata, imprescindíveis para a realização do trabalho experimental.

À Ana Gamas pela colaboração prestada na realização de algumas figuras que se apresentam no texto.

A todas as pessoas aqui não mencionadas, que de uma forma ou de outra tornaram possível o que a seguir se apresenta, sinto-me profundamente devedora

RESUMO

Realizaram-se ensaios de enraizamento com estacas provenientes de jovens sobreiros, durante dois anos consecutivos.

A aplicação de AIB à base da estaca melhorou a percentagem de enraizamento e a sobrevivência em relação à testemunha, na época de enraizamento de Abril. Na época de fins de Junho, já não se verificou a referida resposta positiva. Este tratamento não teve efeito no número de raízes formadas, por estaca enraizada, mas influenciou o comprimento da maior raiz, também por estaca enraizada, independentemente da época de enraizamento. A utilização de 0,1% ANA não provocou resultados diferentes da testemunha para qualquer dos parâmetros avaliados.

O descasque na base da estaca aumentou a percentagem de enraizamento e a sobrevivência. Este tratamento, juntamente com a aplicação de 0,5% de AIB conduziu a percentagens de enraizamento superiores a 60%, ao fim de três meses de ensaio, na época de enraizamento de Abril.

Quer a origem da estaca (topo ou base da planta) quer os tratamentos dos pés-mãe (colocação das plantas às escuras ou o escurecimento - uso de uma fita preta na base da futura estaca) não influenciaram a percentagem de enraizamento.

A sobrevivência das estacas é comprometida na época de enraizamento de fins de Junho, pelo facto de entrarem em dormência. A aplicação de BAP às estacas enraizadas, em dormência, estimulou o abrolhamento de gomos axilares e não se observaram efeitos fitotóxicos.

Realizaram-se cortes histológicos na base de estacas sujeitas ao tratamento de escurecimento (com ou sem aplicação de AIB na banda preta). No dia 0 observaram-se diferenças na estrutura devidas a esse tratamento especialmente ao nível da periderme e do xilema. Até ao dia 20 as diferenças estruturais das estacas submetidas ao tratamento de escurecimento foram-se acentuando com perda de coerência e aparecimento, por vezes abundante, de *callus*. Em geral as modificações surgiam na zona do nó e só depois na zona do entrenó. A aplicação de AIB à base da estaca antes de esta ser posta a enraizar não conduziu a diferenças tão evidentes como o tratamento de escurecimento.

Palavras-chave: Propagação vegetativa, enraizamento, estacas, anatomia, sobreiro, *Quercus suber* L

ABSTRACT

Rooting trials with cuttings taken from young cork oaks seedlings have been run for two years.

The use of IBA improved the percentage of rooting and survival of cuttings when taken in April. The same positive response did not happen in the experiment made by the end of June. This treatment did not affect the average number of roots by rooted cutting but it did improve the average length of the longest root by rooted cutting, no matter the timing used for rooting. The application of 0,1% of NAA had no influence on the studied parameters.

Bark removal from the base of the cutting has improved the percentage of rooting and survival. This treatment and the use of 0,5% of IBA led to the highest percentage of rooting (superior to 60%) after three months.

Neither the origin of the cutting (whether basal or apical) nor the donor plant treatments (number of days in the dark or blanching - the use of a black tape in the base of the future cutting) had influence on the percentage of rooting.

When the experiment was made by the end of June a significant number of rooted cuttings failed to survive, because dormancy overcame. The application of BAP on rooted dormant cuttings promoted axillary bud outgrowth with no visible fitotoxic effects.

The base of blanched cuttings showed effective alteration in the anatomical structure, by day 0, on the level of the periderm and xylem. At 20th day, blanching (with or without IBA application on the black tape) reached the complete loss of the normal structural pattern, eventually with strong *callus* formation. These alterations have appeared first in the node region and afterwards in the internode region. The IBA application to the base of the cutting, before rooting, did not result in a deep structural differences as blanching did.

Key-words: Vegetative propagation, rooting, cuttings, anatomy, cork oak, *Quercus suber* L.

LISTA DE SÍMBOLOS

P - fenótipo

G - genótipo

E - ambiente

σ^2_p - variância fenotípica

σ^2_A - variância aditiva

σ^2_{NA} - variância não aditiva

σ^2_G - variância genotípica

σ^2_E - variância ambiental

h^2_L - heritabilidade em sentido lato

h^2_R - heritabilidade em sentido restrito

μ_S - média da população seleccionada

μ_P - média da população

μ_D - média da população descendente

Ga - ganho genético

S - diferencial de selecção

Y_{ijkl} - valor observado

$(\alpha\beta)_{ij}$, $(\alpha\gamma)_{ik}$ e $(\beta\gamma)_{jk}$ - interacções dos factores dois a dois

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ - interacção dos três factores

ε_{ijkl} - desvio residual

n - tamanho da amostra

LISTA DE ABREVIATURAS

AGC - aptidão geral à combinação

AIA - ácido indolacético

AIB - ácido indolbutírico

ANA - ácido naftaloacético

ASC - aptidão específica à combinação

***Banda+AIB* - Tratamento de escurecimento com aplicação de 0,5% de AIB na banda preta**

BAP - 6-benzilaminopurina

***Com Banda* - Tratamento de escurecimento sem aplicação de 0,5% de AIB na banda preta**

C - número de estacas com *callus*

Ca - câmbio

CAP - circunferência à altura do peito

CMR - comprimento da maior raiz, por estaca enraizada, em mm

Cx - córtex

DDT - dicloro-difenil-tricloroetano

Es - esclerito

Fd - feloderme

Fe - felema

FI - felogene

Fs - floema secundário

HCl - ácido clorídrico

ig - número de gomos formados/número de verticilos

M - número de estacas mortas

Me - medula

NR - número de raízes, por estaca enraizada

P - periderme

Pv - fibras perivasculares

PVC - polivinilpolipropileno

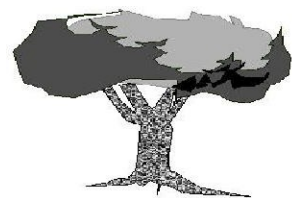
S - número de estacas sobreviventes

Sem Banda - Tratamento de escurecimento sem aplicação da banda preta

V - número de estacas vivas

Xs - xilema secundário

1. INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

1.1. A FLORESTA, O SOBREIRO E O HOMEM

1.1.1. Caracterização da espécie

O sobreiro (*Quercus suber* L.) é uma espécie da família das fagáceas, autóctone no nosso país e espontânea em toda a região mediterrânica ocidental, em especial na zona litoral.

Segundo o autor NATIVIDADE (1950), as numerosas adaptações xerofíticas do sobreiro, tanto estruturais como fisiológicas, levam a supor que a sua origem remonte à Era Terciária no período compreendido entre o Oligocénico e o Miocénico.

Após a última glaciação, que acabou há cerca de 10.000 anos, as sucessões primárias iniciaram-se em Portugal, provavelmente com comunidades arbustivas que foram gradualmente dominadas por pinheiros (*Pinus*

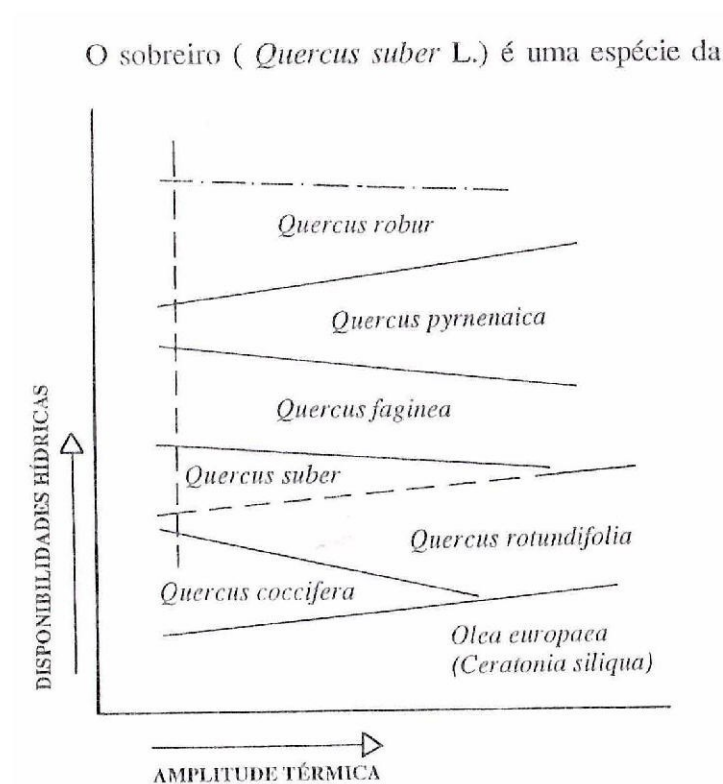


Fig. 1.1 - Prováveis tendências de dominância dos taxones clímax em Portugal (Fonte: CRUZ, 1986).

pinaster Aiton e *Pinus sylvestris* L.) e bétulas (*Betula* spp.); mais recentemente dominaram os carvalhos (*Quercus* spp.) associados com o castanheiro (*Castanea sativa* Miller) (BUNTING & REGO, 1988; AZEVEDO, 1992).

Teoricamente o estágio clímax de uma fitogeocenose corresponde a uma situação de relativa estabilidade. No entanto, a evolução do coberto vegetal desde o solo nu até essa fase de equilíbrio relativo com o meio envolvente é, na prática, sujeita a alterações ao longo do tempo, pois encontramos fitocenoses que se instalaram em situações climáticas bem distintas das actuais, como é o caso das estruturas vegetais relíquia. Assim, refere-se como *vegetação natural potencial* a que corresponderia a uma estrutura vegetal que estabilizaria ao fim de um determinado período de tempo, se toda a sequência sucessional fosse completada sem interferência por parte do homem, sob as actuais condições edafo-climáticas e, simultaneamente, fosse colocada à disposição da estação a totalidade dos elementos taxonómicos tidos por espontâneos na região. Em Portugal a distribuição da vegetação natural potencial é condicionada por vários factores sendo os mais relevantes, as características hídricas e as amplitudes térmicas, como podemos ver esquematicamente na Figura 1.1 (CRUZ, 1986).

Segundo BRAUN-BLANQUET *et al.* (1956), as comunidades climáticas potenciais

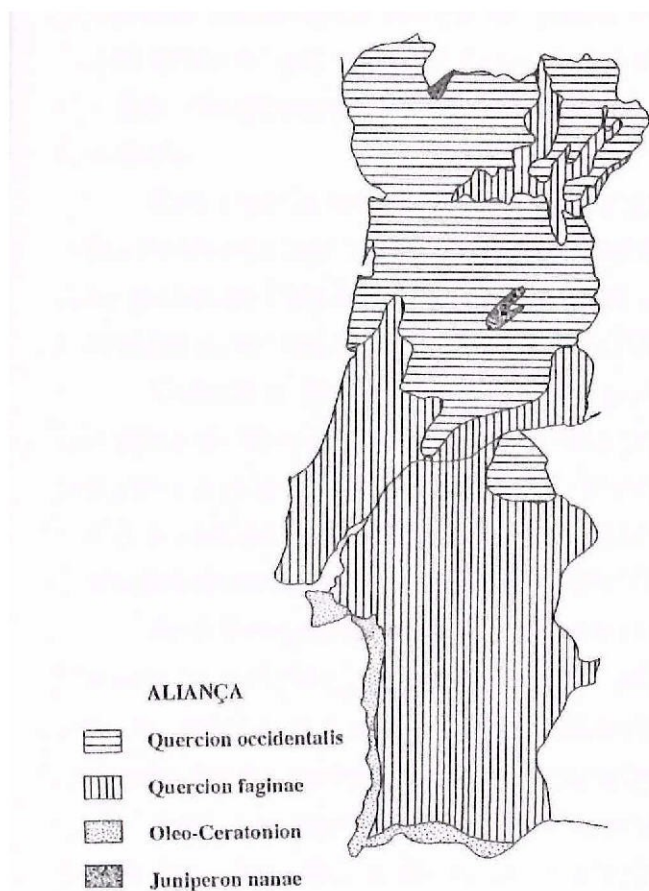


Fig. 1.2 - Vegetação clímax potencial em Portugal (Fonte: BUNTING & REGO, 1988).

têm a distribuição representada na Figura 1.2. No Norte, à excepção da Terra Quente Transmontana, a aliança *Quercion occidentale*, dominada pelos carvalhos de folha caduca (*Quercus robur* L e *Quercus pyrenaica* Willd.); no Sul e na Terra Quente domina a aliança *Quercion faginae*, de carvalhos de folha persistente: o sobreiro e a azinheira. O carvalho cerquinho (*Quercus faginea* Lam.), outrora muito abundante, é actualmente raro devido à sua menor resistência ao fogo e pouca importância económica. Nas montanhas mais altas (Estrela e Gerês) surgiu a aliança *Juniperon nanae* que inclui a espécie *Juniperus communis* L. var. *nana* Parl. Por fim, a vegetação mediterrânica mais típica, composta por arbustos esclerófitos, oliveira (*Olea europea* L.), alfarrobeira (*Ceratonia*

siliqua L.) e aroeira (*Pistacia lentiscus* L.), ao longo de toda a costa a Sul de Lisboa.

O sobreiro possui como principal característica um felogénio contínuo, de cuja actividade resulta um ritidoma suberoso, espesso e fendido, cinzento escuro nos troncos e ramos não descortiçados, amarelo passando a vermelho e chegando a negro nos descortiçados. É uma árvore que pode atingir os 10-15 m, com copa ampla e irregular, as folhas de 2,5-10 x 1,2-6,5 cm, são coriáceas, persistentes, verde-escuras a glabrescentes na página superior e densamente cinzento-tomentosas na inferior (FRANCO, 1971; CASTROVIEJO *et al.*, 1990).

É uma espécie pouco exigente quanto a solos, preferindo os graníticos e xistosos, recebe os compactos, calcários e encharcados. Encontra nos solos profundos, muito arejados e soltos as melhores condições para vegetar. As zonas de prosperidade para a espécie são definidas por uma precipitação média anual superior a 400 mm por ano e por as temperaturas mínimas absolutas superiores a -4°C. O tipo de distribuição das chuvas ao longo do ano é também muito importante, estios muito secos e prolongados afectam significativamente a árvore (NATIVIDADE, 1950).

Normalmente propaga-se por sementeira ou plantação, embora as sementes sob condições naturais conservem durante muito pouco tempo a capacidade germinativa. Logo após a germinação a jovem planta emite uma raiz muito vigorosa, aprumada e profundante que desenvolve ramificações laterais de grande expansão no sentido horizontal. NATIVIDADE (1950) observou que após três meses da sementeira a raiz principal tinha atingido cerca de 60 cm. Este comportamento pode ser bastante vantajoso em regiões de solo e clima pouco favoráveis.

Esta espécie tem uma constituição genética muito complexa, pois além de hibridar muito facilmente com outros carvalhos é também muito alogâmica. Esse facto é evidenciado pelas profundas diferenças morfológicas existentes entre plantas obtidas a partir de sementes recolhidas numa mesma árvore (NATIVIDADE, 1950).

Começa a frutificar normalmente por volta dos 15-20 anos e tem geralmente três produções de fruto por ano: o *bastão* com poucos frutos grandes, a *lande* de frutos normais, asseguram a propagação e o *landisco* de maturação tardia e imperfeita no Inverno (FRANCO, 1943). No entanto é uma espécie muito sujeita a safras e contra-safras, com cerca de duas boas produções de semente em cada 10 anos (NATIVIDADE, 1950; GOES, 1991).

As folhas possuem um elevado número de estomas relativamente a outros carvalhos e têm uma localização muito profunda o que dificulta as perdas hídricas. Persistem durante 2 a 3 anos; no entanto, a árvore pode excepcionalmente despir-se de folhagem quando os Verões são muito secos e prolongados ou os descortiçamentos são exagerados.

Apesar do crescimento ser relativamente rápido nos primeiros anos, devido ao facto de ser do tipo simpodial, a árvore cedo adquire um porte atarracado e copa larga. Rebenta vigorosamente a partir de gomos adventícios (FRANCO, 1943). Os sobreiros são podados de modo a que seja favorecida a forma do tronco e também a produção de fruto.

Julga-se que o sobreiro possa atingir, ainda que raramente, os 500 anos. Como o descortiçamento lhe reduz a longevidade, dura em média até aos 150 anos, o que não permite mais do que 10 a 12 tiradas de cortiça (GOES, 1991).

Esta espécie é explorada principalmente pela cortiça, cujas principais propriedades físicas, de interesse industrial, são: a baixa condutibilidade térmica, a relativa impermeabilidade e a elevada elasticidade. Estas propriedades são consequência quer da composição das paredes das células que constituem a cortiça, quer também do seu arranjo estrutural e espessura (GRAÇA & PEREIRA, 1993). A primeira camada de cortiça que se retira (*desboia*), rugosa e de qualidade inferior, chama-se *cortiça virgem* e é tirada por volta dos 25-30 anos, quando o sobreiro atinge pelo menos 70 cm de CAP (circunferência à altura do peito). Apresenta sulcos longitudinais profundos devido às lesões provocadas pelo crescimento radial do tronco e ramos e também pelo próprio aumento em espessura. Após a desboia, o felogénio morre e forma-se outro mais interior, com as mesmas características de longevidade do primeiro. A camada seguinte chama-se *cortiça segundeira* e tem já menos lesões e pregas longitudinais; obtém-se a *cortiça amadia* a partir das camadas seguintes retiradas, geralmente, de 9 em 9 anos. A cortiça resultante da actividade do felogénio após a retirada da cortiça virgem, é também chamada de *cortiça de reprodução*.

1.1.2. Enquadramento histórico

A área de expansão do sobreiro terá sido muito maior do que é hoje, facto evidenciado pela existência de bosquetes relíquia em regiões fora da área de distribuição actual da espécie. Na parte ocidental da bacia do Mediterrâneo, o sobreiro ocupa presentemente a faixa litoral. Na Península Ibérica, praticamente todo o nosso país está incluído na área de distribuição do sobreiro. A sua maior concentração na região Centro-Sul (ver Fig. 1.3) não se pode atribuir a uma melhor adaptação às condições edafo-climáticas, mas sim a circunstâncias criadas pela acção do homem (NATIVIDADE, 1950).

Em Portugal a pressão da população teve influencia sobre a vegetação. Como consequência do pastoreio e do fogo, a maior parte da floresta foi alterada. A agricultura surgiu onde o solo e a topografia a permitia. Cada cultura associada aos povos que dominaram a região ao longo dos tempos (Lusitanos, Fenícios, Romanos, Visigodos, Mouros, etc.), contribuiu com o seu sistema agrícola e também com a introdução de novas espécies, o que marcou profundamente a paisagem e a vegetação, de forma quase sempre irreversível (BUNTING & REGO, 1988).

A combinação do pastoreio e de fogos frequentes foram, pois, as principais causas do actual tipo de vegetação existente em Portugal (BUNTING & REGO, 1988). Porém, outros usos do solo contribuíram também para a alteração da paisagem. Desde a ocupação romana, a

cultura do trigo rompeu áreas extensas, incluindo solos marginais para a agricultura, tendo como consequência uma profunda erosão do solo. Este processo culminou, no nosso país, com a dramática *campanha do trigo*, iniciada no princípio do segundo quartel deste século (CALDAS, 1978; RIBEIRO, 1987).

As florestas de carvalho climácicas foram sendo substituídas por comunidades arbustivas, p.e., de rosmaninho e esteva e, até à criação dos primeiros serviços de protecção das florestas, a destruição continuou.

Nos anos de mil e quatrocentos, a criação do cargo de Monteiro-Mor do Reino, a quem foi cometido o policiamento das matas e coutadas, expressamente para protecção cinegética, mas criando obrigatoriamente a protecção da floresta, veio travar este processo. Porém, a persistente pressão dos camponeses, viria a anular o efeito desta protecção que, depois do reinado de D. Manuel I, praticamente se tornou ineficaz e sofreu mesmo rudes golpes durante a Dinastia Filipina bem

como no reinado de D João V (MATTOSO, 1947; CALDAS, 1978). As necessidades de construção naval vêm nestes reinados juntar-se às reclamações dos camponeses e levar à supressão do cargo de Monteiro-Mor e à liberalização da colheita e comércio da cortiça e madeira. A construção naval a partir do século XVI, consome um volume de material lenhoso considerável, sendo um contributo importante para a desarborização de áreas de fácil acesso. Outro factor de relevância é a pressão do gado que não só destrói as plantas jovens, como no caso que nos interessa, o sobreiro, come a lande.

Durante séculos pretendeu-se conciliar a protecção das florestas e da montaria com as necessidade do desenvolvimento agrícola. A legislação do século XIII ao século XVI é nesse aspecto um misto de cessões e de repressão, contribuindo as primeiras para a destruição da floresta a segunda tentando manter os privilégios senhoriais mas ao mesmo tempo consegue a salvaguarda da floresta.

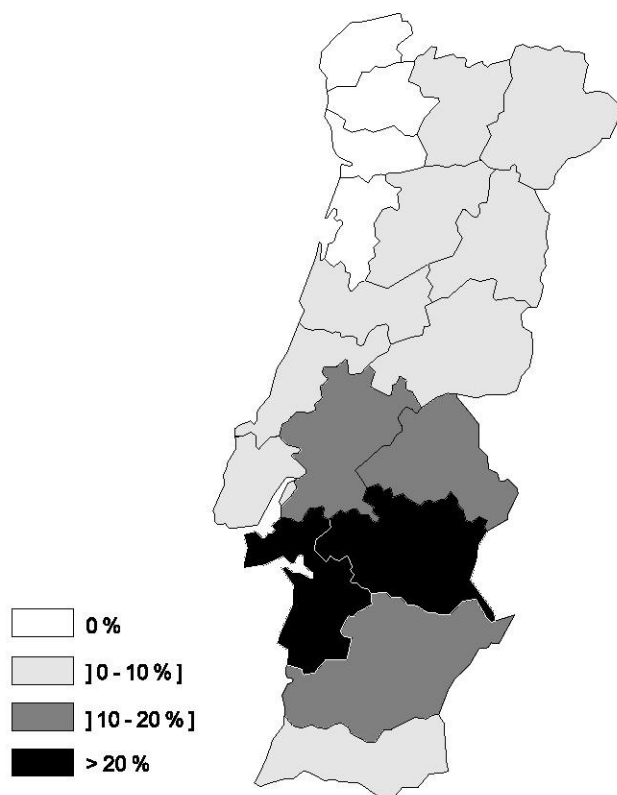


Fig. 1.3 - Percentagem da área florestal ocupada com sobreiro (povoamentos puros e mistos dominantes) por distritos (Fonte: DGF, 1993)

Os fogos foram utilizados intensivamente, quer para permitir o arroteamento das terras, quer para enriquecer as pastagens. Estas foram um dos factores de maior importância na evolução da vegetação em Portugal. Na Península Ibérica desenvolveu-se um padrão de transumância intenso a partir do século XVI, à medida que a pressão do gado aumentava e a importância da exportação da lã para a Europa crescia. As pastagens de Inverno podiam estar a distâncias superiores a 200 Km. Estes movimentos, designados por *canadas* em Espanha, chegavam a atingir proporções inimagináveis, tendo que se abrir autênticas estradas através dos campos para o *merino* passar enquanto os camponeses eram impedidos de vedar os campos. Esta situação durou até surgirem, no séc. XIX, movimentos de reacção contra a servidão dos pastos comuns e a interdição de tapar os campos.

A superfície ocupada pelo domínio florestal teve assim um desgaste de proporções consideráveis e nunca chegaremos a saber ao certo que parte coube ao sobreiro na grande área de floresta que desapareceu. No Norte do país, o mais intensivo aproveitamento da terra e o incessante emparcelamento, expulsaram o sobreiro das regiões mais férteis por ter menos interesse do que a cultura agrícola. Nas regiões montanhosas e mais agrestes, desaparece pela acção destruidora do fogo, do homem e do gado. No Centro e Sul do país, se bem que a área suberícola se tenha reduzido ao longo dos tempos, a menor densidade populacional e a protecção dispensada ao arvoredo pela legislação de defesa das espécies cinegéticas, possibilitou a manutenção de uma área considerável até à altura do sobreiro começar a ter importância económica (NATIVIDADE, 1950).

Em rigor, a subericultura Portuguesa só foi iniciada no séc. XVIII como resultado da valorização da cortiça, possivelmente associada ao desenvolvimento da indústria vidreira. Esboça-se nessa altura a técnica suberícola alentejana, baseada em desbastes selectivos e na baixa densidade do arvoredo transformando-se, o montado, numa floresta de uso múltiplo por excelência (NATIVIDADE, 1950). As podas periódicas dos sobreiros começaram a fazer-se no último quartel do século passado, quando a cultura arvense invadiu os montados de sobreiro. O objectivo era evitar o ensombramento da seara e também estimular a produção de fruto para a engorda dos porcos - a montanheira - (GOES, 1991). No entanto, a quantidade de cortiça extraída sobe vertiginosamente desde 1920 e Portugal ocupa ainda hoje o primeiro lugar entre os países produtores.

1.1.3. O sobreiro na economia nacional

A floresta portuguesa actual reflecte, como vimos, não só as características do solo e do clima, como também a profunda acção do homem. Apesar da sua destruição ao longo do

tempo e também dos esforços feitos na reflorestação, esta ocupa ainda uma parte significativa do território, ou seja, cerca de 1/3 da área total do país (DGF, 1993).

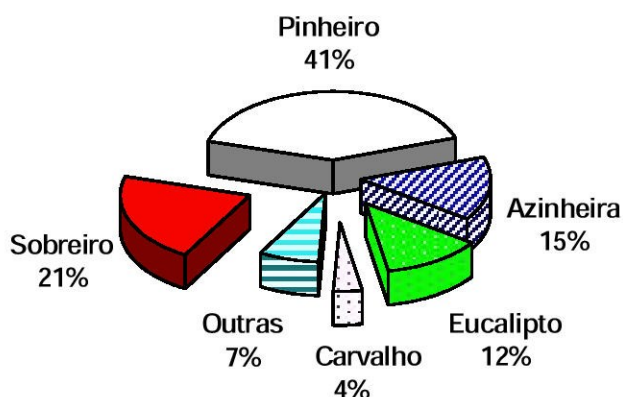


Fig. 1.4 - Distribuição das espécies em Portugal, em percentagem da área florestal total (Fonte: DGF, 1993).

O nosso país tem condições privilegiadas para o fomento florestal, pois a área potencial para arborização representa cerca de 60% do território, considerando que um milhão e trezentos mil hectares são terrenos incultos e que cerca de 25% dos solos agrícolas são marginais para essa actividade (DGF, 1992). A maior parte da área florestal do país é ocupada pelo Pinheiro bravo, logo seguido pelo Sobreiro e pela Azinheira, como se pode observar na Figura 1.4.

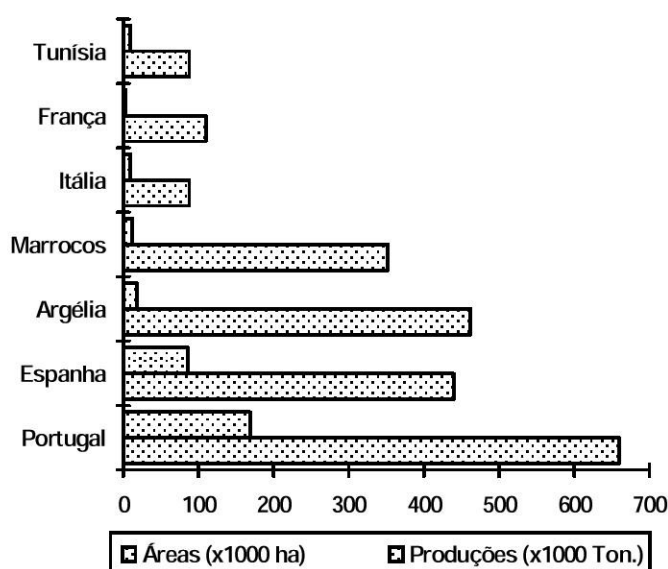


Fig. 1.5 - Distribuição da superfície ocupada pelo sobreiro e da produção de cortiça nos vários países produtores (Fonte: DGF, 1990).

No que diz respeito ao sobreiro a área ocupada é de 664 mil hectares, distribuídos em povoamentos puros e mistos dominantes, explorados em regime de alto-fuste que representa 21% da floresta portuguesa (Fig. 1.4) e 7% da superfície total do país. No entanto, segundo RODRIGUES (1989), essa área poderá vir a ser aumentada em mais de 200.000 hectares.

Ainda que se encontrem dispersos por todo o país, os povoamentos mais importantes localizam-se a Sul do Tejo.

Podemos verificar pela Figura 1.3, que 87% da área total do país ocupada com sobreiro se situa nos 5 distritos de localização Centro-Sul (Beja, Évora, Portalegre, Santarém e Setúbal).

Portugal produz 55% da cortiça mundial em 1/3 da área total do globo ocupada com esta espécie; as produções por unidade de superfície são bastante superiores à média geral verificada nas restantes regiões suberícolas (ver Fig. 1.5).

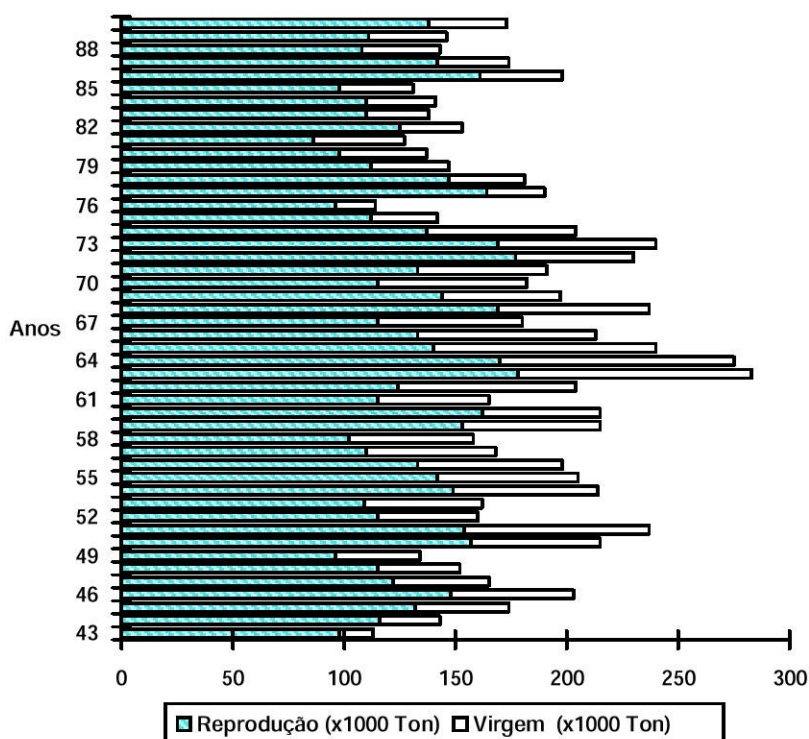


Fig. 1.6 - Flutuações na produção anual da cortiça reprodução e virgem desde 1943 (Adaptado de: SAMPAIO, 1977; PINTO & SOARES, 1987; DGF, 1990).

O volume de produção da cortiça nos últimos anos tem sofrido um ligeiro decréscimo (Fig. 1.6). Segundo SAMPAIO (1989), no caso da cortiça virgem, a diminuição a partir de 1960 é flagrante, facto que pode ser em parte explicado pelo aumento dos custos de extracção. A situação da cortiça de reprodução é de estagnação, com sintomas de decréscimo nos últimos anos.

A partir das estatísticas da DGF (Março de 1992) a indústria corticeira emprega, no seu conjunto, cerca de 13.000 operários, o que representa 23% do volume do emprego no conjunto das indústrias florestais e 2% na indústria transformadora. Esta indústria é um sector muito importante no conjunto das indústrias florestais, pois as 600 fábricas em actividade têm uma capacidade produtiva de 200.000 toneladas por ano de produtos derivados da cortiça, que geraram cerca de 70,9 milhões de contos em 1991, o que equivaleu a 28% das exportações dos produtos florestais, como se pode ver na Figura 1.7.

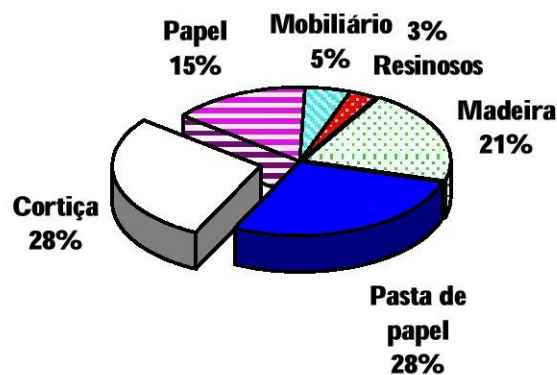


Fig. 1.7 - Estrutura das exportações dos produtos florestais, em valor, de 1991 (Fonte: DGF, 1992).

1.1.4. Declínio do montado

A degradação do montado de sobro é hoje uma realidade. Encontramos áreas pontualmente degradadas por todo o país, com árvores mortas ou com mau desenvolvimento vegetativo e sintomas evidentes de ataques de pragas e/ou doenças. Os investigadores CABRAL & SARDINHA, num trabalho publicado em 1992, dizem que parece ser muito mais do que uma coincidência o aparecimento de publicações referindo o problema do declínio do montado nas alturas de seca intensa deste século. Isso aconteceu em 43-45, 75-76, 80-83, e no surto que decorreu recentemente. Mas a seca não é a única causa: existe um conjunto de causas entre as quais, as de maior peso, serão as que se devem à actividade humana.

Um ecossistema só entra em declínio quando a sua *resiliência*, ou capacidade de reconstituição, for fortemente afectada, visto que em condições normais a homeostasia é muito elevada. O montado é ele próprio, como vimos, uma formação antrópica por excelência, *aliviado* do subcoberto que lhe é próprio e até da forma natural das árvores, além da própria cortiça. O intervalo de *resistência* às alterações ambientais ou outras é muito menor do que se se tratasse de uma *verdadeira* floresta. De facto, ao longo do tempo, houve um efeito cumulativo dos factores negativos que afectam o montado e que nos últimos tempos atingiram um patamar crítico, levando com mais intensidade à degradação e morte das árvores.

As condicionantes mais importantes, que podem ser situadas a três níveis segundo CABRAL & SARDINHA (1992), são as seguintes:

- 1. Factores que predispõem** ⇒ **1.1. Sistema social-** Interesses antagónicos entre o proprietário (maximização da produção de cortiça) e o rendeiro (maximização da produção da terra).
 ⇒ **1.2. Sistema físico-** Tipo de solo (encharcado, pesado, pouco arejado); Grau de compactação do solo (intensidade das mobilizações do solo e pastoreio).
- 2. Factores que desencadeiam** ⇒ **2.1. Factores abióticos-** Seca.
 ⇒ **2.2. Factores antrópicos-** Intensidade do descortiçamento; Podas exageradas; Roça do mato com intervalos muito curtos; Mobilizações do solo; Culturas sob coberto (cultura cerealífera); Utilização de queimadas.
- 3. Factores que aceleram** ⇒ **3.1. Pragas-** Acção de insectos: A lagarta do sobreiro (*Lymantria dispar* L.); o burgo (*Tortix viridana* L.); a cobrilha dos ramos (*Coroebus fasciatus* Vill.), etc.
 ⇒ **3.2. Doenças-** Acção de fungos: o carvão do entrecasco (*Hippoxilon mediterraneum* (De Not.) Mill.; a ferrugem laranja do entrecasco (*Endothiella gyrosa* Sacc.), etc.
 ⇒ **3.3. Acção Humana-** Feridas de descortiçamento; Não desinfecção dos instrumentos; Manutenção do arvoredado morto, etc.

Na década de 40 sobreveio um intenso ataque da lagarta do sobreiro (*Lymantria dispar* L.), um insecto desfolhador, em vastas áreas do Alentejo e Ribatejo (NATIVIDADE, 1950; NOGUEIRA, 1989). Os ataques deste desfolhador afectaram quer a extracção de cortiça quer a própria cortiça, sendo a frutificação quase completamente abortada. Aparentemente esta praga manifestou-se como resultado da profunda modificação que se deu no montado de sobreiro, resultante da já referida campanha do trigo. A destruição do subcoberto e a arroteia dos terrenos do montado parece ter provocado condições muito favoráveis ao desenvolvimento de insectos fitófagos.

Foi efectuada luta biológica, através da importação de parasitas e depredadores que se mostraram ineficazes para a diminuição das populações da lagarta do sobreiro. Foi posteriormente utilizado o DDT que embora tenha controlado a *Lymantria dispar* L. originou o aparecimento de um desfolhador, o burgo (*Tortix viridana* L.). Este último, que afecta principalmente a rebentação primaveril, foi mais difícil de controlar devido ao seu ciclo biológico. As campanhas referidas eram principalmente impulsionadas pelo interesse na montanha e, por isso, na produção de bolota. No entanto, o uso do DDT teve que ser posto de lado devido aos seus efeitos secundários, o que agravou subsequentemente o ataque destas e de outras pragas (NOGUEIRA, 1989).

O desinteresse pela produção de bolota, devido à desvalorização do porco alentejano na sequência do aparecimento da peste suína, fez com que as campanhas de combate às pragas fossem praticamente suspensas. A partir de 1960 sobrevieram fortes ataques de outros insectos fitófagos, a portésia (*Euproctis chryorrhoea* L.) e a lagarta verde (*Periclista andrei* Konow).

Em 1973 iniciou-se uma campanha de estudo sistemático das pragas e doenças dos montados, o que permitiu a partir daí inventariar e identificar anualmente as pragas e doenças dominantes assim como o respectivo estado da dinâmica das populações.

Segundo NOGUEIRA (1989), algumas pragas e doenças podem ser especialmente indicadoras do estado de *stress* e de caducidade do montado, como sejam: o carvão do entrecasco (*Hippoxilon mediterraneum* (De Not.) Mill.) e a ferrugem laranja do entrecasco (*Endothiella gyrosa* Sacc.), e também os coleópteros, cobrilha dos ramos (*Coroebus fasciatus* Vill.) e cobrilha da cortiça (*Coroebus undatus* Vill.). As doenças, carvão do entrecasco e ferrugem alaranjada, reduzem a superfície produtora de cortiça e podem provocar a morte da árvore por destruição do floema. A cobrilha da cortiça é muito abundante em áreas de montado degradadas. As larvas desenvolvem-se ao nível do felogénio e abrem galerias na cortiça, deixando cicatrizes profundas no entrecasco o que dificulta a extracção da cortiça e compromete a continuidade da prancha. A larva da cobrilha dos ramos alimenta-se de tecido floémico e, em consequência, o ramo seca. Existe, neste caso, uma correlação inversa entre a intensidade dos ataques e o número de árvores por hectare. Por vezes, uma percentagem elevada da copa pode ficar afectada o que debilita a árvore e possibilita o ataque de outras pragas e doenças.

A doença da tinta (*Phytophthora cinnamomi* Rands. e *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis.), principal responsável pelo declínio de soutos e castiçais, que têm vindo a desaparecer no nosso país desde o início do século, foi também referida com atacando o sobreiro (PIMENTEL, 1946; FERRAZ & MOREIRA, 1993). É um patogéneo que causa a destruição das raízes de menor diâmetro e necroses corticais na zona do colo. Quando se verifica uma morte elevada das raízes pastadeiras ou o estrangulamento do colo sobrevivem a morte da árvore (FERRAZ & MOREIRA, 1993). O seu papel no declínio do montado está no entanto mal esclarecido (Prof.^a Teresa Cabral, comunicação pessoal).

A alteração desta situação passa por um conjunto de medidas que visam: aumento nos cuidados de *higiene*, adensamento do montado, protecção do subcoberto evitando as culturas desgastantes, uma investigação mais profunda da dinâmica das populações das pragas e doenças bem como a dinamização da Protecção Integrada. NEVES referia, num artigo de 1949, que a trilogia fatal dos nossos montados são: *as pragas, doenças e má técnica*.

Evidentemente que hoje em dia poderão ser utilizadas novas tecnologias - os Sistemas de Informação Geográfica - de modo a poderem ser delimitadas áreas de susceptibilidade e serem estabelecidas bases para um correcto Ordenamento do Território, sem o qual, este tipo de situações continuarão a afectar o montado em particular e a floresta portuguesa em geral (CABRAL, 1993).

1.2. MELHORAMENTO E PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DO SOBREIRO

1.2.1. Melhoramento florestal

Segundo ZOBEL & TALBERT (1984) o melhoramento florestal tem como objectivo principal mudar a frequência dos alelos que influenciam as características mais interessantes, principalmente do ponto de vista económico, de maneira a que o comportamento da planta melhorada seja superior ao da planta não melhorada. Este processo só teve um desenvolvimento francamente acelerado a partir dos anos 50 e, actualmente, são numerosas as espécies que em todo o mundo têm sido incluídas em programas operacionais de melhoramento genético.

Um programa de melhoramento florestal deve, segundo os mesmos autores, incluir os seguintes passos:

- i) Determinação das fontes geográficas (proveniências) da espécie, a serem usadas numa área específica.
- ii) Obtenção de informação sobre a quantidade, o tipo e as causas da variabilidade dentro da espécie.
- iii) *Empacotamento* das características desejadas em indivíduos melhorados.
- iv) Produção em massa de material melhorado para florestação.

A variabilidade natural das espécies florestais embora suficientemente elevada tem sido pouco explorada podendo ser usada em programas de melhoramento genético. Essa variabilidade, tem pois que ser reconhecida, isolada, empacotada, multiplicada e também mantida.

Existem ainda, segundo os mesmos autores, dois aspectos fundamentais a ter em conta:

- a) Estratégia a curto prazo - Obtenção de um ganho genético máximo, explorando a variabilidade natural existente, seleccionando um número reduzido de indivíduos superiores.
- b) Estratégia a longo prazo - Manutenção de uma ampla base genética que possibilite a continuação do processo de melhoramento em gerações futuras, através de introdução de novas fontes de variabilidade, hibridação inter e intra-específica, indivíduos performantes testados, etc.

Os programas incluem uma fase inicial de selecção, através da qual são escolhidas as árvores mais interessantes que irão dar origem à produção de plantas melhoradas e serão a base de futuras actividades de melhoramento. A aparência exterior do indivíduo, ou seja o

fenótipo, condiciona essa escolha e nada podemos supor com base nele, relativamente ao genótipo. A melhor maneira de verificar se uma dada árvore é de qualidade superior é fazer testes de descendência, isto é, comparar o comportamento da sua descendência com a de outras árvores. Estes testes são delineados por forma a separar as diferenças genótípicas das ambientais, submetendo as descendências a um ambiente homogéneo. Essas diferenças são testadas estatisticamente, partindo do princípio de que o fenótipo (P) é influenciado pelo genótipo (G) e pelo ambiente (E) onde a árvore cresce :

$$(1) P = G + E$$

Mas devido ao facto do genótipo ser uma das componentes do fenótipo, relacionada com o seu potencial genético, supomos que se bons fenótipos forem seleccionados, poderemos obter genótipos melhorados. Depois de termos estabelecido a relação entre o genótipo e o fenótipo poderemos pressupor o verdadeiro valor genético da árvore, só pela mera observação do fenótipo.

A variância fenotípica de uma certa característica (σ^2_P) numa população de árvores, pode ser partida nas suas componentes genotípica (σ^2_G) e ambiental (σ^2_E):

$$(2) \sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_E$$

Sabe-se que a variância genotípica, por sua vez pode decompor-se na componente aditiva, (σ^2_A), devida às características de efeito quantitativo, e também na componente não aditiva (σ^2_{NA}), devida a fenómenos de dominância e epistasia:

$$(3) \sigma^2_G = \sigma^2_A + \sigma^2_{NA}$$

Quando se utiliza a propagação seminal só se pode utilizar a componente aditiva, pois a componente não aditiva não se mantém durante o processo de formação dos gâmetas e reconstrução dos genótipos. Ainda que muitas características possam ser quantitativas, a grande maioria das características de interesse económico, são qualitativas e portanto não podem ser capturadas pelo processo de propagação seminal.

Os valores genéticos dos progenitores são expressos em termos da sua aptidão geral à combinação (AGC), isto é, o comportamento médio da descendência de uma árvore, quando é cruzada ao acaso com outras, na população. Então o valor genético dessa árvore é o dobro da sua aptidão geral à combinação ($2 \times AGC$), pois ela só contribui com metade dos genes para a sua descendência. Este conceito reflecte o valor genético aditivo da árvore progenitora, pois

indica a porção do genótipo que essa árvore é capaz de transmitir à descendência, independentemente da contribuição do outro progenitor. A aptidão específica à combinação (*ASC*) indica o comportamento médio da descendência relativamente ao cruzamento específico entre duas árvores. Representa a interacção intra e interalélica, isto é, o valor não aditivo dos genes. Para se poder usar este parâmetro ou se utilizam cruzamentos dirigidos (polinização controlada) ou se recorre à propagação vegetativa, que permite a transmissão integral do genótipo da árvore à descendência (ZOBEL & TALBERT, 1984). A propagação vegetativa permite ganhos maiores e mais rápidos, pois todos os tipos de variação são capturados.

A selecção de alguns dos melhores indivíduos da população leva a um diferencial de selecção (*S*) que é igual à diferença entre a média do valor da característica da população seleccionada (μ_S) e a média da população (μ_P). O ganho genético (*Ga*) indica a diferença entre a média da população descendente (μ_D) e a média da população. A relação entre o diferencial de selecção e o ganho genético pode ser expresso por um termo que varia entre 0 e 1 e que é a heritabilidade, como se pode ver em (6):

$$(4) S = \mu_S - \mu_P$$

$$(5) Ga = \mu_D - \mu_P$$

$$(6) Ga = h^2 S$$

A heritabilidade exprime a proporção da variância da população devida a diferenças genotípicas entre os indivíduos da população podendo definir-se em sentido lato e em sentido restrito. A heritabilidade em sentido lato (h^2_L) indica a proporção da variância genotípica relativamente à variância fenotípica:

$$(7) h^2_L = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2}$$

A heritabilidade em sentido restrito (h^2_R) indica a proporção da variância aditiva relativamente à variância total:

$$(8) h^2_R = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$$

O ganho genético (*Ga*) é o resultado da actividade de melhoramento que nos interessa maximizar. Pode ser conseguido de várias maneiras: 1) diminuindo o número de indivíduos seleccionados; 2) partindo de populações com elevada variabilidade para a característica em causa, o que aumenta σ_G^2 ; 3) aumentando a heritabilidade através do delineamento experimental por diminuição do erro residual (FALCONER, 1972; AYALA, 1984; ZOBEL & TALBERT, 1984)

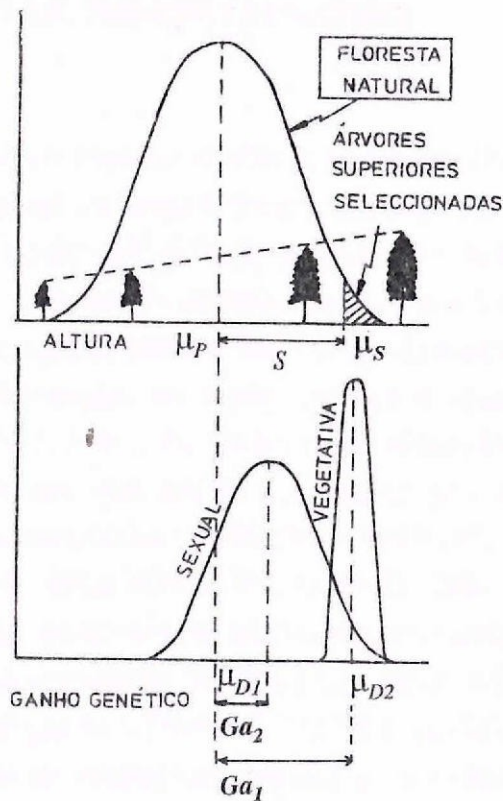


Fig. 1.8 - Comparação dos ganhos genéticos obtidos com a propagação vegetativa e sexuada de árvores superiores seleccionadas (Adaptado de BONGA, 1982).

O esquema apresentado na Figura 1.8, adaptado de BONGA (1982) permite comparar os ganhos genéticos obtidos através de ambos os processos. A curva representa a distribuição das alturas num povoamento equiênio. Observa-se uma variação considerável na altura das árvores, cuja distribuição acompanha a curva normal. Pela selecção das árvores mais altas e respectiva propagação sexuada, obtém-se, em geral, uma distribuição das alturas da descendência um pouco desviada para a direita em relação à média dos progenitores e por isso o ganho obtido é pequeno (Ga_2).

Através da propagação vegetativa das árvores seleccionadas é possível, em princípio, que a média das alturas da descendência venha a apresentar um desvio superior, de que resulta um ganho genético maior ($Ga_1 \geq Ga_2$). Numa só geração e reportando-nos mais uma vez à Figura 1.8, verifica-se atendendo a (3) que:

Através da propagação vegetativa das árvores seleccionadas é possível, em princípio, que a média das alturas da descendência venha a apresentar um desvio superior, de que resulta um ganho genético maior ($Ga_1 \geq Ga_2$). Numa só geração e reportando-nos mais uma vez à Figura 1.8, verifica-se atendendo a (3) que:

$$\sigma^2_G \geq \sigma^2_A$$

para a mesma característica e população, como se pode deduzir de (7) e (8):

$$h^2_L \geq h^2_R$$

logo:

$$Ga_1 \geq Ga_2$$

e a igualdade da expressão anterior só se verifica quando a componente não aditiva da variância genotípica é nula. Demonstra-se, assim, que numa só geração o ganho genético obtido pela via vegetativa pode ser superior ao obtido pela via sexuada.

1.2.2. Propagação vegetativa

A propagação vegetativa é pois um processo de propagação de material melhorado que foi empregue ao longo dos anos mais especificamente para espécies ornamentais e fruteiras. O seu uso no domínio florestal começou por ser aplicado a espécies de fácil enraizamento, como sejam a *Criptomeria japonica* D. Don. e em espécies dos géneros *Populus* spp. e *Salix* spp. Existem depoimentos escritos do uso de estacas enraizadas de *Criptomera japonica* D. Don. para arborização, no Japão, durante o século XIX e início do século XX (ZOBEL & TALBERT, 1984). As vantagens na utilização deste método de propagação tornaram-se tão evidentes que tem havido um esforço para alargar a sua utilização a espécies de grande interesse económico (THULIN & FAULDS, 1968; LIBBY, 1983; KLEINSCHMIT, 1983; RAUTER, 1983; ZOBEL & TALBERT, 1984; MARTIN & PRATT, 1985).

Do ponto de vista teórico existem vantagens na utilização da propagação vegetativa em relação à propagação sexuada, como vimos, principalmente a curto prazo.

Segundo LYBBY & RAUTER (1984), existem muitas outras vantagens associadas à aplicação da propagação vegetativa no contexto do melhoramento florestal e no uso da floresta clonal. Das várias razões apontadas, sistematizámos as que nos parecem mais relevantes, e que foram também destacadas por outros autores:

i) Possibilita a obtenção de elevados ganhos genéticos a curto prazo, explorando a elevada variabilidade existente nos povoamentos florestais naturais (BONGA, 1982; ZOBEL & TALBERT, 1984).

ii) Complementa a utilização da semente melhorada, produzida nos pomares de semente, quer por polinização livre quer por polinização controlada (ZOBEL & TALBERT, 1984).

iii) Permite utilizar toda a aptidão específica à combinação de dois progenitores que, de outro modo, só seria usada através da polinização controlada ou do estabelecimento de pomares biclonais (ZOBEL & TALBERT, 1984).

iv) Possibilita a propagação massal de genótipos previamente testados ou de híbridos (KLEINSCHMIT, 1977; ZOBEL & TALBERT, 1984).

v) Permite a conservação dos recursos genéticos em bancos clonais. Esta medida é imprescindível atendendo à redução da variabilidade que um programa de melhoramento necessariamente acarreta (KLEINSCHMIT, 1983; ZOBEL & TALBERT, 1984).

vi) Possibilita a avaliação de vários parâmetros genéticos para investigação florestal: estimativas da heritabilidade em sentido lato, da interacção genótipo-meio, etc. (BURDON & SHELBOURNE, 1974; KLEINSCHMIT, 1977; KLEINSCHMIT, 1983; ZOBEL & TALBERT, 1984).

vii) Permite estabelecer pomares de semente, por via vegetativa, o que facilita a sua gestão, além de garantir a identidade dos clones (KLEINSCHMIT, 1983; ZOBEL & TALBERT, 1984).

Tabela 1 - Exemplos da utilização da propagação vegetativa, em algumas espécies florestais (Adaptado de RIBEIRO, 1993).

ESPÉCIE	TÉCNICAS USADAS	REFERÊNCIA
<i>Pinus radiata</i>	Podas intensas, estacaria de árvores adultas.	THULIN & FAULDS (1968) LIBBY <i>et al.</i> (1972)
<i>Picea abies</i>	Estacaria em série ¹ de plantas com 4 anos.	KLEINSCHMIT (1985)
<i>Pinus pinaster</i>	Poda de árvores adultas, estacaria, enxertia e cultura de tecidos.	FRANCLET (1977) FRANCLET (1980)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Abate de árvores adultas, estacaria dos rebentos de touça, cultura de tecidos.	ANÓNIMO (1982)
<i>Eucalyptus grandis</i>	Abate de árvores adultas, estacaria de rebentos de touça.	ZOBEL & IKEMORI (1983)
<i>Quercus suber</i>	Cultura de tecidos de árvores adultas. Estacaria de plantas jovens.	MANZANERA & PARDOS (1990) ROMANO & MARTINS- -LOUÇÃO (1992) ROLDÃO <i>et al.</i> (1992)

O uso da propagação vegetativa está a aumentar rapidamente e é de importância vital para o melhorador. Segundo ZOBEL & TALBERT (1984), têm sido feitos progressos muito interessantes a partir dos anos 80, com o uso de metodologias de propagação vegetativa em programas operacionais de melhoramento florestal e de florestação

Segundo os mesmos autores, o uso sistemático de estacas enraizadas tornar-se-á corrente num futuro próximo dependendo sobretudo de aspectos técnicos e, especialmente no que se relaciona com a idade da árvore e a sua possível reversão à condição juvenil.

Na Tabela 1.1 referem-se exemplos que são citados na bibliografia referenciada, sobre a utilização de técnicas de propagação vegetativa, por vezes em larga escala para as espécies florestais referidas, precedidas ou não de algumas formas de contornar o processo de maturação das árvores.

¹ O sentido deste termo será clarificado mais à frente, na página 20

1.2.3. A problemática da maturação

Nas espécies florestais o processo de maturação pode ser responsável pela dificuldade em propagar vegetativamente indivíduos seleccionados. Quando a árvore atinge uma idade suficiente para que as suas características possam ser avaliadas a utilização da via clonal pode ser muito problemática.

De uma maneira geral, a capacidade de propagação vegetativa das árvores florestais decresce com a idade, embora também dependa de outros factores: a espécie, o genótipo e o estado fisiológico.

Nem todas as espécies têm a mesma facilidade em enraizar. Algumas contêm meristemas radiculares pré-formados prestes a alongarem-se desde que as condições sejam favoráveis. São as espécies de fácil enraizamento como é o caso dos géneros *Salix* spp., *Populus* spp., e outros. (FRANCLET, 1977; ZOBEL & TALBERT, 1984). Numa segunda categoria, surgem as espécie moderadamente fáceis de propagar, em que uma única manipulação do pé-mãe permite uma propagação massal adequada. É o caso, de espécies da família das Cupressáceas. Existe uma última categoria de espécies, normalmente as mais interessantes do ponto de vista económico, que possuem efeitos de maturação precoces relativamente estáveis sendo a sua capacidade de enraizamento bastante menor. É o caso dos géneros *Pseudotsuga* spp., *Abies* spp., *Pinus* spp., *Quercus* spp., etc. (FRANCLET, 1977).

Mas a aptidão para a propagação vegetativa pode ter flutuações muito grandes dentro da mesma espécie, como acontece, p. e., na *Eucalyptus globulus* Labill. (ANÓNIMO, 1982) ou em espécies do género *Quercus* (ARBEZ, 1982). Até na mesma árvore podem existir variações na aptidão para a propagação vegetativa devidas a aspectos nutricionais e hormonais (FAVRE, 1977; RAUTER, 1983). Estabelece-se um gradiente ao longo da árvore em que a capacidade de emissão de raízes da estaca varia com a sua posição na árvore. Normalmente as partes basais dos ramos e copa são as zonas mais adequadas para a propagação vegetativa. A idade ontogénica está relacionada com a capacidade de enraizamento de estacas, esta aumentando com a proximidade ao sistema radicular (OLESON, 1978; MONTEUUIS, 1989).

Podem descrever-se técnicas empregues isoladamente ou em conjunto, que permitem a utilização de material adulto como base para a propagação vegetativa de material melhorado.

As consequências destes procedimentos situam-se a três níveis:

- i) Rejuvenescer o material a propagar.**
- ii) Desenvolver meristemas pré-formados, inibidos pelos meristemas apicais.**

iii) Suprimir os efeitos repressivos de eventuais inibidores endógenos.

Trata-se de técnicas de **1) manipulação dos propágulos²**, com que se pretende um aumento da sua capacidade rizogénica destes em gerações sucessivas e/ou técnicas de **2) mobilização da planta dadora**, que consistem na obtenção da primeira geração de propágulos:

1) MANIPULAÇÃO DO PROPÁGULO	{ Enxertia - microenxertia - Estacaria em série Cultura de tecidos
2) MOBILIZAÇÃO DA PLANTA DADORA	{ Pulverização com citocininas Podas Abate da árvore

1) Manipulação do propágulo:

Utiliza-se um tipo particular de enxertia - a microenxertia - que se realiza com um cavalo jovem, de preferência obtido a partir de semente da própria árvore, e um garfo miniaturizado da planta adulta. Tem sido empregue com sucesso em várias espécies sobretudo no género *Eucalyptus*, como seja o caso da *Eucalyptus gunni* Hook. F. e da *Eucalyptus dalrympleana* Maiden (CAUVIN, 1981) e é muito útil quando não se pode abater a árvore seleccionada. No caso do sobreiro, pode ser uma metodologia muito interessante para obter um certo rejuvenescimento, ainda que fugaz. Poderá ter que se realizar mais que uma vez e, por fim, com ou sem utilização de outras técnicas, poderá estabelecer-se a planta como pé-mãe. Esta técnica parte do pressuposto de que a influência que o cavalo exerce sobre o garfo depende da distância entre eles e da importância que as folhas têm em induzir ou manter os meristemas maduros (PATON *et al.*, 1981).

Na estacaria em série, após a primeira mobilização da árvore adulta por qualquer processo, obtém-se uma estaca enraizada que, por sua vez, irá dar origem a outras, não se distinguindo a planta-mãe das estacas destinadas à plantação. É uma técnica simples e económica, perfeitamente adaptada a uma produção massal de plantas. Após a primeira mobilização da planta dadora, obtém-se uma estaca enraizada que, por sua vez, irá dar origem a mais estacas enraizadas, aproveitando os ramos laterais. A estaca inicial segue para a plantação, o mesmo acontecendo às estacas originadas a partir dela, ou seja, as estacas da geração a são retiradas das homólogas plantáveis da geração a-1. Consegue-se, desta forma,

² Propágulo é aqui empregue no sentido de qualquer parte da planta que vai servir para a propagar vegetativamente.

um elevado número de plantas do mesmo clone. Esta técnica tem sido aplicada com sucesso à *Picea abies* (L.) Karsten, com base em plantas de 4 anos (KLEINSCHMIT, 1985).

Segundo FRANCKET (1982), as potencialidades da cultura de tecidos são imensas. Por um lado devido à miniaturização do *explant*³, por outro, pela possibilidade de se manipular o ambiente exógeno (fotoperíodo, temperatura, humidade, composição do meio nutritivo, reguladores de crescimento, etc.). Esta técnica antecedida ou não de outra, pode ser bastante bem sucedida na obtenção de plantas rejuvenescidas. Esse objectivo tem sido conseguido, mesmo em plantas muito recalcitrantes, como é o caso da *Sequoia sempervirens* (Lam.) Endl. (BOULAY, 1979) mas também da *Quercus suber* L. (MANZANERA & PARDOS, 1990; ROMANO & MARTINS-LOUÇÃO, 1992). DAVID (1982) refere que talvez a cultura de tecidos remova a maior parte das correlações internas, o que não parece no entanto ser suficiente para rejuvenescer completamente as células de *explants* provenientes de árvores adultas.

2) Mobilização do planta dadora:

A poda e o abate da árvore são técnicas que se usam na horticultura clássica. Baseiam-se na reactivação de meristemas pré-formados e inibidos pelo crescimento dos meristemas apicais. O abate da árvore é muito utilizado nas espécies que rebentam facilmente de touça. É frequente o seu uso no género *Eucalyptus* spp. (HARTNEY, 1980; ZOBEL & IKEMORI, 1983) e também no género *Quercus* spp. (FRANCKET, 1983).

A aplicação de citocininas também estimula o desenvolvimento de gomos adventícios, pré-formados e inibidos pelo crescimento da árvore. Na *Quercus suber* L., usou-se BAP para induzir a brotação axilar, com muito bons resultados quer em plantas jovens (TORIBIO, 1986) quer em touças (MANZANERA & PARDOS, 1990).

O rejuvenescimento, ou seja, a reversão das características adultas para juvenis, não parece ser completamente conseguido com estas técnicas. A designação mais correcta a empregar deveria ser revigoração. Segundo HACKETT (1985), o que distingue estes dois termos é a estabilidade da característica readquirida que, no segundo caso, não se mantém.

A propagação vegetativa das espécies florestais, pode ser efectuada por diferentes técnicas que estão especificadas na Figura 1.9, em relação ao objectivo final: a obtenção de plantas aptas para arborização e para testes clonais; umas são mais apropriadas para a obtenção das primeiras cópias vegetativas, (alporquia aérea, amontôa, estacaria, enxertia e cultura de tecidos) e outras são mais indicadas para reactivar o material mobilizado e estimular

³ *Explant* tem o significado de qualquer estrutura vegetal utilizada para iniciar a multiplicação *in vitro*.

as capacidades morfogénicas iniciais (microenxertia em série, estacaria em série e subcultivos sucessivos em cultura de tecidos).

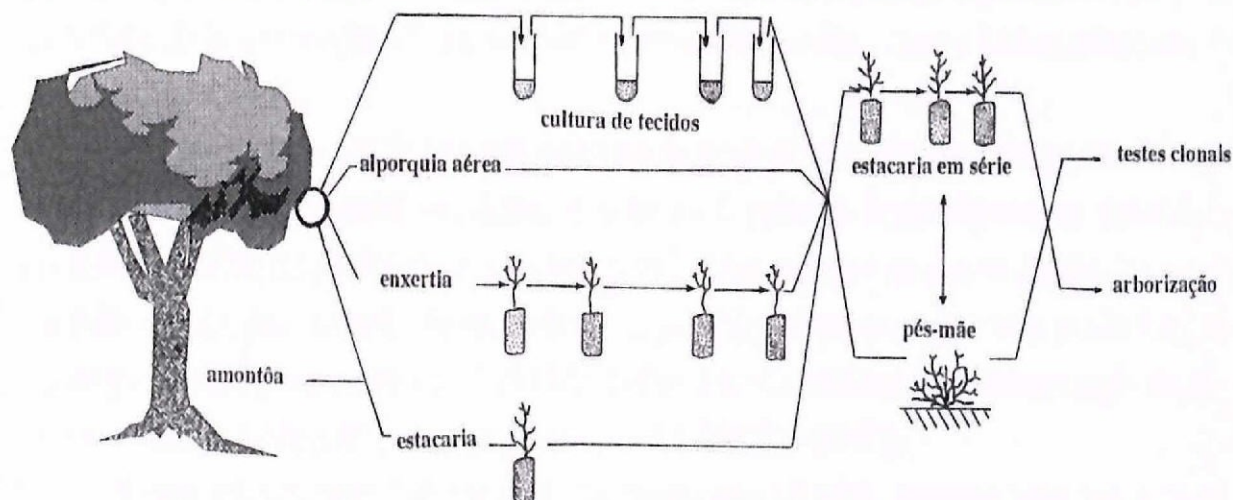


Fig. 1.9 - Técnicas de clonagem para espécies florestais, passíveis de serem aplicadas à espécie *Quercus suber* L. (Adaptado de MONTEUUIS, 1984)

1.2.4. Estratégia de melhoramento para o sobreiro

O principal objectivo associado ao melhoramento genético do sobreiro continua a ser o aumento da produção da cortiça quer em quantidade quer em qualidade. Numa publicação de 1934, NATIVIDADE referia ser urgente atingir esse objectivo: *...a simples escolha para reprodução de landes provenientes de sobreiros produtores de boa cortiça, não oferece qualquer garantia de êxito, antes se pode considerar um trabalho estéril. Esse facto deve-se à intrínseca alogamia e consequente heterozigocidade do sobreiro, que leva a uma elevada diversidade da descendência. Por outro lado, e ainda segundo o mesmo autor, a influência das condições do meio na qualidade das cortiças não é tão decisiva como se poderia pensar. Assim, para as características determinantes da qualidade da cortiça: a porosidade, a espessura, as inclusões lenhificadas, e outras, em indivíduos do mesmo montado e sujeitos às mesmas condições de solo e clima, a variação surge quase de árvore para árvore.*

De acordo com um estudo feito por GRAÇA *et al.* (1985), é muito importante ter em conta os defeitos da cortiça pois a valorização do preço da cortiça amadia é função da sua qualidade. A classificação das pranchas é feita, tradicionalmente, em 6 classes de qualidade que atendem a uma série de critérios, entre os quais a porosidade exposta é o mais importante. O outro factor a ter em conta para o preço na fábrica é a espessura da cortiça. O calibre mais valorizado é o de 12 a 14 linhas⁴, pois é o calibre por excelência para o fabrico de rolhas. A componente rolheira da indústria corticeira é aquela que contribui com a parte mais significativa da mais valia desse sector.

Para atender a estas exigências é necessário dispor de plantas para arborização com um potencial genético que seja adequado e que possam reunir os seguintes aspectos: i) cortiça de qualidade, ii) boa produção, iii) precocidade da produção, iv) fuste recto e bem conformado, v) boa condição sanitária.

Um programa de melhoramento necessita de partir de uma elevada base genética, o que nesta espécie, não constitui problema, atendendo à referida heterozigocidade natural da espécie. No entanto, é muito importante saber qual a base genética de que se dispõe. Isso pode ser feito através, por exemplo, de marcadores do tipo izoenzimático, como vem sendo feito no nosso país para o pinheiro bravo (CASTRO, 1989). Neste momento, uma metodologia usando pólen está igualmente a ser posta em prática por NÓBREGA (1992).

Como em qualquer programa de melhoramento clássico, teremos uma via a longo prazo, que deverá ser iniciada por ensaios de proveniências. A escolha destas deverá ser feita, de preferência, ao longo de toda a área de distribuição da espécie, onde serão recolhidas sementes (ver fluxograma da Fig. 1.10). Estes ensaios irão demorar muito tempo, pelo menos até se obter a primeira cortiça de regeneração, ou seja, 40 anos. Principalmente porque não se conseguiram até ao momento resultados conclusivos sobre possíveis correlações entre características interessantes da cortiça no estado adulto e no estado juvenil, o que possibilitaria a selecção de plantas jovens cuja produção futura, de cortiça amadia, fosse de qualidade (NATIVIDADE, 1934; GOMES, 1986; GRAÇA & PEREIRA, 1993). Os testes de proveniência são de primordial importância, pois tornam possível a determinação da variabilidade inter-proveniências. Eles possibilitam a captura de um ganho adicional pela introdução de novos genótipos, testados em pomares de semente de 1ª e 2ª geração, reduzindo também os riscos da perda de variabilidade

Na via a curto prazo, poder-se-ão seleccionar áreas de montado extreme, cuja produção de cortiça em qualidade e quantidade seja acima da média e onde a maioria dos sobreiros reúna essas características, sem ataques de pragas e doenças e com boa conformação de tronco e copa. Essas áreas poderão constituir aquilo que se designa por áreas produtoras de

⁴ Cada linha tem 2,25 cm.

semente (*APS*), onde será recolhida semente para prover às necessidades imediatas de produção de plantas. O ganho genético obtido será, no entanto, pouco significativo.

Em simultâneo, serão seleccionadas árvores superiores, com base no seu fenótipo e por comparação com 3 árvores testemunha, como aconselha VALDECANTOS (1992). As características a ter em conta de acordo com vários autores (GOMES, 1989; VALDECANTOS, 1992), incluem:

- i) Produção de cortiça em quantidade e de boa qualidade (sem excesso de porosidade, sem inclusão de tecidos lenhificados, com espessura suficiente e outros).
- ii) Fuste alto, recto e limpo de ramos baixos.
- iii) Ausência de ataque de pragas e doenças.

Poderá utilizar-se a enxertia, com garfos provenientes das árvores seleccionadas, para constituir pomares produtores de semente de 1ª geração. Também se poderão instalar pés-mãe, através de cultura de tecidos (ROMANO *et al.*, 1992) ou, se possível, por estacaria. Com base nos pés-mãe e utilizando métodos de reversão da maturação, p.e. a estacaria em série, poderá ser tentada a produção de plantas para arborização, o que permite capturar toda a variância genotípica num curto espaço de tempo.

A superioridade das árvores seleccionadas, reunidas no pomar de sementes, só será confirmada através de ensaios de descendência da semente que, originada por polinização livre no pomar, indicará a sua aptidão geral à combinação; essa informação só estará disponível dentro de 60 a 70 anos. Mas, se for possível antecipar o período de floração das árvores do pomar e a idade da desboia das plantas dos ensaios de descendência, a duração destes ensaios poderá ser significativamente encurtada.

A semente, obtida no pomar de sementes de 1ª geração, para além de ser usada para arborização, poderá também ser utilizada para produzir pés-mãe jovens. Aproveitando a intensa e fácil rebentação de touça desta espécie, aqueles poderão ser propagados vegetativamente por estacaria. As plantas resultantes deste processo serão utilizadas na arborização, conseguindo-se deste modo aumentar o número de plantas produzidas pelo pomar de sementes o que, sem este artifício, seria muito mais reduzido. Esta metodologia tem sido empregue com sucesso noutras espécies, como *Pinus radiata* D.Don. (LIBBY *et al.*, 1972), *Eucalyptus* spp. (ZOBEL & IKEMORI, 1983), etc.

Após o resultado dos ensaios de descendência poderá proceder-se a desbastes no pomar de sementes de 1ª geração e ainda a polinizações controladas. As sementes resultantes deste último processo, que são em número muito reduzido, poderão ser submetidas ao procedimento acima descrito de produção de pés-mãe e sua multiplicação, por via vegetativa, para arborização.

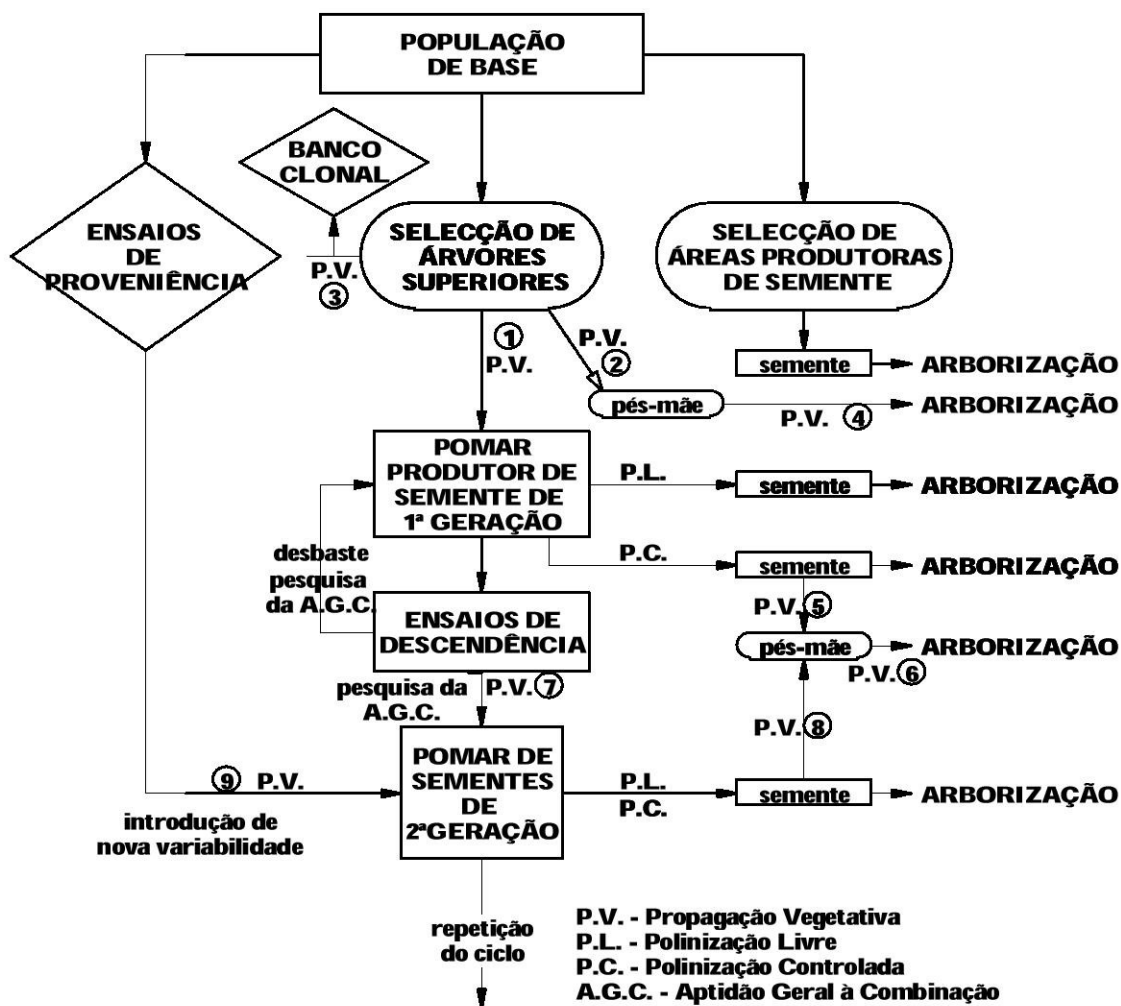


Fig. 1.10 - Fluxograma de um possível programa operacional de melhoramento genético da espécie *Quercus suber* L. (PV-propagação vegetativa; PL-polinização livre; PC-polinização controlada; AGC-aptidão geral à combinação).

A partir do resultado dos testes de descendência é possível constituir pomares de semente de 2ª geração, com a eventual introdução de novos genótipos, confirmados pelos ensaios de proveniências. Conheceremos então o verdadeiro valor genotípico das árvores, sendo a semente resultante da polinização livre do pomar de sementes de elevada qualidade genética o que pode possibilitar um ganho genético significativo.

O ciclo poderá repetir-se, se deva ter em atenção a redução da base genética que ocorre e os perigos da consanguinidade, com a consequente quebra de vigor. Por essa razão todos os genótipos deverão ser guardados em bancos clonais, por via vegetativa.

No fluxograma da Figura 1.10 estão sintetizadas as interrelações possíveis num programa de melhoramento genético para esta espécie, dando-se particular ênfase à utilização da via vegetativa ao longo de todo o processo (os asteriscos ligados às setas realçam a utilização dessa via); as caixas de bordos redondos revelam uma diminuição de variabilidade, enquanto as caixas de bordos losangulares indicam uma manutenção ou acréscimo de variabilidade.

1.2.5. A propagação vegetativa no sobreiro

A propagação vegetativa pode, como vimos, desempenhar um papel muito importante no desenrolar de um programa operacional de melhoramento para a espécie *Quercus suber* L. No entanto, além das condicionantes devidas à maturação das árvores, surgem outras provocadas pelas dificuldades inerentes às diferentes técnicas de propagação vegetativa. Esses vários processos incluem: i) a mergulhia, ii) a amontôa, iii) a alporquia aérea, iv) a enxertia, v) a estacaria e vi) a cultura de tecidos.

Tabela 1.2 - Sumário do papel no melhoramento, restrições e benefícios dos diferentes modos de propagação (Adaptado de BURDON, 1982).

Método de Propagação	Papel no melhoramento	Restrições	Benefícios
ENXERTIA	Banco clonal Pomar de sementes Estabelecimento de pés-mãe Rejuvenescimento	Incompatibilidade cavalo-garfo Custo Dificuldade na execução	Precocidade na floração Rejuvenescimento
ESTACARIA	Banco clonal Pomar de sementes Propagação massal Estabelecimento de pés-mãe Rejuvenescimento ?	Dificuldade de propagação Crescimento reduzido Plagiotropia	Menores custos Facilidade de execução
CULTURA DE TECIDOS	Estabelecimento de pés-mãe Rejuvenescimento Propagação de clones elite, híbridos e recombinantes	Custo Instabilidade genética Equipamento Dificuldade na execução Fragilidade das plantas	Rejuvenescimento Obtenção rápida de clones Eliminação de vírus Recombinação genética

Existem vantagens e desvantagens associadas a cada um destes modos de obter clones. Na Tabela 1.2 estão apresentadas as possíveis aplicações, mas também os benefícios e as restrições para os 3 últimos métodos, que são geralmente os mais usados.

O género *Quercus* em geral (DEHGAN *et al.*, 1989) e a espécie *Quercus suber* L. em particular são, de um modo geral, muito recalcitrantes à aplicação de técnicas de propagação vegetativa (NATIVIDADE, 1938).

A cultura de tecidos tem vindo a ser utilizada nesta espécie com resultados bastante promissores, sobretudo no que diz respeito à propagação de material adulto (ROMANO *et al.*; 1992). JACQUIOT (1952) obteve *callus* com cultura *in vitro* de tecido cambial. BELLAROSSA (1981) usou embriões somáticos a partir dos quais obteve rebentamento axilar. MATAOUUI & ESPAGNAC (1987) estudaram a formação de embriões somáticos. A primeira obtenção de plantas enraizadas foi feita por PARDOS (1981), a partir de segmentos nodais de plantas com 1 ano. DEIDDA *et al.* (1988) referem a obtenção de plantas a partir de gomos axilares, também provenientes de plantas jovens, com 70% de enraizamento e problemas de sobrevivência. MANZANERA & PARDOS (1990) embora indiquem a produção de plantas a partir de cultura de tecidos com base em plantas jovens e também em rebentos de touça, referem graves problemas com a sua sobrevivência. ROMANO & MARTINS-LOUÇÃO (1992) obtiveram 54% de enraizamento a partir gomos axilares e terminais de ramos de árvores adultas. ROMANO *et al.* (1992) com o mesmo tipo de material, e apesar de terem obtido melhores percentagens de enraizamento (90%), referem dificuldades na aclimação, com 58% de sobrevivência. GONÇALVES & RAINHO num trabalho apresentado em 1992, utilizando material jovem, indicam elevadas percentagens de enraizamento mas igualmente graves problemas de aclimação. Os mesmos autores (1993), conseguiram melhores resultados na sobrevivência (73%), com o mesmo tipo de material. GUIJARRO *et al.* (1993) estabeleceram um protocolo para a regeneração do sobreiro via embriogénese somática.

Pensamos ser a cultura de tecidos muito interessante como método para mobilizar a planta dadora visto que poderá permitir o estabelecimento de pés-mãe, se for bem sucedida ao nível do rejuvenescimento; no entanto, não nos parece tão indicado para a produção massal de bons fenótipos.

NATIVIDADE refere, numa publicação de 1938, que *a enxertia, o método mais fácil e seguro nesta espécie rebelde ao enraizamento, é uma solução precária. De facto, o efeito do cavalo poderá ter consequências na produção da cortiça e, além disso, é um processo moroso e de difícil aplicação em larga escala. Indica duas enxertias que foram aplicadas com sucesso, a de borbulha e a de coroa. Posteriormente, foram realizados ensaios com enxertias homo e heteroblásticas utilizando as mesmas metodologias com o objectivo de obter pés-mãe com base em árvores boas produtoras de cortiça (CORREIA, 1981; MARQUES & REIS, 1987; ROLDÃO *et al.*, 1992). Não sendo esta uma técnica adequada à produção comercial de génotipos melhorados pode, no entanto, ser muito vantajosa para o estabelecimento de pomares de sementes, além de permitir a mobilização da planta dadora e o seu rejuvenescimento, com vista à aplicação ulterior de outros métodos mais expeditos.*

A alporquia aérea e a mergulhia são processos cujo uso nunca será muito alargado. No entanto, a amontôa pode vir a ser usada na mobilização da planta dadora, atendendo à facilidade de rebentação de touça do sobreiro, tal como sucede com o castanheiro.

A estacaria parece ser o método mais adequado à produção massal por ser o mais rápido e económico; no entanto, no sobreiro o seu emprego está fortemente condicionado por um melhor domínio do ambiente e condições específicas do enraizamento.

O pioneiro no emprego da estacaria a esta espécie foi NATIVIDADE (1938), que se refere a este processo de propagação como o que lhe mereceu mais interesse, do ponto de vista de propagação massal e ao qual se dedicou durante largos anos. Durante os primeiros cinco anos de ensaios obteve uma só planta enraizada e com uma só raiz. Com a propagação de rebentos de touça estiolados por amontôa do terço basal, conseguiu inicialmente percentagens de enraizamento muito baixas (5%). A aplicação de um anel de arame sobre a casca, próximo da base do rebento, aumentou para 56% a percentagem de enraizamento. NATIVIDADE (1950) indica ainda que a propagação por amontôa poderá constituir o ponto de partida para o clone. O autor experimentou também, mas sem êxito, a aplicação de reguladores de crescimento do tipo AIB e ANA. CORREIA (1954) dedicou-se à propagação vegetativa de rebentos estiolados com aplicação de reguladores de crescimento. Embora tenha verificado um efeito positivo no enraizamento, os resultados não foram muito conclusivos.

Posteriormente poucos ensaios foram feitos sobre estacaria de sobreiro. Podemos referir ROLDÃO (1987), que utilizou estacas retiradas do terço médio da copa e aplicou um regulador de crescimento, o AIB. Os resultados, neste caso, também foram pouco conclusivos. A mesma autora, num artigo publicado em 1990, refere ensaios realizados com estacas retiradas de plantas jovens, em que a aplicação de uma temperatura de 28°C à base da estaca teve um efeito positivo no enraizamento, que atingiu 50% quando as estacas foram postas a enraizar em pleno Verão. ROMANO *et al.*(1992) observaram que o material adulto posto a enraizar não era reactivo e que as estacas provenientes de plantas jovens não ultrapassavam 25% de enraizamento.

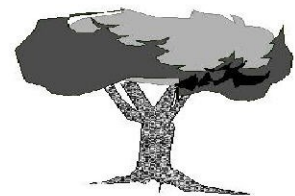
DREW & DIRR (1989) utilizando estacas de diversos carvalhos, provenientes de plantas com 3 anos e usando uma solução de AIB a 1%, concluíram ser a espécie *Quercus suber* L. aquela que originava uma percentagem de enraizamento mais baixa (2%), juntamente com a *Quercus alba* L.

1.2.6. Objectivos do trabalho

O principal objectivo do presente trabalho consiste em procurar esclarecer algumas das condicionantes para a estacaria nesta espécie com a consequente obtenção de boas percentagens de enraizamento e produção de plantas com boa qualidade fisiológica que possam ser plantadas e utilizadas num programa de melhoramento para esta espécie, para o qual a utilização da propagação vegetativa é imprescindível, como vimos (secção 1.2.4.).

Utilizamos plantas jovens como modelo pela maior facilidade na sua manipulação e pela escassez de estudos sobre o enraizamento nesta espécie. Os factores que pretendemos estudar foram a capacidade de enraizamento ao longo do tempo e a sobrevivência das estacas enraizadas, para além da quantidade e qualidade do enraizamento. Para isso, submetemos as estacas a diferentes tratamentos: aplicação de auxinas (AIB e ANA), descasque da base da estaca e pré-tratamentos dos pés-mãe (escurecimento com ou sem aplicação de AIB e número de dias às escuras-estiolamento). Para alguns tratamentos - aplicação de AIB às estacas antes de serem postas a enraizar e escurecimento prévio da planta com ou sem aplicação de AIB - o processo rizogénico foi acompanhado através de cortes histológicos de modo a observar o efeito dos tratamentos ao nível anatómico.

2. MATERIAL E MÉTODOS



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Em todos os ensaios efectuados foram utilizadas plantas jovens de sobreiro obtidas a partir de semente germinada em estufa imediatamente após a sua colheita da árvore. Embora em cada ensaio se tenham usado plantas provenientes de bolotas colhidas na mesma árvore, para cada ano, usou-se uma proveniência (árvore) diferente. A primeira árvore, referente aos ensaios de 1992, está situada na herdade da Talefa, no concelho de Alter do Chão (latitude 39°16'30"e longitude 7°54'00"). A segunda árvore, usada em 1993, encontra-se no concelho de Castelo Branco, freguesia de Lentiscais (latitude 39°44'40"e longitude 7°26'00").

Após a germinação seleccionaram-se as plantas-mãe a utilizar nos ensaios, com base no seu desenvolvimento fisiológico, independentemente das datas de início, devido aos diferentes tempos de germinação desta espécie. Assim, as plantas utilizadas tinham cerca de 14-15 cm de altura (ver Fig. 2.1).

2.2. ENSAIOS DE ENRAIZAMENTO

2.2.1. Caracterização dos ensaios

Os ensaios foram realizados durante dois anos consecutivos cuja calendarização, proveniência de semente, designação e numeração dos ensaios, para maior comodidade, podemos observar na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Especificação dos ensaios realizados, designação, calendarização e proveniência da semente.

nºensaio	designação	sementeira	início do ensaio	proveniência
1	AIB	03/12/91	24/04/92	Talefa
2	Dias no escuro (estiolamento)	03/12/91	30/06/92	Talefa
	Estimulação dos gomos axilares	03/12/91	12/01/93	Talefa
3	Escurecimento (da base)	24/11/92	13/04/93	Lentiscais

2.2.1.1. Primeiro ensaio

Neste ensaio foram preparadas duas estacas por cada planta dadora, uma do topo outra da base (Fig. 2.2). Nos tratamentos em que se retirou a casca do centímetro basal da estaca, essa operação foi feita com um *x-ato* por forma a não danificar o câmbio (Fig. 2.3).

As estacas, depois de preparadas foram imersas numa solução anti-fúngica - benomil (*Benlate*) - a 6% (Fig. 2.5). Neste ensaio a duração da imersão foi de 10 minutos [Devido à resistência que o material vegetal apresentou à infecção, a duração da imersão foi encurtada para 5 minutos, o que permitiu diminuir o tempo de montagem dos ensaios e aumentar o nº de estacas por repetição e o nº de repetições, nos ensaios seguintes (Tab. 2.3)]. Após esta operação, aplicou-se AIB em pó nas concentrações de 0 (testemunha), 0,5, 1 e 2%.

2.2.1.2. Segundo ensaio

Neste ensaio, as plantas-mãe foram postas no escuro, com excepção das testemunhas, durante 2, 4 e 8 dias, antes da preparação das estacas. As estacas, de topo e da base, foram todas descascadas pela forma descrita no parágrafo anterior. A aplicação de AIB, também em pó, foi feita nas concentrações de 0 (testemunha), 0,5 e 1%.

Com as estacas enraizadas no decurso deste ensaio e que entraram em dormência realizou-se um sub-ensaio com o objectivo de estimular o abrolhamento dos gomos axilares. Procedeu-se à pulverização da parte aérea da estaca com uma solução de citocinina, 6-benzilaminopurina (BAP), 100 mg l⁻¹. A solução foi preparada dissolvendo, previamente, 10 mg de BAP em 0,3 ml de HCl 1 N. As estacas encontravam-se em estufa e só foram utilizadas no ensaio aquelas que não tinham, entretanto, formado rebentos. Contou-se o número de verticilos em cada estaca e dividiu-se a totalidade das estacas em dois lotes iguais: num, testemunha, as estacas não foram pulverizadas e no outro foram pulverizadas duas vezes, em duas semanas consecutivas.

2.2.1.3. Terceiro ensaio

Neste ensaio, as plantas-mãe foram submetidas a uma técnica de escurecimento conhecida por *blanching* (MAYNARD & BASSUK, 1986), que consiste no envolvimento da parte do caule que será a futura base da estaca por uma banda preta. Neste caso foi utilizada uma fita de PVC, com 19 mm de largura. Antes da colocação da fita, enrolou-se *Parafilm* em volta dessa zona do caule, para evitar uma possível influência da cola que a fita de PVC contém. A aplicação da fita preta permite, muito facilmente, a aplicação da auxina no local escolhido para futura base da estaca. Em muitos casos, este procedimento provou ser mais efectivo na estimulação do enraizamento em espécies recalcitrantes, do que a própria aplicação de auxina imediatamente antes da estaca ser posta a enraizar (HOWARD & HARRISON-MURRAY, 1985). No tratamento que incluiu a aplicação de AIB em pó na concentração de 0,5%, o *Parafilm* foi previamente pincelado com o regulador de crescimento.

Só se utilizaram as estacas de topo e, após o escurecimento, nos tratamentos em que se retirou a casca do centímetro basal da estaca, essa operação foi feita da mesma forma referida para o primeiro ensaio. Antes das estacas serem postas a enraizar e após a imersão na solução anti-fúngica, aplicaram-se as diferentes auxinas em pó à base das estacas: 0,5% AIB e 0,1% ANA.

2.2.2. Preparação das estacas

As estacas, com cerca de 7 cm, após terem sido retiradas da planta mãe foram sujeitas a um corte na base, em bisel, e cada uma ficou com pelo menos dois pares de folhas, para facilitar a sua colocação no local de enraizamento (Fig. 2.4).

Como suporte do enraizamento foi utilizado um saco denominado *Melfert*, que depois de acondicionado com o substrato apropriado foi enrolado à volta da base da estaca (FRANCLET, 1981). A grande vantagem deste saco de enraizamento é permitir a realização de várias leituras ao longo do tempo. Cada saco foi cheio com 400 cm³ de substrato, uma mistura de perlite (*Europert*) e turfa (*TDK*), nas proporções de 3:1. À mistura juntaram-se 2 gr de *Osmocote Plus* por saco, um adubo de acção retardante.



Fig. 2.1 - Planta-tipo utilizada nos ensaios.



Fig. 2.2 - Corte de uma estaca de topo

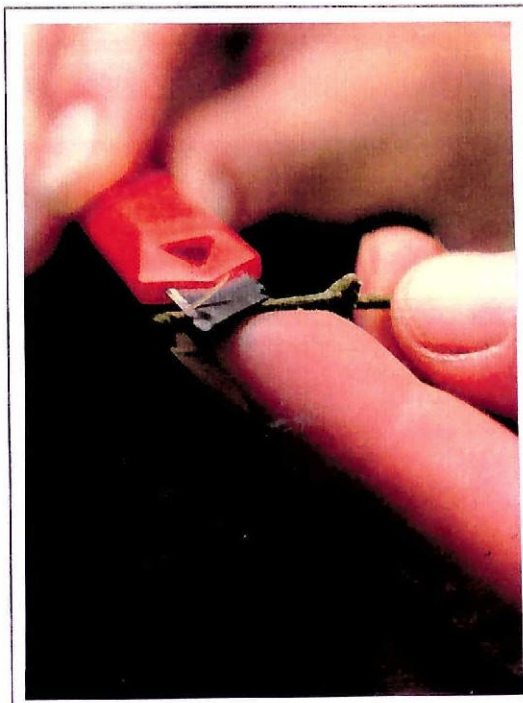


Fig. 2.3 - Descasque da casca da base da estaca com um *x-ato*.

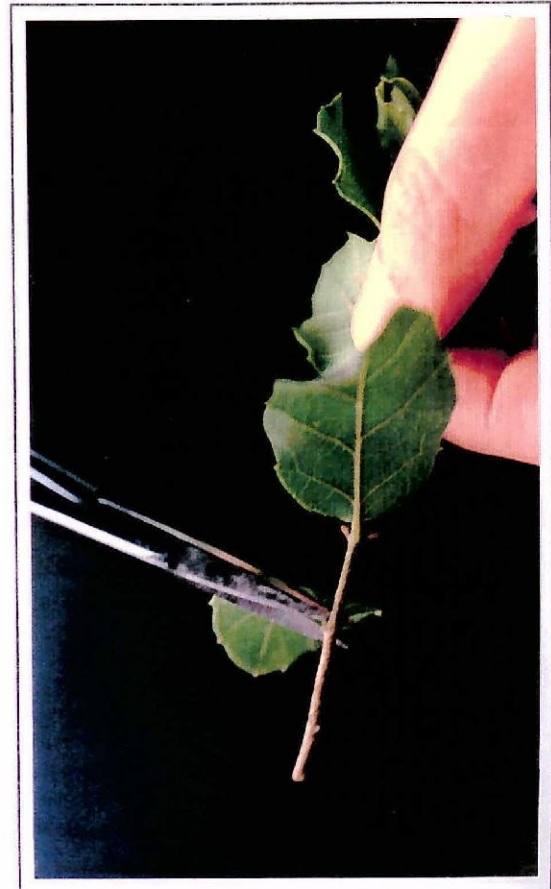


Fig. 2.4 - Corte de uma folha na estaca.

Nos tratamentos em que se aplicou um regulador de crescimento do tipo auxínico, este foi aplicado em pó à base da estaca, na concentração devida, imediatamente antes desta ser enrolada no saco de enraizamento (Tab. 2.2).

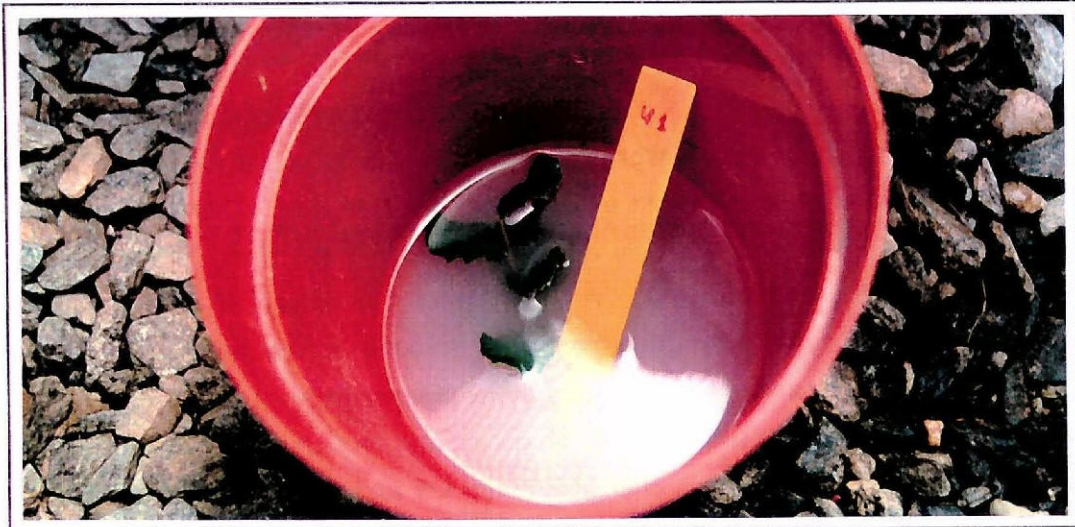


Fig. 2.5 - Imersão da estaca em *Benlate* a 6%



Fig. 2.6 - Estaca a ser enrolada no saco *Melfert*.

2.2.3. Condições de enraizamento

Após terem sido enroladas no saco *Melfert* (Fig. 2.6), as estacas foram etiquetadas e colocadas, no tabuleiro de enraizamento. A casualização dos lugares ocupados pelas estacas foi efectuada em computador, com uma *macro* que gerava números aleatórios.

Os tabuleiros foram colocados na bancada de uma estufa equipada com rega automática por nebulização, *cooling*, aquecimento das bancada e rede de sombreamento. No entanto, procedeu-se a uma translação semanal na posição dos tabuleiros na bancada, para limitar o erro experimental dos ensaios, causado por possíveis gradientes de humidade e temperatura.

A bancada aquecida a 28°C (ROLDÃO, 1990) através de um sistema de resistências eléctricas, foi forrada a gravilha previamente lavada.

A rega foi adaptada às condições ambientais prevalentes no decurso dos ensaios. No início de cada ensaio a duração e o intervalo entre regas, foi de 6 minutos e 20 minutos, respectivamente. A partir dos primeiros 15 dias, o intervalo da rega foi aumentado e a sua duração diminuída. A humidade e temperatura diárias dentro da estufa, medidas por um termohigrógrafo, foram sempre tidas em consideração em relação às alterações a efectuar na rega, de modo a que os ajustamentos feitos permitissem a manutenção de uma humidade elevada ao nível das folhas, mas sem riscos de apodrecimento e de ataques de fungos. O aumento da temperatura da estufa era controlado pelo sistema de *cooling* que entrava em funcionamento a partir dos 25°C e que arrefecia o ar por calor latente, com o consequente aumento da humidade relativa.

As estacas foram pulverizadas, semanalmente, com uma solução anti-fúngica, cujo princípio activo variava, de forma a evitar uma possível habituação ao tratamento preventivo.

2.2.4. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado nos ensaios de enraizamento foi completamente casualizado e trifactorial, utilizando o modelo fixo. Na Tabela 2.2 podemos observar os tratamentos efectuados para cada factor, em cada ensaio.

O número total de estacas utilizado por ensaio, variou de acordo com a disponibilidade de plantas e, sempre que possível aumentava-se o número de repetições e o número de estacas por repetição (Tab. 2.3). Os ensaios foram encadeados por forma a poderem ser comparados os resultados, ainda que parcialmente (Tab. 2.2).

Para cada ensaio foram anotados os seguintes parâmetros:

- i) número de estacas vivas (V),
- ii) número de estacas mortas (M)

iii) número de estacas com *callus*⁵ (C)

iv) número de estacas sobreviventes (S)

v) número de raízes, por estaca enraizada (NR)

vi) comprimento da maior raiz, por estaca enraizada, em mm (CMR).

Tabela 2.2 - Especificação dos diferentes tratamentos efectuados, por factor, nos ensaios de enraizamento

nº ensaio	1º factor	2º factor	3º factor
1	concentração de AIB	origem da estaca	cm basal da estaca
	0 %	base da planta	inteira
	0,5 %	topo da planta	sem casca
	1,0 %		
	2,0 %		
2	nº de dias às escuras	origem da estaca	concentração de AIB
	0	base da planta	0 %
	2	topo da planta	0,5 %
	4		1,0 %
	8		
3	escurecimento	cm basal da estaca	diferentes auxinas
	banda preta+0,5%AIB	inteira	sem auxina
	banda preta sem auxina	sem casca	AIB 0,5%
	sem banda preta		ANA 0,1%

Tabela 2.3 - Caracterização dos diferentes factores utilizados nos ensaios de enraizamento, nº de tratamentos, nº de estacas por tratamento, nº de repetições e nº de estacas por repetição.

nº ensaio	caracterização dos factores	nº de tratamentos por factor	nº de estacas por tratamento	nº de repetições	nº de estacas por repetição
1	1º concentração de AIB	4			
	2º origem da estaca	2	12	3	4
	3º descasque do cm basal da estaca	2			
total		16 (4x2x2)	192 (4x2x2x12)		
2	1º número de dias às escuras	4			
	2º origem da estaca	2	15	3	5
	3º concentração de AIB	3			
total		24 (4x2x3)	360 (4x2x3x15)		
3	1º escurecimento e AIB	3			
	2º descasque do cm basal da estaca	2	25	5	5
	3º diferentes auxinas	3			
total		18 (3x2x3)	450 (3x2x3x25)		

⁵ Consideravam-se estacas com *callus* aquelas que por observação exterior apresentavam uma massa esbranquiçada na base da estaca

Para se fazerem as leituras dos resultados desenrolaram-se os sacos *Melfert* com muito cuidado e voltaram a enrolar-se, após o que foram imersos em água, para fazer aderir bem os bordos. Os resultados poderão ter sido afectados por esse procedimento, mas como o foram todos da mesma forma isso poderá conduzir, provavelmente, a uma subavaliação dos mesmos, principalmente os parâmetros NR e CMR.

Em cada ensaio anotaram-se os parâmetros V, M, C, NR e CMR ao fim de um mês e dois meses. Três meses após a montagem dos ensaios anotou-se o número de estacas mortas (M), com *callus* (C) e enraizadas (R). Após três meses do seu início, os ensaios foram considerados terminados e as estacas enraizadas foram plantadas, juntamente com o contentor em sacos de plástico que foram cheios com terra. Ao fim de cinco meses foi avaliada a sobrevivência (S).

O tratamento estatístico dos resultados foi feito no programa STATGRAPHICS versão 6,0. Utilizou-se o modelo fixo de análise de variância, trifactorial:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Sendo Y_{ijkl} o valor observado, μ a média da população, α_i , β_j e γ_k os efeitos principais dos três factores A, B e C, $(\alpha\beta)_{ij}$, $(\alpha\gamma)_{ik}$ e $(\beta\gamma)_{jk}$ as interacções dos factores dois a dois, a interacção dos três factores $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ e ε_{ijkl} o desvio residual (DAGNELIE, 1973; SOKAL & ROHLF, 1981). A comparação múltipla de médias foi feita através do teste de DUNCAN, com uma probabilidade máxima de erro do tipo I de 5% (STEELL & TORRIE, 1981).

As análise das interacções foi efectuada pela comparação múltipla de médias LSD, também com uma probabilidade máxima de erro do tipo I de 5% (STEELL & TORRIE, 1981).

A mortalidade das estacas em relação ao total de estacas postas a enraizar, ao fim de cinco meses, nos três ensaios de enraizamento, foi avaliada pelo teste do qui-quadrado, com um nível de significância de 0,1%, independentemente dos tratamentos efectuados.

Para o sub-ensaio de estimulação de gomos axilares, fez-se a primeira leitura um mês após a última pulverização e a segunda leitura dois meses depois, tendo sido anotados o nº de gomos formados em todas as estacas dos dois lotes, para além do número de estacas mortas.

Efectuou-se o teste t de Student para a comparação das médias das duas amostras, com um nível de significância de 0,1% (SOKAL & ROHLF, 1981) para o número de gomos formados e também para o índice $ig = \text{número de gomos abrolhados/número de verticilos}$, por estaca enraizada, para a primeira e para a segunda leitura.

A mortalidade das estacas, verificada neste sub-ensaio, também foi avaliada pelo teste do qui-quadrado, com um nível de significância de 0,1%.

2.3. ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PROCESSO RIZOGÉNICO

2.3.1. Colheita do material

De 120 plantas diferentes, retiraram-se estacas, que foram postas a enraizar com o objectivo de se recolherem amostras para acompanhamento do processo rizogénico ao longo

Tabela 2.4 - Tratamentos efectuados ao material que forneceu as amostras para os cortes histológicos

1º factor	2º factor
escurecimento	concentração de AIB
banda preta +0,5 % AIB	0 %
banda preta sem auxina	0,5 %
sem banda preta	

do tempo. As plantas-mãe foram submetidas à técnica do escurecimento, de acordo com a metodologia especificada em 2.2.1.3. Utilizou-se um esquema bifactorial, a que se refere a Tabela 2.4, e as estacas foram preparadas de acordo com a técnica descrita na secção 2.2.2.

Depois das estacas terem sido postas a enraizar foram realizadas seis colheitas de material ao longo do mês que se seguiu. A sua calendarização e o número de estacas retiradas em cada um dos seis tratamentos pode ser observada na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Calendarização da colheita das estacas e número de estacas por tratamento.

nº colheita	tempo (dias)	nº de amostras por tratamento
0	0	4
2	3	4
3	6	3
4	10	3
5	14	3
6	20	3

Na primeira colheita não se retiraram estacas do tratamento de aplicação de AIB em pó, pois essa era a colheita testemunha. Recolheu-se o centímetro basal de cada estaca, que foi lavado em água destilada após o que se cortou, com um *x-ato*, em duas amostras de 5 mm.

2.3.2. Técnicas histológicas

As amostras foram colocadas num fixador, a solução de Navashin's modificada (JENSEN, 1962), durante pelo menos 24 horas, após o que foram lavadas em água durante o mesmo período de tempo. Foram incluídas em polietilenoglicol 1500 D.P. (*Carbowax*), primeiro numa solução a 20%, durante 24 horas a 60°C, depois em duas mudas de meio de inclusão puro de 12 horas cada. Fizeram-se os moldes deixando arrefecer o meio de inclusão, com as amostras, em recipientes apropriados.

Os cortes, de 10 µm de espessura, foram obtidos com um micrótomo deslizante *Reichert*. Os moldes após serem desbastados foram colados no suporte do micrótomo. Utilizou-se uma fita gomada (*Tesa film 106/4106*) para manter o corte íntegro e que foi posta em contacto com a superfície a cortar. A fita com os cortes foi lavada em água para retirar o meio de inclusão após o que foi colada à lâmina com glicerina gelatinada do Kaizer. As lâminas eram apertadas com uma pinça e colocadas durante 24 horas numa estufa a 40°C.

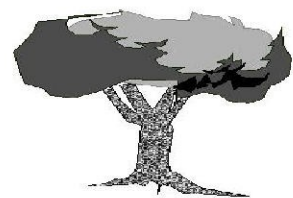
O método de coloração utilizado incluiu o uso de 3 corantes: a Crisoidina, a Pironina Y e o Astra Blau.

Antes de se efectuar a coloração, retirou-se a fita gomada, colocando-se os cortes em xilol, durante pelo menos 45 minutos. Estes, deixaram-se secar ao ar e passaram-se, posteriormente por etanol a 100%, durante um minuto, seguido de passagem rápida na mesma substância. Os cortes foram depois rehidratados em etanol a 50%, durante um minuto e passagem rápida. Por fim ficaram em água destilada, durante o mesmo tempo, também seguido de passagem rápida, antes de serem imersos numa solução aquosa a 0,5% de Crisoidina/Pironina Y. O tempo óptimo neste corante foi de 6 minutos, passando-se seguidamente por água destilada antes de serem contracorados com uma solução aquosa a 1% de Astra Blau, durante 7 minutos. Desidrataram-se os cortes antes da montagem com *Euparal verde* efectuando as passagens inversas em etanol a 50 e a 100%.

2.3.3. Observações e microfotografias

As observações foram efectuadas num microscópio *Ceti*. Usaram-se objectivas de 5x a 40x e ocular de 10x. As microfotografias foram realizadas num microscópio óptico *Nikon Microphot* equipado com luz transmitada. As películas utilizadas foram diapositivos de grão fino para luz de tungsténio *Ektachrome 64T*.

3. RESULTADOS



3. RESULTADOS

3.1. ENSAIOS DE ENRAIZAMENTO

3.1.1. Resultados individuais para cada ensaio⁶

3.1.1.1. Resultados do primeiro ensaio

No primeiro ensaio, como se referiu no capítulo anterior, efectuaram-se diferentes tratamentos às estacas, cujos resultados relativamente aos vários parâmetros avaliados podemos observar nas Tabelas 3.1 e 3.2. Nestas tabelas, como em todas as outras apresentadas neste capítulo, os números com as mesmas letras, não são significativos de acordo com o teste de comparação de médias.

Relativamente à percentagem de enraizamento, verificou-se haver uma resposta significativa à aplicação de ácido indolbutírico (AIB) na base da estaca, resposta que se tornou muito significativa na leitura que se efectuou ao fim de dois meses ($P \leq 0,01$). Já as concentrações de 0,5 e 1% de AIB, com 54 e 52% de estacas enraizadas ao fim de três meses, não foram significativamente diferentes entre si e foram ainda as que originam melhores resultados, sucedendo o mesmo na fase de aclimação, ao fim de 5 meses, em que a percentagem de plantas enraizadas, baixou um pouco, para 48 e 50%, respectivamente. A

⁶O Anexo 1 contém toda a informação relevante, resultante da análise estatística dos dados - análises de variância.

aplicação de 2% de AIB e a testemunha também não diferiram entre si, relativamente ao número de estacas enraizadas, ao longo do tempo (Tab. 3.1).

Tabela 3.1 - Efeitos da concentração de AIB, da origem da estaca e de retirar a casca na % de enraizamento (R), de formação de **callus** (C) e de estacas mortas (M) ao fim de 1 mês, 2 meses e 3 meses e na % de sobrevivência (S), aos 5 meses, para o primeiro ensaio.

Tratamento	1 mês			2 meses			3 meses			5 meses
	R%	C%	M%	R%	C%	M%	R%	C%	M%	S%
0	4 b	77	0	10 b	65 a	17	21 b	43 a	36	19 b
0.5	15 ab	65	4	40 a	42 b	15	54 a	17 b	29	48 a
1	21 a	63	4	25 ab	56 ab	17	52 a	23 b	25	50 a
2	4 b	60	13	19 b	46 b	25	38 ab	18 b	44	29 ab
signif.	*	ns	ns	**	*	ns	*	*	ns	*
Origem										
topo	10	56 b	9	24	44 b	24 a	38	23	39	32
base	11	76 a	1	23	60 a	13 b	45	27	28	41
signif.	ns	**	ns	ns	**	*	ns	ns	ns	ns
Casca										
inteira	4 b	66	7	17 b	52	23	35	24	41 a	32
retirada	18 a	67	3	30 a	52	14	47	27	26 b	41
signif.	**	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	ns

(** P≤0.01; * P≤0.05, ns - não significativo).

As estacas formaram entre 2 e 3,3 raízes, em média, ao fim de um mês e passaram a ter 3,4 a 5,2, em média, ao fim de dois meses, no tratamento em que se aplicaram diferentes

Tabela 3.2 - Efeitos da concentração de AIB, da origem da estaca e de retirar a casca, no nº médio de raízes (NR) e no comprimento médio da maior raiz, em mm (CMR), por estaca enraizada, ao fim de 1 mês e 2 meses, para o primeiro ensaio.

Tratamento	1 mês			2 meses		
	n	NR	CMR	n	NR	CMR
0	2	3,2	9,5	5	3,5	14,3 b
0.5	7	3,3	11,4	20	5,2	71,4 a
1	7	2,5	6,1	12	3,4	45,7 ab
2	2	2,0	4,0	9	3,9	20,4 ab
signif.		ns	ns		ns	*
Origem						
topo	8	1,8	4,7	23	3,9	35,1
base	10	3,7	10,8	23	4,0	40,8
signif.		ns	ns		ns	ns
Casca						
inteira	4	2,5	10,3	17	3,0	21,5 b
retirada	14	3,0	5,2	29	5,0	54,4 a
signif.		ns	ns		ns	*

O n é o tamanho da amostra utilizada para calcular a média (* P≤0.05, ns - não significativo).

concentrações de AIB (Tab. 3.2 e Fig.as 3.1 e 3.3). No entanto, o número médio de raízes formadas por estaca enraizada (NR), não foi influenciado pela aplicação de AIB, em qualquer concentração. O mesmo não aconteceu ao comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada, ao fim de dois meses: neste caso, a aplicação de 0,5% de AIB forneceu um resultado significativamente diferente da testemunha (P≤0,05), com 71,4 mm e 14,3 mm, respectivamente (ver Tab. 3.2).

Nenhum dos tratamentos com AIB preveniu a mortalidade das estacas durante o processo de

enraizamento nos três meses de ensaio, não se detectando diferenças significativas entre eles em relação à aplicação de auxina. No entanto, a aplicação de uma concentração de 2% de AIB ou a ausência de auxina, a taxa de estacas não pegadas, ao fim de 5 meses, foi de 81% e 71%, respectivamente, sendo estes valores significativamente superiores ($P \leq 0,05$) aos obtidos com os outros tratamentos.

A mortalidade das estacas foi bastante baixa no primeiro mês e variou de 4 a 13% (Tab. 3.1), sem diferenças significativas entre os tratamentos com este factor (AIB). É de salientar que a percentagem de estacas que não sobreviveram, em qualquer dos tratamentos, aumentou extraordinariamente na leitura efectuada ao fim de 5 meses, pois além de se ter em conta as estacas de facto mortas ao longo do ensaio também são contabilizadas aquelas que não morreram mas que também não formaram raízes: as estacas vivas e/ou as que formaram apenas *callus*.

Como se pode observar na Tabela 3.1, a formação de *callus* é significativamente superior ($P \leq 0,05$), ao fim de dois e de três meses após o início do ensaio, para o tratamento em que não se aplicou AIB, relativamente aos outros. Neste tratamento enraizaram menos estacas e o parâmetro mortalidade não aumentou de forma apreciável.

O 2º factor, origem da estaca (topo ou base), não influenciou a percentagem de enraizamento nem o número médio de raízes formadas ou o comprimento médio da maior raiz por estaca enraizada (Tab.^{as} 3.1 e 3.2). No entanto, a percentagem de formação de *callus* foi significativamente superior ($P \leq 0,01$) nas estacas da base em relação às estacas de topo, ao fim de 1 e de 2 meses, 76% contra 56% e 60% contra 44%, respectivamente. As estacas de topo morreram mais do que as da base, 24% e 13% ao fim de dois meses; o que pode estar relacionado com a menor fragilidade das estacas da base e com uma maior tendência de formar *callus* nestas, evitando que morram (Fig. 3.2).

Nos primeiros dois meses, o descasque do centímetro basal da estaca, teve um efeito significativo na resposta ao enraizamento (Tab. 3.1). Observou-se uma interacção entre a aplicação de AIB e o descasque da base da estaca no parâmetro percentagem de enraizamento, no primeiro mês, com a aplicação de 1% de AIB. Enraizaram, significativamente, mais estacas descascadas do que estacas íntegras, sendo 38% a percentagem de estacas enraizadas nessas condições (Anexo II - Tab. II.2). Para as outras concentrações de AIB e testemunha, não se verificou nenhuma influência positiva da retirada da casca relativamente ao enraizamento.

Na percentagem de formação de *callus* também se verificou uma interacção entre a aplicação de AIB e o descasque da base da estaca, ao fim do primeiro mês. Os tratamentos com 1% e 2% de AIB tiveram efeitos inversos sobre esse parâmetro: o primeiro diminuiu a formação de estacas com *callus* e o segundo aumentou-a, talvez devido ao aumento significativo de estacas enraizadas que a concentração de 1% de AIB provoca (Anexo II - Tab. II.1).



Fig. 3.1 - Estaca enraizada, de topo, descascada, com aplicação de 0,5% de AIB, 1 mês após o início do 1º ensaio (NR=3 e CMR=18 mm).



Fig. 3.2 - Formação de *callus* numa estaca da base, descascada e sem aplicação de AIB, 2 meses após o início do 1º ensaio.

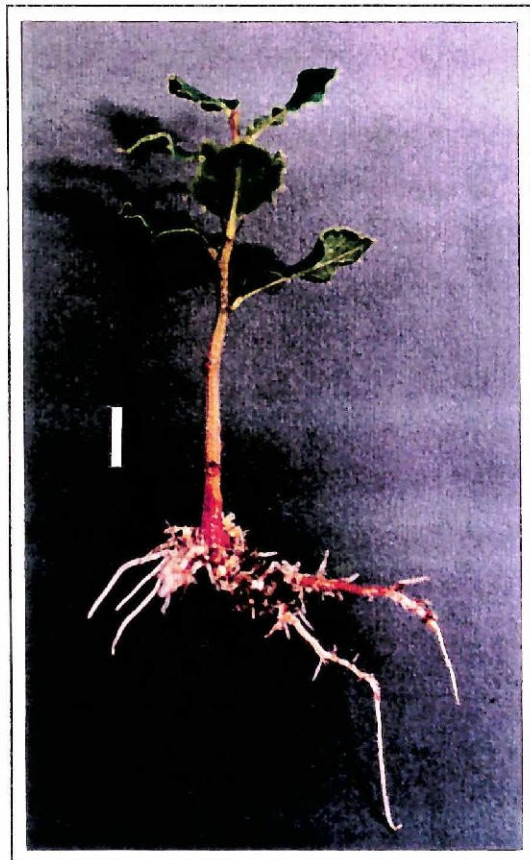


Fig. 3.3 - Estaca enraizada, de topo, descascada, com aplicação de 0,5% de AIB, 2 meses após o início do 1º ensaio (NR=10 e CMR=70 mm).



Fig. 3.4 - Estaca de topo, descascada e sem aplicação de AIB, em fase de aclimação, 5 meses após o início do 1º ensaio.

Se bem que ao fim de três meses o descasque da base da estaca não tenha favorecido o enraizamento, reduziu significativamente ($P \leq 0,05$) a percentagem de estacas mortas, de 41% para 26% (Tab. 3.1).

Este factor actuou também positivamente ($P \leq 0,05$) no comprimento médio da maior raiz por estaca enraizada, ao fim de dois meses, atingindo este parâmetro 54,4 mm quando se descascou a estaca contra 21,5 mm quando se manteve a estaca íntegra, embora não tenha tido influência no NR, por estaca enraizada, ao longo do tempo (Tab. 3.2).

Ao fim dos primeiros dois meses, observou-se uma maior percentagem de formação de *callus* nas estacas da base que não foram descascadas. Existiu uma diferença nesse parâmetro, de 35% e de 29% ao fim do primeiro e do segundo mês, respectivamente, entre as estacas da base e de topo quando a casca se manteve íntegra (Anexo II - Tab.^{as} II.3 e II.4).

O aumento na percentagem de formação de *callus* pode estar relacionado com uma menor percentagem de mortalidade e/ou uma menor percentagem de enraizamento. Assim, no material que tem menor tendência a enraizar (as estacas sujeitas ao tratamento de 2% de AIB e testemunha) formaram-se mais *callus* quando se retirou a casca.

3.1.1.2. Resultados do segundo ensaio

Nas Tabelas 3.3 e 3.4, podemos observar os resultados simples dos diferentes tratamentos e para os vários factores, segundo as anotações efectuadas durante o decurso do segundo ensaio.

Este iniciou-se cerca de dois meses mais tarde que os outros ensaios de enraizamento (ver Tab. 2.1) e não conduziu a resultados significativamente diferentes nos parâmetros %R, %M e %C, ao longo do tempo.

Convém lembrar que foi retirada a casca a todas as estacas deste ensaio, pelo que, não é totalmente comparável com os outros ensaios de enraizamento.

A aplicação de diferentes concentrações de AIB, não conduziu a resultados significativamente diferentes em relação à testemunha, como aconteceu nos outros dois ensaios (Tab.^{as} 3.1 e 3.6) sobretudo em relação à percentagem de enraizamento (Tab. 3.3).

Pode também constatar-se que a partir do 2º mês de ensaio e para o mesmo factor, enraizaram consideravelmente mais estacas no tratamento testemunha (sem aplicação de auxina), 43% contra 10 e 29% nos ensaios 1º e 3º. Estes resultados fazem supor que a altura do ano em que se realizou este ensaio (fins de Junho), provocou uma maior taxa de enraizamento, sobretudo entre o primeiro e o segundo mês (Tab. 3.3).

Tabela 3.3 - Efeitos da concentração de AIB, da origem da estaca e do número de dias às escuras, na % de enraizamento (R), de formação de **calus** (C) e de estacas mortas (M) ao fim de 1 mês, 2 meses e 3 meses e na % de sobrevivência (S), aos 5 meses, para o segundo ensaio.

Tratamento	1 mês			2 meses			3 meses			5 meses
	R%	C%	M%	R%	C%	M%	R%	C%	M%	S%
0	9	78	3	43	52	5	47	42	11	34
0.5	11	82	1	48	48	3	50	38	12	37
1	9	81	0	38	56	6	43	40	17	35
signif.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Origem										
topo	12	79	1	48	48	4	51	38	11	39
base	7	76	2	38	56	6	42	43	15	31
signif.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Escuras										
0	13	78	0	48	48	3	54	33	13	47
2	7	87	1	44	52	4	41	47	12	30
4	12	80	1	46	49	4	52	34	14	37
8	7	77	2	33	59	7	36	49	15	28
signif.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

(ns - não significativo)

A percentagem de estacas sobreviventes ao fim de 5 meses é baixa: este resultado pode ter sido devido à entrada em dormência das estacas, embora tendo continuado em estufa durante a fase de aclimação. Verificou-se ainda a ausência de formação e abrolhamento de rebentos em 77 % das estacas

Tabela 3.4 - Efeitos da concentração de AIB, da origem da estaca e do número de dias no escuro, no número médio de raízes (NR) e no comprimento médio da maior raiz, em mm (CMR), por estaca enraizada, ao fim de 1 mês e 2 meses, para o segundo ensaio.

Tratamentos	n	1 mês		2 meses		
		NR	CMR	n	NR	CMR
0	11	2,0	26,6	51	2,8	43,4 b
0.5	13	2,4	9,1	58	3,3	59,0 a
1	11	1,4	17,3	45	2,9	63,7 a
signif.		ns	ns		ns	*
Origem						
topo	22	1,8	18,8	86	3,1	59,0
base	13	2,1	16,4	68	2,8	51,7
signif.		ns	ns		ns	ns
Escuras						
0	12	1,6	15,4	43	3,1	62,9
2	6	1,5	12,9	40	2,6	47,7
4	11	1,9	18,9	41	2,9	63,1
8	6	2,7	23,3	30	3,3	47,6
signif.		ns	ns		ns	ns

O n é o tamanho da amostra utilizada para calcular a média. (* $P \leq 0.05$, ns - não significativo)

enraizadas durante este ensaio quando observadas no início de Janeiro, cerca de sete meses depois da montagem do ensaio, ao contrário das estacas enraizadas na Primavera, em que o crescimento já era notável ao fim de 5 meses, como se exemplifica na Figura 3.4.

Para o factor origem da estaca, tal como no ensaio anterior, as estacas de topo não enraizaram mais do que as da base.

O tratamento prévio das plantas-mãe às escuras,

não conduziu a resultados significativamente diferentes para qualquer dos parâmetros observados.

Podemos, através da Tabela 3.4, verificar os efeitos médios dos diferentes factores no NR e CMR, por estaca enraizada. Para ambos os parâmetros e ao fim do primeiro mês, também se não observaram diferenças significativas entre os tratamentos efectuados. No segundo mês de ensaio, o comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada foi significativamente inferior para o tratamento em que não se aplicou AIB, com 43,4 mm. Os tratamentos 0,5 e 1% de AIB, conduziram a valores CMR de 59 e 63,7 mm, respectivamente, não significativamente diferentes entre si (Tab. 3.4). Relativamente ao parâmetro NR, o factor aplicação de AIB levou ao aparecimento de 2,8 a 3,3 raízes, em média, por estaca enraizada.

3.1.1.2.1. Estimulação de gomos axilares

Neste sub-ensaio pretendeu-se estimular o abrolhamento dos gomos axilares das estacas enraizadas no decurso do segundo ensaio, pelo facto de elas terem entrado em dormência durante o Inverno. Para tal, as estacas foram pulverizadas com BAP antes do início da Primavera, como descrito em 2.2.1.2. Na Tabela 3.5 apresentam-se os resultados relativos às duas leituras efectuadas: o número de gomos abrolhados e a relação (ig) entre o nº de gomos abrolhados e o nº de verticilos, por estaca e ainda a percentagem de estacas mortas.

Tabela 3.5 - Número de gomos abrolhados, relação número de gomos abrolhados/número de verticilos (ig), por estaca enraizada e a percentagem de estacas mortas, após a aplicação de BAP, ao fim de um e dois meses.

Tratamento	nºgomos		ig		mortas	
	1 mês	2 meses	1 mês	2 meses	1 mês	2 meses
Testemunha	(54) 0,5 b	(47) 1,3 b	(54) 0,12 b	(47) 0,32 b	0	13%
BAP	(54) 2,0 a	(39) 2,8 a	(54) 0,49 a	(39) 0,67 a	0	28%
signif	***	***	***	***	-	ns

Entre parênteses encontra-se o tamanho da amostra utilizada para calcular a média (***) $P \leq 0.001$; ns - não significativo).

A aplicação de BAP aumentou o número de gomos abrolhados de 0,5 para 2 gomos, em média por estaca, um mês após a última pulverização, atingindo esse parâmetro o valor de 2,8 no segundo mês. Embora a pulverização com BAP tenha provocado mais do dobro da mortalidade dois meses depois de terminado o ensaio, verificou-se que esse resultado não diferiu do obtido com as estacas testemunha.

Pela análise do índice ig, inferimos que quando se pulverizam as estacas com BAP, ao fim de um mês, cerca de metade dos verticilos tinham gomos, contra 12% na testemunha e

após dois meses, 67% dos verticilos tinham gomos abrolhados contra 32% nas estacas que não foram pulverizadas.

3.1.1.3. Resultados do terceiro ensaio

Para o terceiro ensaio, os resultados obtidos nos vários parâmetros, podem ser observados nas Tabelas 3.6 e 3.7, que os resumem.

Tabela 3.6 - Efeitos do escurecimento (*blanching*), de retirar a casca e da aplicação de diferentes auxinas, na % de enraizamento (R), de formação de *callus* (C) e de estacas mortas (M) ao fim de 1 mês, 2 meses e 3 meses e na % de sobrevivência (S), aos 5 meses, para o terceiro ensaio.

Tratamentos	1 mês			2 meses			3 meses			5 meses
	R%	C%	M%	R%	C%	M%	R%	C%	M%	S%
Escurecimento										
Banda + AIB	9	78	2	33	51	8 b	40	38	22	39
Com Banda	11	77	1	31	51	11 b	45	35	19	45
Sem banda	6	73	3	25	46	18 a	36	34	29	35
signif.	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
Casca										
inteira	7	72 b	2	22 b	50	15 a	33 b	38	28 a	32 b
retirada	11	81 a	2	37 a	49	9 b	48 a	32	19 b	48 a
signif.	ns	*	ns	**	ns	*	**	ns	**	**
Auxina										
Sem auxina	4 b	80	1	29 ab	51	13	33b	40 a	26	33 b
0,5 % AIB	17 a	71	2	39 a	43	9	51a	27 b	21	51 a
0,1 % ANA	6 b	79	3	21 b	54	15	36b	39 a	24	35 b
signif.	***	ns	ns	**	ns	ns	**	*	ns	**

(*** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$, ns - não significativo)

Para o primeiro factor, o escurecimento, aplicação de uma banda preta com ou sem AIB, não influenciou a percentagem de enraizamento em relação à testemunha, com 35 e 45 % de plantas em aclimação ao fim de 5 meses, respectivamente. No entanto, ao fim de dois meses verificou-se que a mortalidade é menor, com 8% e 11%, nos tratamentos em que se aplicou *Banda+AIB* e *Banda*, respectivamente, contra 18% no tratamento *Sem Banda* (Tab. 3.6).

O escurecimento não causou quaisquer efeitos no NR e CMR (Tab. 3.7).

Neste ensaio, a retirada da casca no centímetro basal da estaca favoreceu o enraizamento ($P \leq 0,01$) a partir do segundo mês do início do ensaio e, ao fim de 5 meses, proporcionou a sobrevivência de 48% das estacas, valor significativamente diferente dos 32% de estacas sobreviventes quando não se retirou a casca (Tab. 3.6).

Observou-se uma interacção entre os factores escurecimento e descasque da base das estacas, na percentagem de formação de *callus*, nas três leituras efectuadas. A retirada da

casca influenciou, de modo diferente, a percentagem de formação de *callus* da testemunha (*Sem Banda*) dos outros dois tratamentos de escurecimento. No primeiro mês com a retirada da casca, aumentou a percentagem de estacas com *callus* no tratamento *Sem Banda* (Anexo II - Tab. II.5). Contudo, do primeiro para o terceiro mês de ensaio, a influência da retirada da base da estaca passou a ser marcante para o tratamento *Banda+AIB*, mas ao contrário: formaram-se mais estacas com *callus* quando se manteve a casca na base da estaca (Anexo II - Tab.ªs II.5, II.6 e II.7).

Tabela 3.7 - Efeitos do escurecimento (*blanching*), da retirada da casca e da aplicação de diferentes auxinas, no número médio de raízes (NR) e no comprimento médio da maior raiz, em mm (CMR), por estaca enraizada, ao fim de 1 mês e 2 meses, para o terceiro ensaio.

Tratamentos	1 Mês			2 meses		
	n	NR	CMR	n	NR	CMR
Escurecimento						
Banda+AIB	14	6,3	30,1	49	3,5	76,8
Com Banda	17	1,8	23,4	50	4,0	80,0
Sem Banda	9	2,0	13,0	38	3,5	71,9
signif.		ns	ns		ns	ns
Casca						
inteira	25	3,0	20,2	85	3,5	73,7
retirada	15	3,7	24,1	52	3,8	78,8
signif.		ns	ns		ns	ns
Auxina						
Sem auxina	6	1,4	19,1	43	3,3	68,6
0,5%AIB	25	5,3	21,5	60	4,5	74,8
0,1% ANA	9	3,3	25,9	34	3,1	85,3
signif.		ns	ns		ns	ns

O n é o tamanho da amostra utilizada para calcular a média (ns - não significativo).

resposta positiva na percentagem de enraizamento ao longo de todo o ensaio, o que não aconteceu com a aplicação de 0,1% de ANA e no tratamento testemunha. Ao fim do primeiro mês obtiveram-se 17% de estacas enraizadas ($P \leq 0,001$), com a aplicação de AIB, contra 6% e 4%, nos outros dois tratamentos, estes, sem diferenças significativas entre si. Ao fim de 5 meses, verificou-se também que, a sobrevivência foi de 51% para o tratamento com AIB contra 33 e 35% nos outros tratamentos, sem auxina e com aplicação de ANA, respectivamente.

A aplicação de diferentes auxinas não teve influência no NR e CMR, ao fim de um e dois meses (Tab. 3.7).

Ao fim de três meses surgiu uma interacção significativa entre os factores escurecimento e aplicação de diferentes auxinas: o aparecimento de estacas com *callus* no tratamento *Banda+AIB* é muito maior com a aplicação de ANA, do que com AIB ou no tratamento sem auxina (Anexo II - Tab. II.9).

Outra interacção significativa surgiu no 3º mês. Verificou-se uma maior mortalidade das estacas a que não se retirou a casca, no tratamento *Sem Banda* (Anexo II - Tab. II.8).

Observou-se que o factor descasque não exerceu influência no NR e CMR, (Tab. 3.7).

Vejamos, na Tabela 3.6 os efeitos simples provocados pelo terceiro factor - aplicação de diferentes auxinas: verificamos que a utilização de 0,5% de AIB teve sempre uma

Ao fim de dois e três meses verificámos ainda existir uma interacção entre os factores auxina e escurecimento, para o parâmetro mortalidade. Ao fim de dois meses, quando não foi aplicada a banda morreram mais estacas no tratamento com ANA do que no tratamento em que não se aplicou a banda. No tratamento com AIB, as estacas a que foi aplicada uma banda preta morreram menos do que as estacas a que não foi aplicada a banda. Para o tratamento testemunha (sem auxina), morreram muito menos estacas do tratamento *Banda+AIB* (Anexo II - Tab. II.10). No terceiro mês de ensaio, verificou-se que nos tratamentos em que se aplicou uma auxina, morreram sempre mais as estacas que não tiveram um dos tratamentos prévios com banda. Para o tratamento *Banda* morreram mais estacas do tratamento testemunha (sem auxina). Se a auxina aplicada for AIB, a mortalidade tem o seu valor mais baixo (Anexo II - Tab. II.11).

3.1.2. Comparação parcial dos ensaios

Para proceder à comparação parcial dos três ensaios, procurámos retirar a informação equivalente dos tratamentos que resultaram significativos após a análise estatística dos dados. Assim podemos comparar a aplicação de auxina (AIB e/ou ANA) e o descasque do centímetro basal da estaca em relação à percentagem de enraizamento, relacionando também esses resultados com a altura do ano em que se iniciaram os diferentes ensaios.

Nas Tabelas 3.8, 3.9 e 3.10, fornecem-se os dados informativos relativos aos diferentes tratamentos, por forma a poderem ser mais facilmente interpretados.

Tabela 3.8 - Efeitos da concentração de AIB e da retirada da casca, na % de enraizamento, ao fim de 1 mês, 2 meses e 3 meses e na % de sobrevivência ao fim de 5 meses, para o primeiro ensaio.

AIB (%)	Casca							
	Retirada				Inteira			
	1	2	3	5	1	2	3	5
0	8 b	13b	25b	21b	0a	8ab	17b	17b
0,5	21ab	42a	67a	54a	8a	38a	42ab	42ab
1	38 a	33ab	50ab	50ab	4a	17ab	54a	50a
2	4 b	33ab	46ab	38ab	4a	4b	29ab	21ab

No primeiro e terceiro ensaio a aplicação de AIB é, como vimos, positiva para a percentagem de enraizamento e constata-se que esta fica favorecida com a retirada da casca no centímetro basal da estaca. No primeiro ensaio enraizaram 67% das estacas com a retirada da casca e a aplicação de 0,5% de AIB, ao fim de três meses, contra 42% de estacas enraizadas só com a aplicação de 0,5% de AIB (Tab. 3.8). Os resultados favoráveis, obtidos com o emprego destes dois métodos, só se verificam durante a primeira época de ensaios, ou seja na Primavera

(Abril), pois no ensaio realizado no Verão (Junho), os resultados foram diferentes, tendo-se obtido apenas 49% de estacas enraizadas com a aplicação de 0,5% de AIB (Tab. 3.9). Verifica-se também, neste ensaio⁷, que a aplicação de AIB não influencia o enraizamento como nos outros dois.

Tabela 3.9 - Efeito da concentração de AIB (com a casca retirada), na % de enraizamento, ao fim de 1 mês, 2 meses e 3 meses e na % de sobrevivência ao fim de 5 meses, para o segundo ensaio.

AIB (%)	1	2	3	5
0	9a	43a	47a	34a
0,5	11a	48a	50a	37a
1	9a	38a	43a	35a

No terceiro ensaio, realizado novamente durante a Primavera, os resultados obtidos com a aplicação de 0,5% de AIB e retirada da casca, são bastante semelhantes aos do primeiro, com 61% de estacas enraizadas contra 41% quando se não descascou a estaca, ao fim de três meses. Neste ensaio observa-se ainda que nenhuma planta

enraizada morreu durante a fase de aclimação, ao fim de 5 meses, em qualquer dos tratamentos com auxina e desde que se tivesse retirado a casca (Tab. 3.10).

Tabela 3.10- Efeitos da aplicação de auxina e da retirada da casca, na % de enraizamento, ao fim de 1 mês, 2 meses e 3 meses e na % de sobrevivência ao fim de 5 meses, para o terceiro ensaio.

Auxina %	Casca							
	Retirada				Inteira			
	1	2	3	5	1	2	3	5
Sem auxina.	7b	36b	44b	44b	1b	21a	23b	21b
AIB (0,5)	19a	57a	61a	61a	15a	27a	41a	40a
ANA (1)	8b	23b	37b	37b	4b	19a	34ab	33ab

Ainda em relação ao terceiro ensaio, observa-se que a aplicação de ANA, não fornece resultados significativamente diferentes da testemunha, pelo menos na concentração ensaiada (Tab. 3.10)

A mortalidade das estacas (em relação ao total de estacas postas a enraizar) foi testada estatisticamente independentemente dos tratamentos efectuados para os três ensaios e para o período de cinco meses. Observaram-se diferenças consistentes na sobrevivência entre os ensaios de enraizamento efectuados em Abril e o efectuado em fins de Junho ($P \leq 0.001$). Neste último, morreram 24% das estacas enraizadas 5 meses após o início do ensaio, enquanto que no primeiro ensaio morreram apenas 11% e no terceiro 2% das estacas enraizadas. Para o primeiro e terceiro ensaios, a fase de aclimação não parece ser tão dramática: o facto de as estacas enraizadas entrarem em dormência antes de abroilharem, aparentemente diminui o sucesso da sobrevivência.

⁷Neste ensaio todas as estacas foram descascadas como foi referido no capítulo de Material e Métodos.

3.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PROCESSO RIZOGÉNICO

3.2.1. Descrição das microfotografias

Os cortes, realizados na base das estacas, sujeitos à coloração referida no capítulo de Material e Métodos, foram observados e fotografados e seleccionaram-se as microfotografias mais representativas das várias situações encontradas. A coloração utilizada permite identificar a azul, o material pouco lenhificado e a rosa o material mais lenhificado e destaca, a vermelho vivo, o material taninoso e também as paredes impregnadas de taninos ou suberificadas.

Na Figura 3.5 podemos observar a estrutura de uma estaca, antes de ser posta a enraizar e sem ter sido sujeita a nenhum tratamento. Na Figura 3.5-A observa-se a *periderme*, uma estrutura com funções de protecção; o *córtex* é o conjunto de células parenquimatosas, grandes, deixando entre si espaços intercelulares e contendo algumas delas cristais ou material taninoso. Na parte interior do córtex e exterior ao floema secundário podemos observar o anel de *fibras perivasculares* primárias. De quando em quando aparecem *escleritos*, células diferenciadas a partir de células de parênquima, volumosas e em geral isodiamétricas, em que a deposição da parede secundária faz evidenciar o aparecimento dos pontuações (a vermelho). Com esta idade e desenvolvimento do material, o número de escleritos presentes é diminuto. No *floema secundário*, destacam-se células de parênquima nos raios, coradas de vermelho vivo e cheias de material taninoso. O *câmbio* é bem evidente, na transição para o *xilema secundário*. Neste tecido observam-se com nitidez os vasos largos de Primavera, pois é uma espécie de porosidade em anel, e também os raios unisseriados com algumas células de parênquima, intensamente coradas de vermelho. As últimas camadas de células formadas, de xilema, ainda não estão completamente diferenciadas, pois apresentam coloração azulada. No centro podemos observar a *medula* que ocupa uma porção considerável do cilindro vascular, constituída de células de parênquima, grandes e arredondadas, também com substâncias taninosas com a aparência de massas granulares. Observe-se na Figura 3.5-B, um detalhe da microfotografia anterior, os tecidos que fazem parte da periderme. Esta é constituída pela *felogene*, um meristema secundário e pelos tecidos originados por este: a *feloderme*, em geral com uma só camada de células e o *felema*, com poucas camadas de células, dispostas em fiadas radiais, compactas e de paredes suberificadas, contendo quantidades consideráveis de material taninoso.

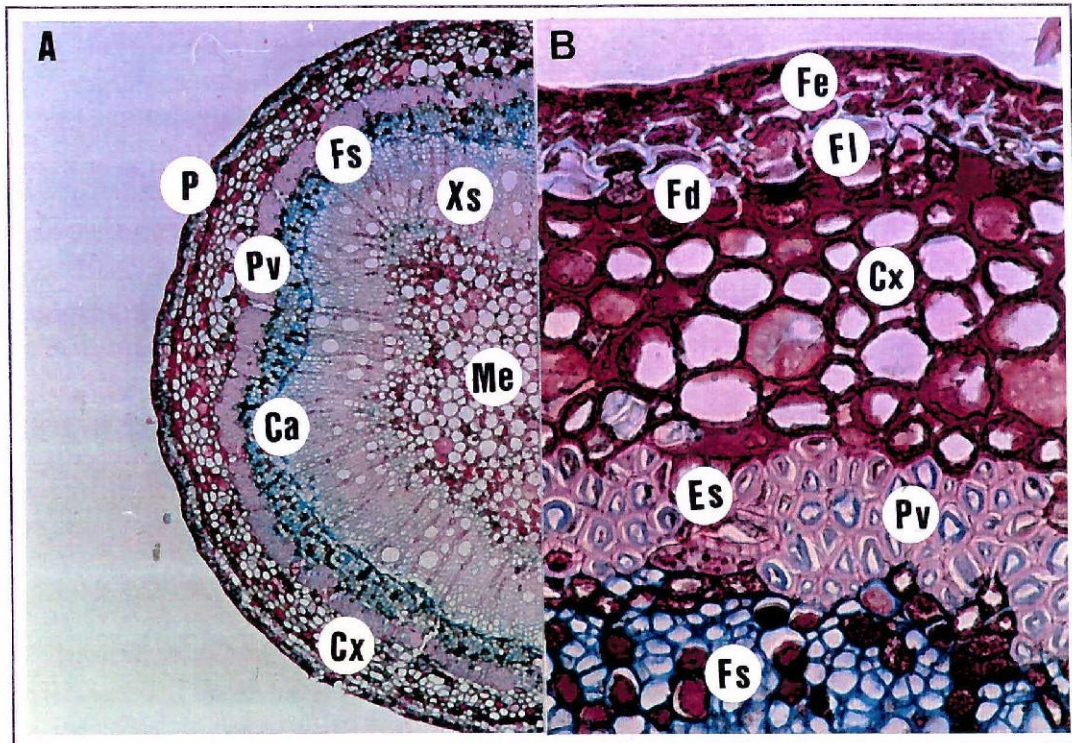


Fig. 3.5 - Secção transversal da base de uma estaca que não foi submetida a nenhum tratamento, no dia zero. (A) Observe-se a periderme (P), o córtex (Cx), as fibras perivasculares (Pv), o floema secundário (Fs), o câmbio (Ca), o xilema secundário (Xs) e a medula (Me). 62x. (B) Em detalhe, o felema (Fe), a felogene (Fl), a feloderme (Fd) e esclerito (Es). 208x.

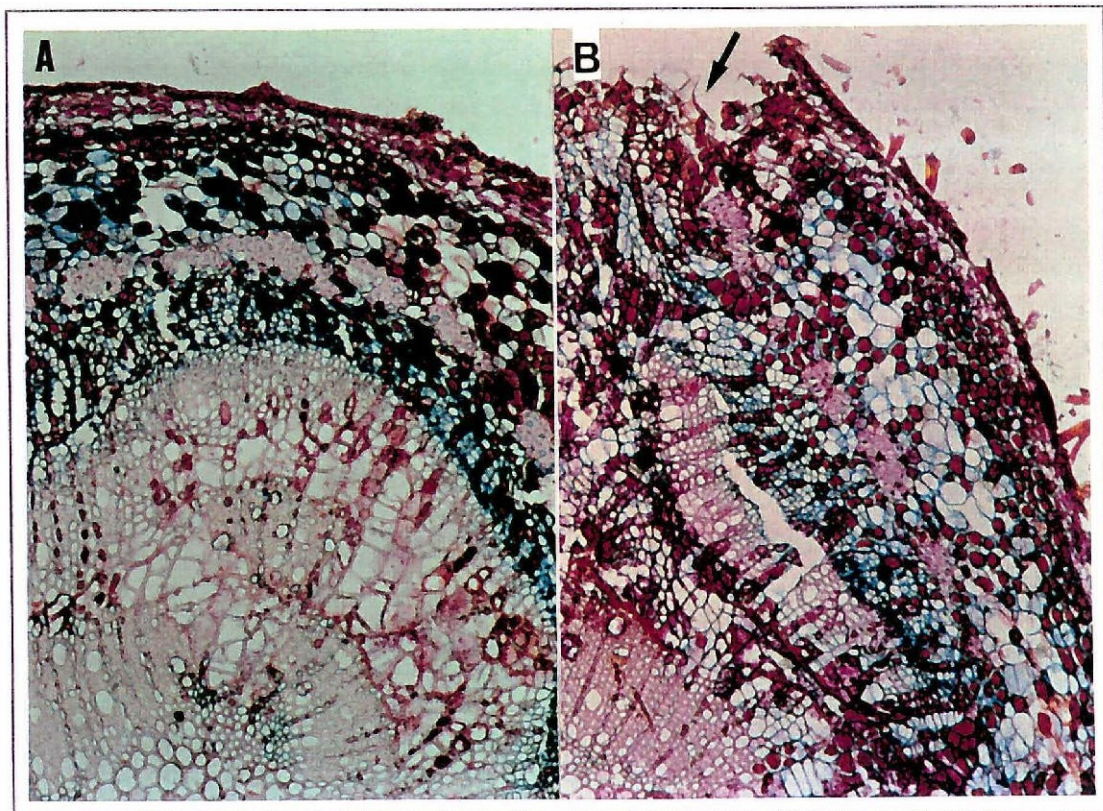


Fig. 3.6 - (A) Secção transversal da base da estaca sujeita ao tratamento *Com Banda*. 104x. (B) Secção transversal da base da estaca sujeita ao tratamento *Banda+AIB*. 83x. Amostras recolhidas no dia zero. Observe-se a alteração da estrutura mais acentuada em (B); ver texto.

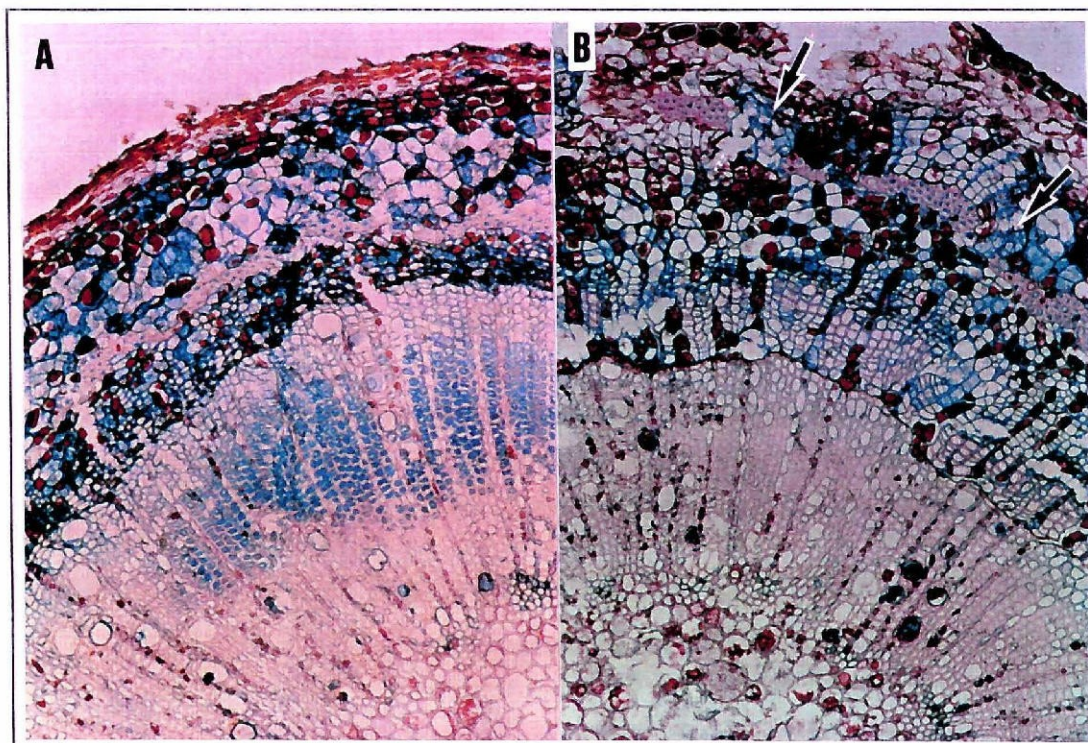


Fig. 3.7 - (A) Secção transversal da base da estaca sujeita ao tratamento *Sem Banda* e 0,5% de AIB. 62x. **(B)** Secção transversal da base da estaca sujeita ao tratamento *Com Banda* e aplicação de 0,5% de AIB, antes da estaca ser posta a enraizar. 104x. Amostras recolhidas no dia 20. Observe-se a alteração da estrutura mais acentuada em **(B)**; ver texto.

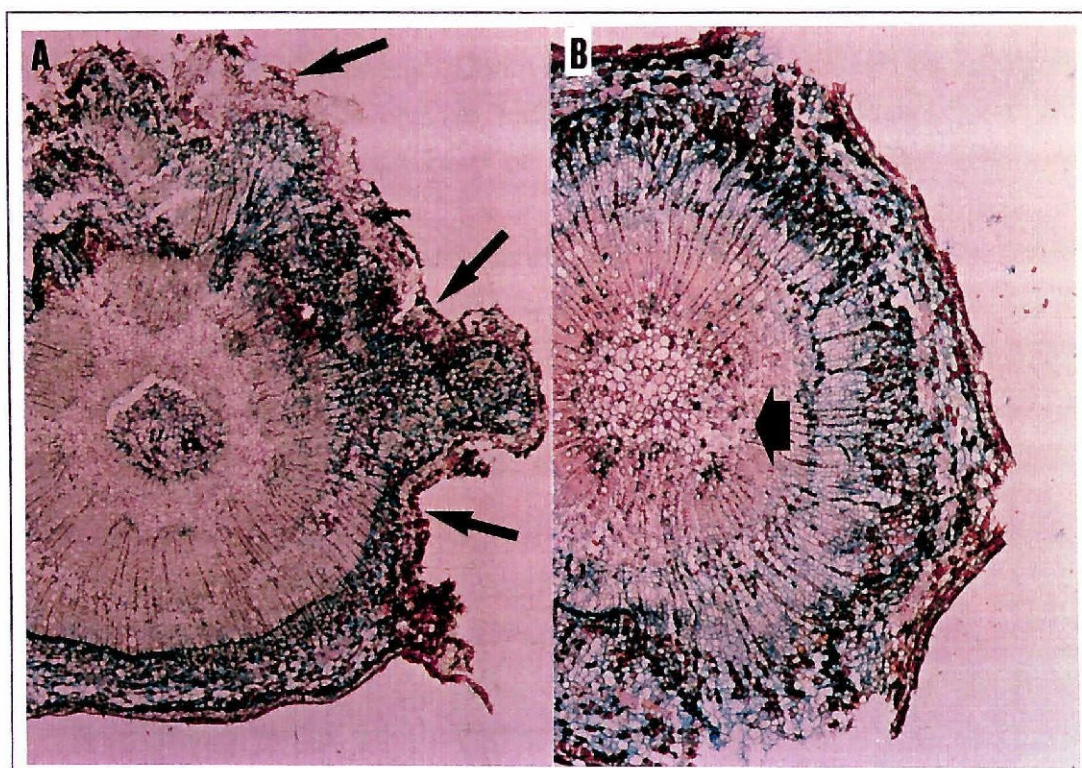


Fig. 3.8 - Secções transversais da base das estacas sujeitas ao tratamento *Banda+AIB*. **(A)** Sem aplicação de 0,5% de AIB. 41x. **(B)** Com aplicação de 0,5% de AIB. 21x. Amostras recolhidas no dia 20; ver texto.

Na Figura 3.6-A, podemos observar a estrutura alterada de uma estaca antes de ser posta a enraizar, depois de ter sido submetida ao tratamento de escurecimento *Com Banda*. Observam-se alterações a nível das células do xilema, nomeadamente nas dimensões dos seus elementos e poucas interrupções a nível do anel de fibras perivasculares. A Figura 3.6-B evidencia uma modificação muito mais acentuada da estrutura de uma estaca, no dia zero, após ter sido sujeita ao tratamento *Banda+AIB*. Podemos verificar interrupções muito mais frequentes do anel de fibras perivasculares; alteração ao nível do xilema e do câmbio, que deixa de estar bem definido; proliferação das células do córtex com alguma invasão de taninos e alteração a nível da periderme, com início de formação de *callus* (seta).

Na Figura 3.7-A, podemos observar a estrutura alterada de uma estaca, submetida ao tratamento *Sem Banda* e a 0,5% de AIB, ao fim de 20 dias de ensaio. A estrutura encontra-se ainda mais ou menos coesa mas com início de alterações a nível do câmbio e também do xilema. O anel de fibras perivasculares é nítido mas mais fino que a testemunha no dia zero (Fig. 3.5). A Figura 3.7-B é uma microfotografia de um corte transversal de um estaca sujeita aos tratamentos *Com Banda* e à aplicação de 0,5% de AIB antes de ser posta a enraizar, depois do mesmo tempo. Pode observar-se uma alteração profunda da estrutura, com parte do anel de fibras perivasculares ainda bem evidente, mas com interrupções frequentes (setas); ausência de um câmbio bem definido e periderme com início de formação de *callus*.

Na Figura 3.8-A, podemos observar a secção transversal de uma estaca submetida aos tratamentos *Banda+AIB* sem aplicação de AIB antes da estaca ser posta a enraizar, ao fim de 20 dias na bancada de enraizamento. Observa-se uma alteração profunda da estrutura com formação de *callus* (setas) e com os tecidos sem coerência. A Figura 3.8-B é uma microfotografia de um corte transversal de um estaca sujeita ao mesmo tratamento de escurecimento mas com aplicação de 0,5% de AIB antes da estaca ser posta a enraizar, depois do mesmo tempo na bancada de enraizamento. A estrutura da estaca perdeu quase por completo o seu padrão normal: observam-se interrupções a nível do anel das fibras perivasculares, xilema apenas lenhificado na zona junto à medula (seta), desaparecimento, em parte, da periderme; proliferação das células meristemáticas do córtex, sem separação nítida em relação ao floema e ausência de um só câmbio bem definido.

3.2.2. Análise das alterações observadas

Neste ensaio verificaram-se diferenças profundas entre as estacas submetidas aos tratamentos prévios de *Banda+AIB* e *Banda* e as testemunhas, *Sem banda*. As estacas sujeitas aos dois primeiros tratamentos mostram alterações estruturais logo no dia zero do enraizamento. No entanto, as estacas tratadas com *Banda+AIB*, são aquelas onde se observam

maiores alterações anatómicas, desde mais cedo (Tab. 3.11), em especial alterações na camada de fibras perivasculares, que se torna mais tênue e descontínua.

Tabela 3.11 - Alterações estruturais e anatómicas na base das estacas, em função dos tratamentos a que foram submetidas antes do enraizamento: aplicação ou não da banda com ou sem AIB (A) e aplicação de AIB, em pó, à estaca antes de ser posta a enraizar (B), observadas em cortes transversais de amostras recolhidas nos períodos referidos

A	Sem Banda		Com Banda		Banda+AIB	
B	(1) 0	(2) 0,5 %	(3) 0	(4) 0,5 %	(5) 0	(6) 0,5 %
nº de dias	Sem alteração		Alteração da estrutura, ao nível do xilema		Início de alteração e de formação de callus	
0	Sem alteração		Alteração da estrutura, ao nível do xilema		Início de alteração e de formação de callus	
3	Sem alteração	Sem alteração	Estrutura alterada na zona do nó	Callus na zona do nó	Início de alteração na zona do nó	Intumescência na zona do nó, descontinuidade das fibras perivasculares
6	Sem alteração, anel de fibras perivasculares muito grosso	Sem alteração	Pouca alteração da estrutura	Alteração profunda da zona do nó	Alteração na zona do nó	Formação de callus mesmo na zona fora do nó, interrupção das fibras perivasculares
10	Estrutura muito pouco alterada	Zona do nó um pouco alterada	Alteração da estrutura mais acentuada na zona do nó e menos fora	Alterações na zona do nó e raios de xilema alargados	Início de formação de callus na zona do nó	Estrutura alterada e com anel de fibras perivasculares muito tênue
14	Zona do nó um pouco alterada	Zona do nó um pouco alterada	Intumescência na zona do nó	Alteração da estrutura, mas anel grosso de fibras perivasculares	Estrutura não muito alterada	Estrutura muito alterada. Zona do floema com muitas camadas de células
20	Pouca alteração na estrutura	Pouca alteração na estrutura	Alteração profunda da estrutura	Alteração profunda da estrutura	Estrutura bastante alterada e formação de callus	Estrutura completamente alterada

Observa-se que o início da alteração da estrutura da estaca se dá, em geral, na zona do nó, ou seja, na zona correspondente à formação do gomo adventício e inserção do pecíolo. As alterações estruturais na zona do entrenó aparecem mais tarde, excepto para o tratamento (6) em que se dão alterações mesmo na zona fora do nó, a partir do dia 6.

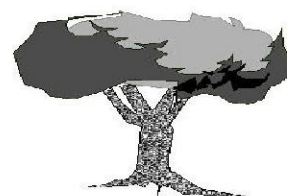
Um aspecto bastante interessante é a comparação das amostras, no dia zero, dos tratamentos referidos nas colunas *Sem Banda*, *Com Banda* e *Banda+AIB* da Tabela 3.11. O facto de as estacas terem estado um mês com uma fita preta de PVC provoca um início de alteração na zona do nó sobretudo para o tratamento *Banda+AIB*. As alterações são muito menores quando se aplicou a banda sem AIB. As observações efectuadas indicam que a aplicação da banda, por si só, inicia alterações na estrutura da estaca; esse facto já se tinha tornado evidente a olho nu no dia 0, com a zona da estaca sujeita a esse tratamento tornando-se esbranquiçada e, para o tratamento *Banda+AIB*, com o aparecimento de uma formação do tipo *callus*.

Outra evidência é a alteração que se verifica no anel de fibras perivasculares que rodeia o floema. No tratamento indicado na coluna (6) da Tabela 3.11 verifica-se que a partir do dia 3 surgem descontinuidades nesse anel, que se vão acentuando ao longo do tempo, até que a

partir do dia 14 praticamente não se observa essa estrutura. A partir desse dia e especialmente no dia 20, observa-se uma grande proliferação das células de floema e córtex, em particular as células parenquimatosas e ainda alteração ao nível do câmbio que deixa de ser nítido e único.

Para o tratamento *Sem Banda*, a aplicação de AIB não provoca alterações muito diferentes da sua não aplicação, como podemos ver nas colunas (1) e (2) da Tabela 3.11. No entanto, para os tratamentos *Com Banda* e *Banda+AIB*, verifica-se que a aplicação de AIB provoca alterações mais profundas, do que no tratamento anterior (colunas (3), (4) e (5), (6) da Tab. 3.11). Isto pode significar que o escurecimento torna a estaca mais receptiva ou sensível à aplicação da auxina, em pó, antes da estaca ser posta a enraizar.

4. DISCUSSÃO



4. DISCUSSÃO

4.1. ENSAIOS DE ENRAIZAMENTO

O domínio das técnicas de propagação vegetativa parece ser essencial no contexto do melhoramento florestal da espécie *Quercus suber* L. A estacaria é um dos processos mais expeditos de se obterem cópias vegetativas, embora a conjugação do seu uso com outros métodos de propagação vegetativa seja necessária, como vimos, para que se possa utilizar material proveniente de árvores adultas seleccionadas.

Com os ensaios realizados pretendemos esclarecer alguns dos factores que influenciam o enraizamento de estacas nesta espécie, em relação à quantidade e qualidade do enraizamento e também à sobrevivência das estacas enraizadas. Para isso utilizámos plantas jovens como fonte do material vegetal, facto que ficou a dever-se à maior facilidade na sua manipulação e também à dificuldade de utilização directa de material adulto (secção 1.2.5.). Foram efectuados estudos sobre o enraizamento de estacas em diversas modalidades, influência da aplicação de reguladores de crescimento do tipo auxínico (AIB e ANA), da concentração de AIB, da retirada da casca no centímetro basal da estaca e dos tratamentos prévios dos pés-mãe - estiolamento (número de dias às escuras) e escurecimento (secção 2.2.) - por forma a estabelecer a melhor ou melhores metodologias para a aplicação da estacaria a esta espécie. Efectuámos ainda um ensaio de estimulação do abrolhamento de gomos axilares de estacas previamente enraizadas, com aplicação de benzilaminopurina com o objectivo de aumentar a sobrevivência das mesmas (secção 2.2.1.3.). Finalmente realizámos, um ensaio para observação do processo rizogénico através de cortes histológicos de estacas submetidas ao escurecimento e à aplicação de ácido indolbutírico (secção 2.3.).

4.1.1. Aplicação de auxinas

A auxina é normalmente utilizada por ser aceite que a sua aplicação estimula o *enraizamento adventício*⁸ em diferentes espécies. Embora o processo de enraizamento possa estar dependente da auxina endógena ou exógena (HAISSIG, 1972), vários autores consideram que a auxina não é, contudo, o único determinante do enraizamento adventício e que não existe uma relação simples entre os níveis endógenos de auxina nas estacas e o enraizamento (HAISSIG, 1986; GASPAR & COUMANS, 1987; GASPAR & HOFINGER, 1988).

GASPAR & HOFINGER (1988) indicam que o processo de enraizamento pode ser subdividido numa série de fases fisiológicas sucessivas e interdependentes: a fase de indução (conjunto de acontecimentos bioquímicos que precedem a divisão celular), a fase de iniciação (termina com a identificação do meristema primário) e a fase de expressão (compreende o crescimento interno do primórdio ao longo do córtex e subsequente emergência e crescimento). Tem sido verificado que extractos de tecidos das estacas fornecem um pico da actividade *in vitro* das peroxidases imediatamente antes da formação das raízes. Esse pico marca o princípio da fase de iniciação e tem sido referido que factores químicos ou físicos capazes de modular esse pico podem alterar a taxa de enraizamento. Existe uma boa correlação entre a alteração da actividade da peroxidase e o teor de auxina endógena (não conjugada), ao longo das diferentes fases do enraizamento. Um pico da auxina ocorre antes de qualquer evidência citológica, sugerindo que corresponde ao período de indução; a queda do nível de auxina seguido da subida da actividade da peroxidase caracteriza a fase de iniciação, onde ocorrem as primeiras divisões celulares. Por fim a fase de expressão requer um aumento na concentração de auxina endógena. Pode-se concluir que a auxina endógena (e por maioria de razão também exógena) não é necessária em todas as fases da formação das raízes. Vários estudos recentes têm mostrado que o enraizamento depende de uma elevada capacidade de oxidação da auxina antes da iniciação dos primórdios e de uma baixa actividade durante a iniciação e tem sido constatado que os níveis de auxina aumentam durante a iniciação dos primórdios radiculares (MONCOUSIN *et al.* 1988, BERTHON, *et al.* 1989; GASPAR *et al.* 1992).

O efeito das auxinas sintéticas, de aplicação exógena, pode não reproduzir o fenómeno regulado pelas auxinas endógenas. Para tal podem contribuir a existência de receptores diferentes; a eventual acção de produtos da sua oxidação ou conjugação; o aumento da

⁸O *enraizamento adventício* é o processo de formação de raízes adventícias que podem ter a sua origem em todas as partes da planta excepto a raiz de proveniência embriogénica.

sensibilidade dos tecidos (JARVIS, 1986; HAISSIG, 1986; GASPAR *et al.*, 1992). LABEL *et al.* (1989) referiram que existe uma correlação entre a aplicação de AIB e a concentração endógena de AIA, durante a cultura *in vitro* de *Prunus avium* L., com níveis de AIA endógeno 20 a 30 vezes superiores nas estacas tratadas com AIB. Por outro lado, WEISMAN *et al.* (1989) demonstraram a importância da formação de conjugados de AIB após a sua aplicação exógena, pois verificaram uma rápida metabolização desta substância e propõem que a acumulação dos conjugados seja muito importante pois podem ser a maior fonte de auxina disponível para os estádios mais tardios do processo do enraizamento. MALDINEY *et al.* (1986) observaram um aumento do nível de AIA na zona de formação de raízes em *Craigelia* spp. No entanto, NORDSTRÖM & ELIASSON (1991) comunicaram que a iniciação das raízes em estacas de ervilheira, pode ocorrer sem que se verifique um aumento significativo de AIA na zona de regeneração das raízes. Pode existir uma concentração de auxina endógena estável, que é mantida pelo transporte basipeto da auxina a partir do ápice e conjugação do excesso com ácido aspártico.

Ainda que não existam certezas sobre a forma como a auxina exógena actua a nível interno: verifica-se que tratamentos com AIB aumentam os movimentos de azoto, fósforo e potássio para a região de enraizamento (BLAZICH *et al.*, 1983), constata-se que em estacas induzidas com AIB aumenta a síntese de poliaminas, que parece estarem envolvidas nos estádios iniciais do enraizamento (SANKHLA & UPDHYAYA, 1988), a presença desse regulador influencia a síntese proteica (HAISSIG, 1986 e referências aí citadas) e também a redistribuição dos hidratos de carbono (HAISSIG, 1982).

4.1.1.1. Concentração de AIB, época do ano e aplicação de ANA.

i) Primeiro ensaio

No primeiro ensaio por nós realizado verificámos que existe um intervalo de concentração de AIB entre 0,5% e 1%, em que se obtiveram percentagens de enraizamento significativamente superiores à testemunha (Tab. 3.1), considerando os efeitos simples deste factor. Alguns autores indicaram resultados diferentes no enraizamento de estacas de sobreiro, contraditórios em relação aos verificados por nós: DREW & DIRR (1989), observaram que com estacas retiradas em meados de Maio, Junho e Agosto de plantas de sobreiro com três anos e com a aplicação de AIB em solução a 1%, obtiveram apenas 2% de enraizamento, depois de três meses de ensaio. ROMANO *et al.* (1992) efectuaram ensaios de Fevereiro a Abril, mensalmente, tendo obtido para estacas provenientes de plantas jovens de sobreiro, enraizamentos entre 5 e 25%, ao fim de três meses, sem diferenças significativas entre os tratamentos hormonais efectuados. ROLDÃO (1990) utilizou ramos de plantas jovens e

aplicou 1% de AIB, em Agosto e com aquecimento de bancada de 28°C, tendo obtido 50% de enraizamento, também ao fim do mesmo tempo.

Existem, portanto, fortes discrepâncias na literatura quanto aos resultados observados pelos diferentes autores em relação à aplicação de AIB, em estacas de sobreiro. Na maioria dos ensaios referidos, a altura do ano, a metodologia utilizada e a idade das plantas dadoras não são claramente referidos, o que impossibilita a comparação. A época do ano utilizada foi referida no artigo de ROMANO *et al.* (1992), tendo os ensaios sido feitos de Fevereiro a Abril, mensalmente, com resultados em termos de percentagens de enraizamento aquém dos obtidos por nós. ROLDÃO (1990) usou duas épocas de enraizamento, Agosto e Outubro, tendo as estacas enraizado menos nesta última época. Noutro ensaio foi utilizado material mais velho e outra metodologia de aplicação do AIB, em solução concentrada (DREW & DIRR, 1989), o que pode levar a resultados bem diferentes. Por exemplo, HANSEN (1989), utilizando cultivares de macieira e com a aplicação de AIB em pó, verificou que a percentagem de enraizamento obtidas com a concentração de 1% era significativamente diferente da testemunha mas também confirmou a superioridade das soluções (concentradas ou diluídas) sobre as formulações em talco.

Por ser um género com espécies geralmente recalcitrantes ao enraizamento, têm sido efectuados ensaios em outras espécies do género *Quercus* spp. com aplicação de auxina exógena sob forma de pó ou em solução sendo mais frequente o uso de AIB, embora o ANA também seja usado. CORNU *et al.* (1977) utilizaram plantas com um ano de *Quercus petraea* Liebl e obtiveram 80 a 90% de enraizamento após a aplicação de 0,5% de AIB em pó, depois de três meses de ensaio, iniciado em Maio-Junho. L'HELGOUAL'CH & ESPAGNAC (1987) usaram a mesma concentração de AIB, também em talco e, em estacas muito jovens de *Quercus ilex* L., conseguiram enraizamentos da ordem dos 70%, resultado que descia para cerca de 30% quando se tratava de plantas com 4 meses. ENESCU & ENESCU (1988) com estacas provenientes de plantas de *Quercus robur* L. com um ano e após a aplicação de 0,5% de AIB, obtiveram cerca de 95% de enraizamento, desde que o substrato fosse turfa.

ii) Segundo ensaio

Para o segundo ensaio, efectuado em fins de Junho, em que as estacas foram todas descascadas, os resultados obtidos com a aplicação de AIB não foram, ao fim de três meses, significativamente diferente do controle, com valores entre 43 e 50%, respectivamente (Tab. 3.9). Estes valores são equivalentes aos obtidos por ROLDÃO (1990), que refere 49% de enraizamento, após a aplicação de 1% de AIB, numa época semelhante (Agosto), mas sem descasque das estacas.

É possível que exista uma resposta diferenciada em relação à aplicação de auxina exógena, de acordo com a altura do ano em que se fazem os ensaios. DAVIES (1984) refere que a altura do ano em que as estacas são retiradas da planta-mãe influencia decisivamente o

enraizamento adventício e mostra existir uma correlação entre os períodos com melhores percentagens de enraizamento (sem aplicação exógena de auxina), a actividade cambial e elevados níveis de RNA, em estacas de *Ficus pumila* L., o que parece comprovar a importância da auxina endógena proveniente do ápice no estímulo do enraizamento.

Nos ensaios que efectuámos, no que diz respeito à percentagem de enraizamento as estacas retiradas em fins de Abril mostraram-se sensíveis à auxina e as retiradas em fins de Junho são insensíveis à sua aplicação. Provavelmente, a concentração de auxina endógena nessa altura do ano (fins de Junho) será suficiente, e a aplicação de reguladores de crescimento do tipo auxínico, pode não ter influência marcante no processo de enraizamento. PSOTA (1989), em ensaios com a espécie *Quercus robur* L, confirmou que a resposta das estacas à aplicação de AIB está intimamente ligada à sua entrada em dormência e à altura do ano em que os ensaios se realizam. Perto do início da entrada em dormência diminui a capacidade de enraizamento das estacas em resposta à aplicação da auxina. ARBEZ (1982) afirma que um dos factores limitantes para o sucesso do enraizamento em *Quercus petraea* (M.) Liebl. é o estágio de desenvolvimento da estaca quando esta é retirada da planta-mãe e indica a época de Maio/Junho como aquela que é mais favorável.

DEHGAN *et al.* (1989) referiram que as espécies do género *Quercus* são excepcionalmente exactas em relação à altura do ano em que são capazes de formar raízes adventícias. Verificaram a existência de uma relação directa entre o estágio de crescimento da planta mãe e o enraizamento das estacas. Este processo está, muito provavelmente relacionado com o balanço hormonal, dependente do estímulo ambiental. RIO *et al.* (1986) verificaram que a aplicação de AIB em estacas de oliveira aumentava significativamente a percentagem de enraizamento, mas para uma das duas variedades usadas isso só era verdadeiro se a época de enraizamento fosse Setembro.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios por nós realizados, podemos inferir a necessidade de serem realizados outros que possam esclarecer melhor a relação entre a aplicação de auxinas e a época do ano no enraizamento de estacas de sobreiro. De facto os dados sugerem que pode haver uma relação entre o nível de auxina endógena, aliada ou não a outros factores (sensibilidade dos tecidos, substâncias protectoras da auxina, promotores do enraizamento, etc.), a altura do ano em que se retira as estacas das plantas-mãe e a aplicação de AIB.

iii) Terceiro ensaio

Voltando aos resultados obtidos com a espécie *Quercus suber* L., os valores para a percentagem de enraizamento do terceiro ensaio (que foi iniciado em Abril, numa altura do ano semelhante aquela em que foi iniciado o primeiro) testemunham novamente um efeito

positivo da aplicação de AIB à base da estaca (Tab. 3.6), apesar da proveniência da semente não ser a mesma daquela utilizada no primeiro ensaio (secção 2.2.1.). Neste ensaio observa-se, igualmente, que a aplicação de ANA, pelo menos na concentração de 0,1%, não influencia o enraizamento quando comparado com a testemunha. BLAZICH (1983) sugeriu que o AIB é mais efectivo, em geral, que o ANA na promoção do enraizamento. No entanto, a comparação não é linear pois muitos factores podem influenciar a eficácia da auxina, tais como: a forma de preparação do material, a espécie e factores ambientais. DEHGAN *et al.*(1989) referiram que em *Quercus hemisphaerica* Bartl., a aplicação de ANA superou o AIB na promoção do enraizamento. RINALLO *et al.* (1987), utilizando estacas de castanheiro provenientes de ramos epicórmicos e sujeitos a escurecimento, verificaram que o ANA aumentava tanto o enraizamento como a sobrevivência das estacas. É possível que os resultados por nós obtidos correspondam à aplicação de uma concentração de ANA inadequada ou então que a espécie não responda a esta auxina. Por isso, pensamos que se deve estudar com mais detalhe a influência desta auxina, noutras concentrações e também em combinação com outras auxinas.

4.1.1.2. Número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada

Em relação ao número médio de raízes e ao comprimento médio da maior raiz por estaca enraizada (NR e CMR), através dos resultados obtidos nos ensaios podemos verificar que a aplicação de AIB estimula o último parâmetro e não o primeiro.

Na espécie *Quercus suber* L., o tempo de duração do enraizamento é tão longo (pelo menos três meses), que se verifica uma forte dessincronia no enraizamento das diferentes estacas. O facto de novas estacas enraizarem, ao longo do tempo, vem camuflar o parâmetro número médio de raízes por estaca enraizada (NR) pois, como é evidente, a percentagem de enraizamento aumenta à medida que mais estacas vão enraizando ao longo dos três meses, especialmente na passagem do 1º para o 2º mês (Tab.^{as} 3.1 e 3.3). Cada nova estaca que enraíza contribui com relativamente poucas raízes para este parâmetro, o que faz baixar NR precisamente nos tratamentos com maiores percentagens de enraizamento, ao fim de três meses. Acresce ainda dizer que, nesta espécie, o número de raízes formadas por estaca é muito reduzido relativamente a outras espécies; se fosse mais elevado poderia haver uma influência menor do NR das estacas recém enraizadas relativamente ao NR do total das estacas enraizadas em cada momento. DEHGAN *et al.* (1989) indicaram que para as espécies de *Quercus* spp. que utilizaram, todas as estacas enraizadas apresentavam, em geral, poucas

raízes, embora de alongamento rápido. Estes aspectos estão bem evidenciados nos valores das Tabelas 3.2, 3.4 e 3.7.

Os tratamentos com auxina conduzem, desde mais cedo, a um maior número de estacas enraizadas em comparação com o tratamento testemunha. Assim, a aplicação de AIB conduziu a resultados significativos para o parâmetro CMR, ao fim de dois meses (Tab.^{as} 3.2 e 3.4.).

No terceiro ensaio, a aplicação das duas auxinas, AIB e ANA, não provoca diferenças significativas no CMR em relação à testemunha (Tab. 3.7). Neste caso, no tratamento sem auxina as estacas possuem raízes muito mais longas do que nos outros dois ensaios. Isso pode ser devido à influência indirecta do tratamento de escurecimento; embora o efeito simples não seja significativo pode ter exercido uma influência indirecta nos outros factores.

Os resultados parecem sugerir que a aplicação de AIB não teve influência no número de raízes formadas mas sim na antecipação da sua iniciação e/ou na velocidade de crescimento das raízes.

4.1.2. Descasque do centímetro basal da estaca

Pensa-se que as razões pelas quais as feridas da base da estaca podem afectar o enraizamento são, entre outras, por um lado, a maior exposição dos tecidos (MACKENZIE *et al.*, 1988; BLAZICH, 1988) e por outro a libertação de etileno. A própria retirada da estaca da planta dadora provoca, por si só, uma ferida e existem evidências de que o etileno endógeno possa afectar a resposta das células a outros estímulos inductores do enraizamento (MUDGE, 1988). GONZALEZ e colaboradores (1991), num estudo utilizando cotilédones de aveleira, observaram que o etileno induzido pela ferida é um factor-chave na estimulação e na formação de primórdios radiculares pois verificaram que a aplicação de um inibidor da síntese de etileno provocava a diminuição do número médio de raízes formadas em paralelo com a quantidade de etileno libertado.

Segundo DRUART *et al.* (1982), vale a pena considerar a influência dos fenóis, pois tendem a acumular-se em resultado da realização de feridas. Estes autores concluíram que na fase indutiva um nível de fenóis endógeno alto e uma actividade baixa da peroxidase produziam melhores percentagens de enraizamento. Pensa-se que os fenóis possam actuar directamente no enraizamento ou através de uma acção sinérgica com a auxina; no entanto, as relações entre estes fenómenos não estão ainda totalmente esclarecidas (HAISSIG, 1986). Segundo GASPAR *et al.* (1992) os fenóis podem inibir ou estimular o enraizamento dependendo do momento e duração da sua aplicação, ou seja, se essa aplicação é feita antes do pico da peroxidase (fase indutiva - referida na secção 4.1.1.) ou depois (fase iniciativa/expressiva). Alguns compostos podem aumentar a actividade específica da

peroxidase e outros diminuí-la. Parece existir uma forte correlação entre o efeito dos fenóis no enraizamento e o seu efeito na actividade específica da peroxidase. Os mesmos autores referem que existe uma relação directa entre a concentração dos fenóis que aumentam a actividade específica da peroxidase e o enraizamento, quando estes são aplicados durante a fase de indução dos primórdios, ocorrendo o inverso na fase de expressão.

A realização de feridas, sobretudo em espécies de difícil enraizamento, pode conduzir a resultados favoráveis em relação à quantidade e qualidade do enraizamento, com aplicação ou não de auxina. No primeiro e terceiro ensaios, em que retirámos a casca no centímetro basal da estaca, observámos um aumento da percentagem de enraizamento em relação à não realização desta operação (Tab.^{as} 3.1 e 3.6); pese embora o facto de se tratar de uma técnica bastante morosa, não quer dizer que não se possam realizar ensaios com a utilização de outro tipo de feridas ou mesmo imersão em substâncias corrosivas, técnicas que possam ser mais expeditas e conduzir a resultados igualmente interessantes.

No primeiro ensaio observou-se que o descasque da base da estaca favoreceu o comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada, com 54,4 mm contra 21,5 mm nas estacas com casca, ao fim de dois meses (Tab. 3.2); os resultados obtidos no terceiro ensaio para este parâmetro foram 78,8 mm e 73,7 mm, respectivamente (Tab. 3.6), estes valores tão elevados podem ser devidos à influência indirecta do factor escurecimento, que pode ter provocado uma iniciação mais precoce das raízes do terceiro ensaio, especialmente no tratamento das estacas com casca.

Sempre que se aplicou o descasque ficou patente que a aplicação de AIB foi favorecida. Assim, enraizaram 20% ou mais quando se utilizaram ambos os tratamentos (descasque e aplicação de AIB), ao fim de três meses, para a concentração de 0,5% de AIB (Tab.^{as} 3.8 e 3.10). Para a concentração de 1% de AIB, já não se verifica o efeito positivo do descasque da estaca. A percentagem de enraizamento manteve-se praticamente invariante, com cerca de 50%, quer se retire ou não a casca (Tab. 3.8).

O descasque da estaca não teve efeitos significativos quando a auxina aplicada foi o ANA, com 37% de estacas enraizadas (Tab. 3.10).

O facto de se descascar a casca parece aumentar a sensibilidade dos tecidos à aplicação de AIB desde que se utilize a concentração e altura do ano certas. Neste caso, a aplicação de 0,5% de AIB permite um aumento nas percentagens de enraizamento das estacas postas a enraizar em Abril. Dado que não existem ensaios similares com esta espécie, referimo-nos ao trabalho de MACKENZIE e colaboradores, publicado em 1986. Neste, os autores comunicam que, em estacas de macieira, a aplicação de AIB juntamente com realização de uma ferida profunda na base da estaca, provocou um aumento na percentagem de enraizamento 17 vezes superior à não realização de ferida. As incisões parecem ter melhorado a penetração da auxina e com isso o enraizamento. Com estacas de pessegueiro, TESTOLIN *et al.* (1988) observaram 88% de enraizamento nas estacas feridas e tratadas com AIB contra 46% quando se procedia

apenas à aplicação de AIB. Além disso, a resposta variava com a altura do ano em que as estacas eram postas a enraizar. SEN & COUVILLON (1983) também com estacas de pessegueiro, verificaram que a sobrevivência destas era aumentada para o dobro se as estacas fossem feridas na base e imersas numa solução de AIB. IGLESIAS *et al.* (1989) em duas variedades de camélia com diferentes capacidades de enraizamento referem que na variedade de difícil enraizamento a realização de ferida juntamente com a aplicação de AIB favoreceu o enraizamento. No entanto, RIO *et al.* (1986), com variedades de oliveira, observaram que a realização de feridas na base da estaca, com ou sem aplicação de AIB, não influenciava o enraizamento e que, inclusivamente, surgiam problemas de apodrecimento e necrose nas estacas lesionadas, embora se formassem raízes acima da zona necrosada. Neste caso, influências ambientais ou outras podem ter favorecido o aparecimento de tecidos necrosados, ou ainda, como adiantaram os autores, pode ter havido uma relação entre as variedades de oliveira usadas e a resposta negativa obtida com este tipo de tratamento.

4.1.3. Escurecimento e estiolamento (número de dias às escuras)

A aplicação de uma banda preta na zona da planta que irá ser a futura base da estaca (escurecimento) não influenciou a quantidade nem a qualidade do enraizamento, com ou sem aplicação prévia de AIB, antes dessa operação. No entanto, verificámos alterações ao nível anatómico, logo desde muito cedo, após o início do período de enraizamento e o próprio tratamento de escurecimento induziu alterações mesmo antes da estaca ser posta a enraizar, como mostram os resultados da secção 3.2, que serão discutidos adiante.

Ao fim de três meses tinham enraizado 40 a 45% das estacas submetidas a este tratamento embora sem diferenças significativas em relação à testemunha, com 36% (Tab. 3.6). Verifica-se que este tratamento não influenciou nem o número médio de raízes formadas nem o comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada (Tab. 3.7). As estacas possuem raízes muito mais longas do que nos ensaios em que não se efectuou o escurecimento, o que pode ser devido à influência indirecta desse factor; embora o efeito simples não seja significativo, pode ter exercido uma influência indirecta em todos os outros factores.

Esta operação pretende reproduzir o processo de alporquia aérea, excluindo da influência da luz a futura base da estaca e antecipando as condições a que esta irá ser

submetida, sem os inconvenientes do método de estiolamento. De facto, o estiolamento implica a permanência dos pés-mãe às escuras durante um certo período de tempo e, após o tratamento, o *endurecimento* das plantas (submissão gradual à luz) antes de se retirarem as estacas. A permanência da planta às escuras debilita-a e torna-a mais susceptível ao ataque de

fungos ficando as estacas menos resistentes; o que pode reflectir-se, negativamente, na percentagem de enraizamento.

No entanto, há autores que referem que o potencial de enraizamento pode ser aumentado fazendo crescer as plantas, ou parte delas, às escuras. O mecanismo implicado na promoção do enraizamento é desconhecido mas pode estar relacionado com o aumento da sensibilidade das estacas (factor interno promotor ou mediador no processo de enraizamento) e/ou com alterações na estrutura anatómica (MAYNARD & BASSUK, 1988). Outros autores referem que, apesar das plantas com um menor grau de lenhificação poderem enraizar melhor, as alterações anatomo-histológicas que se verificam não devem ser consideradas como determinantes primárias do processo de enraizamento (HARTMANN & KESTER, 1983; LOVELL & WHITE, 1986). Ensaio feitos por MAYNARD & BASSUK (1988) com várias espécies demonstraram que, em geral, as percentagens de enraizamento obtidas após o estiolamento são superiores às obtidas com o escurecimento. Esses autores concluíram, após ensaios realizados com espécies do género *Quercus*, que somente a espécie *Quercus robur* L. era sensível ao escurecimento. A técnica de escurecimento, com aplicação de 0,8% de AIB na fita preta, foi utilizada durante um mês, tendo-se obtido 70% de estacas enraizadas, contra 36% da testemunha. Para as espécies *Quercus coccinea* Muenchh, *Quercus palustris* Muenchh e *Quercus rubra* L., os resultados do mesmo tratamento foram não significativos em relação à testemunha. É possível que nestes e no ensaio por nós realizado, o tempo de duração do escurecimento não tenha sido suficiente. Num trabalho publicado por VIEITEZ & VIEITEZ (1974), os autores referem que o escurecimento com folha de alumínio levou, inclusive, ao aparecimento de raízes nos rebento de touça de castanheiro, mas a duração do escurecimento foi de seis meses.

O estiolamento, com a permanência das plantas-mãe durante um certo número de dias às escuras, foi efectuado com o objectivo de aumentar a percentagem de enraizamento e verificar também qual a reacção das plantas ao ambiente de exclusão total de luz. A duração do tratamento não foi suficiente para que se tivessem obtido resultados favoráveis em relação à percentagem de enraizamento tendo-se, pelo contrário, observado que as plantas submetidas ao tratamento mais prolongado (oito dias às escuras) sofreram com a exclusão de luz de que resultou um início de ataque de fungos. De resto, a inexistência de diferenças significativas entre os tratamentos deste factor leva a crer que só se obterão resultados com um tratamento mais prolongado, mas evitando a exclusão total de luz e com acompanhamento de tratamentos anti-fúngicos (Tab. 3.3).

4.1.4. Origem da estaca

A zona do ramo de onde a estaca é retirada pode ter influência na sua capacidade de enraizamento. Em árvores adultas, sabe-se que o material proveniente das partes mais basais e interiores da copa é aquele que possui capacidade de enraizamento mais elevada. Esse facto está ligado à idade ontogénica do propágulo, isto é, ao desenvolvimento da planta quando este se formou (OLESON, 1978; MONTEUUIS, 1989). Quanto mais cedo se tiver formado o material, a partir do momento da germinação da semente, mais juvenil ele será e, portanto, tanto maior a sua capacidade de enraizamento. Isto é particularmente evidente nas espécies que rebentam de toíça ou que emitem facilmente rebentos epicórmicos; estacas com essas proveniências têm geralmente muito maior facilidade em enraizar e tanto maior quanto mais junto à raiz se situar a estaca (p.e., VIEITEZ & VIEITEZ, 1974). No presente estudo, como as estacas foram retiradas de plantas muito jovens, o gradiente ontogénico que se instala ao longo da planta ainda não se fez sentir. Por outro lado, nos ensaios em que se usou material da base e do topo da planta-mãe, os resultados relativamente à percentagem de enraizamento não foram significativamente diferentes em relação aos dois tipos de estacas (Tab.^{as} 3.1 e 3.3), bem como em relação ao NR e CMR por estaca enraizada, (Tab.^{as} 3.2 e 3.4). Isto não quer dizer que com material mais velho não se venham a verificar diferenças, especialmente quando a planta começar a emitir ramos laterais. Dos resultados obtidos pode inferir-se que, com este tipo de material, o uso de estacas de topo e da base parece ser indiferente, o que aumenta a quantidade de estacas de que podemos dispor para o enraizamento.

4.1.5. Aplicação de BAP

O facto das estacas enraizadas entrarem em dormência no fim do Verão compromete a sua sobrevivência. As estacas que não abroham após o enraizamento e que entram em dormência, têm que aguardar pela Primavera seguinte para que se dêem os novos crescimentos, o que não acontece com as estacas que enraízam antes de Julho/Agosto. Nas espécies onde se verifica este fenómeno, pode ficar comprometido o sucesso da utilização da propagação vegetativa em larga escala, mesmo que as percentagens de enraizamento obtidas sejam elevadas. Em *Acer rubrum* L., as estacas postas a enraizar em 15 de Junho não sobrevivem tão bem durante o Inverno como as estacas utilizadas em 1 de Maio (SMALLEY & DIRR, 1986). SUN & BASSUK (1991) referem que a maioria dos investigadores se preocupa com os resultados obtidos em termos de enraizamento e não com o estabelecimento posterior das estacas. É importante conseguir contornar o problema da paragem do crescimento e entrada em dormência das estacas enraizadas, o que acontece vulgarmente nas

quercíneas (EVERS *et al.* 1986; DREW & DIRR 1989), pois é geralmente elevada a mortalidade das estacas que não abroham antes do início do Outono.

Dependendo da época de realização dos ensaios, início de Abril ou fins de Junho, observaram-se diferenças consistentes quanto à sobrevivência das estacas ao fim de 5 meses. Para o ensaio efectuado em fins de Junho, morreram 24% do total de estacas enraizadas após esse tempo, enquanto nos dois ensaios realizados em Abril morreram 11% e 2%, respectivamente. Além disso e como já foi referido, sete meses após o início do ensaio realizado no Verão, 77 % das estacas enraizadas não tinham ainda abrolhado.

Considera-se que a influência dos factores ambientais (temperatura, fotoperíodo, etc.), no processo de enraizamento, são mediados pelo balanço hormonal. Ainda que o modo de acção das hormonas e a natureza da dormência da planta a nível molecular sejam fenómenos não totalmente esclarecidos, existem argumentos a favor da regulação da dormência dos gomos como resultado de um balanço entre os promotores e os inibidores endógenos do crescimento e interacção entre eles (WAREING & SAUNDERS, 1971). Vários autores argumentam que a citocinina está envolvida na indução da quebra da dormência e abrolhamento dos gomos (PILATE *et al.*, 1989; QAMARUDDIN *et al.*, 1990). O desenvolvimento dos gomos é precedido por altos níveis de citocinina endógena, o que sugere que esta hormona faça parte do mecanismo que provoca a divisão celular e outros fenómenos associados ao desenvolvimento dos gomos. Alguns autores referem que a quebra de dormência pode ocorrer após a aplicação exógena de citocininas (LITTLE, 1985; QAMARUDDIN *et al.*, 1990). POWELL (1987) coloca a hipótese de que o envolvimento das citocininas no crescimento dos gomos adventícios se baseia no facto de essas substâncias aplicadas exogenamente o estimularem. Embora o efeito da aplicação de citocininas na quebra da dormência seja incerta, parece que na maior parte dos casos o que está em causa é a existência do controle apical que pode ser contrariado pelas citocininas. No entanto, o mesmo autor refere trabalhos em que a aplicação de citocininas exógenas parece estimular gomos em paragem de crescimento.

No sobreiro, em geral, o gomo apical morre e o gomo lateral mais próximo inicia o seu crescimento o que produz um crescimento simpodial típico (NATIVIDADE, 1950). Nesta espécie a dominância apical não é tão marcada como por exemplo na maioria das coníferas.

No ensaio por nós realizado, em Janeiro fez-se a aplicação de BAP, na concentração de 100 mg l⁻¹ às plantas enraizadas no decurso do ensaio realizado no Verão. Como foi referido na Tabela 3.5, abroham 2 gomos em média, por planta, um mês após o término do ensaio, contra apenas 0,5 na testemunha. Ao fim de um mês, 49% dos verticilos de cada planta tinham gomos e ao fim de dois meses esse valor subiu para 67% contra 12 e 37% respectivamente, nas estacas não pulverizadas. No entanto, as pulverizações com BAP provocaram a morte de 28% das estacas, mais do dobro da mortalidade observada nas estacas testemunha, ao fim de dois meses, embora esses valores não representassem uma diferença estatisticamente significativa.

Podemos supor que a aplicação de BAP, nesta concentração, não teve um efeito fitotóxico sobre as estacas. TORIBIO (1986) efectuou, no Verão, um ensaio com plantas de sobreiro com seis meses de idade, em altura de paragem de crescimento. O investigador verificou, para além da ausência de toxicidade, haver um efeito do aumento da concentração de BAP aplicado exogenamente, sobre a percentagem de gomos abrolhados por planta, em relação ao número de verticilos; para a concentração máxima utilizada, que foi aproximadamente 50 mg^l⁻¹, 30% das axilas tinham gomos abrolhados ao fim de um mês.

SMITH & SCHWABE (1984) usaram BAP, para estimular o abrolhamento de estacas enraizadas de *Quercus robur* L, com uma concentração muito baixa, 10 ppm (0,01 mg^l⁻¹) e observaram um efeito positivo na quebra da dormência e crescimento das estacas mas não anotaram o número de gomos estimulados.

Dos resultados obtidos e referidos pode considerar-se ser importante estudar a influência de diferentes concentrações de BAP e aplicando as pulverizações antes da entrada em dormência das estacas, de modo a permitir uma avaliação objectiva da mortalidade e do seu efeito no abrolhamento dos gomos

4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PROCESSO RIZOGÉNICO

Através da observação microscópica do material, que se apresenta nas Figuras 3.5 e 3.6, verificou-se existirem diferenças profundas nas secções basais das estacas sujeitas aos diferentes tratamentos de escurecimento efectuados previamente ao enraizamento. No entanto, a aplicação da banda preta com ou sem AIB não influenciou a quantidade nem a qualidade do enraizamento (Tab.^{as} 3.6 e 3.7). Como vimos (secção 4.1.3.), MAYNARD & BASSUK (1988) utilizando uma metodologia de escurecimento que reproduzimos nos nossos ensaios e trabalhando com outras espécies de carvalhos, também não conseguiram percentagens de enraizamento significativamente diferentes da testemunha, excepto para a espécie *Quercus robur* L. Mas VIEITEZ & VIEITEZ, (1974) utilizando o castanheiro obtiveram percentagens de enraizamento mais elevadas com uma duração mais prolongada do escurecimento. RINALLO *et al.* (1987) também usaram o castanheiro e verificaram que as estacas submetidas ao tratamento prévio de escurecimento mostravam primórdios radiculares e uma percentagem de enraizamento mais elevada relativamente às estacas testemunha. Podemos deduzir que, com a realização de ensaios nos mesmos moldes do efectuado por nós mas com uma duração mais prolongada, se venham a obter resultados significativos relativamente à capacidade de enraizamento das estacas. Com efeito a observação microscópica das estacas sujeitas aos diferentes tratamentos revelou alterações mais precoces nas amostras referentes aos tratamentos com escurecimento, com ou sem aplicação de AIB na fita preta, e uma nítida

rediferenciação dos tecidos, para além da modificação ao nível do anel de fibras perivasculares (Tab. 3.11).

DOUD & CARLSON (1977) em ramos estiolados de macieira observaram um menor grau de esclerificação e uma maior capacidade de enraizamento, do que os ramos que cresceram à luz. A este propósito convém referir a afirmação de BEAKBANE (1961) segundo a qual um anel contínuo de fibras perivasculares pode constituir uma barreira ao desenvolvimento das raízes. Num estudo anatómico efectuado com *Quercus robur* L. *in vitro*, SAN-JOSÉ *et al.* (1992) demonstraram que os primórdios radiculares se formam, geralmente, ao nível deste anel, aproveitando as suas descontinuidades. Outros ensaios feitos com espécies lenhosas sugerem que as baixas percentagens de enraizamento podem estar associadas a barreiras mecânicas, embora não seja de excluir que as dificuldades de enraizamento devam estar associadas em primeiro lugar, às condições fisiológicas e genéticas que induzem a iniciação dos primórdios (HARTMANN & KESTER, 1983; LOVELL & WHITE, 1986; FJELL, 1987)

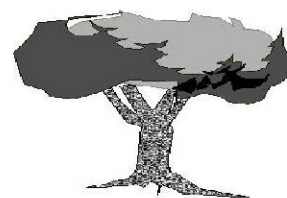
As características anatómicas verificadas e apresentadas nas Figuras 3.7-B e 3.8, são semelhantes às encontradas em rebentos de castanheiro sujeitos à exclusão da luz na sua base (escurecimento), sobretudo a nível da região perifloémica, pois no controle o anel de fibras e escleritos é contínuo enquanto que nos rebentos tratados, o anel perifloémico se apresenta interrompido, quase sem escleritos diferenciados e com abundante produção de células parenquimatosas (VIEITEZ & VIEITEZ; 1974; RINALLO *et al.*, 1987). As mesmas alterações foram observadas em estacas de aveleira tratadas com AIB além de um aumento na largura radial do floema (RODRIGUEZ *et al.* 1988). Alguns investigadores afirmaram que este tipo de modificações anatómicas, especialmente a proliferação de células de parênquima, são necessárias para que se possam iniciar os primórdios radiculares (BLAZICH & HEUSER, 1979). MACKENZIE *et al.* (1986) referiram que o aparecimento de alterações profundas e de formação de *callus* na estaca parece ser um requisito para a formação de raízes e observaram a regeneração da região cambial antes do aparecimento das iniciais dos primórdios radiculares.

Para o sobreiro, a antecipação das alterações estruturais quando acompanhada de um aparecimento mais precoce de primórdios radiculares, pode ser um passo fundamental para o aumento da percentagem de enraizamento, já que uma das restrições para o aumento do número de estacas enraizadas é a grande duração do período de enraizamento e a dificuldade em manter as estacas em boa condição fisiológica durante todo o tempo em que as raízes não aparecem. Nas secções transversais das estacas não foi possível identificar o aparecimento dos primórdios radiculares. Tal facto pode dever-se a vários factores: i) formação, em geral, de poucas raízes por estaca, ii) duração insuficiente do ensaio com a retirada das últimas amostras ao fim de 20 dias, e iii) baixas percentagens de enraizamento obtidas ao fim de um mês. Seria interessante poder acompanhar o enraizamento das estacas desta espécie, do ponto de vista anatómico, mas durante mais tempo, em função das informações recolhidas a partir dos ensaios

realizados. VIEITEZ e colaboradores (1980) acompanharam durante 27 dias as alterações anatómicas da base de estacas provenientes de plantas de castanheiro com dois meses, postas a enraizar após tratamento com AIB e ANA. Os autores observaram a formação de primórdios ao fim de 5 dias assim como a diferenciação de novo xilema. Ao fim de 11 dias os primórdios tinham a sua forma bem definida e após 14 dias algumas das raízes tinham emergido e as outras já tinham atingido a zona do córtex. As plantas de castanheiro utilizadas eram três meses mais jovens do que as plantas de sobreiro que usámos mas é possível que existam diferenças entre o castanheiro e o sobreiro relativamente ao período de tempo requerido para o início da formação dos primórdios.

Da observação das amostras verifica-se ainda que o aparecimento de alterações estruturais ocorre primeiro ao nível do nó junto à base da estaca (Tab. 3.11). Este facto, parece indicar uma eventual relação entre a permanência do nó na base e o enraizamento da estaca.

5. CONCLUSÕES



5. CONCLUSÕES

Os ensaios que realizámos ao longo de dois anos sucessivos permitem-nos extrair algumas conclusões relativamente ao enraizamento da espécie *Quercus suber* L. que procurámos sistematizar ao longo de todo o texto mas que não queremos deixar de sintetizar e realçar nos seus aspectos mais relevantes, para além de tentarmos avançar novas perspectivas de investigação.

⇒ **Ensaio de enraizamento:**

- i) **A aplicação de AIB na base da estaca conduz a melhores percentagens de enraizamento e de sobrevivência relativamente à testemunha, se a época de enraizamento for Abril. Na época de fins de Junho a capacidade de resposta das estacas relativamente à aplicação de AIB não é diferente da testemunha.**
- ii) **Ao fim de dois meses, independentemente da época de enraizamento utilizada, a aplicação de AIB parece não ter influência no número de raízes formadas por estaca enraizada, mas sim no comprimento da maior raiz.**
- iii) **O uso de ANA na concentração de 0,1% não conduz a resultados significativamente diferentes da testemunha em relação à quantidade e qualidade do enraizamento.**
- iv) **A operação de descasque da base da estaca influencia positivamente a percentagem de enraizamento e contribui para a sobrevivência das estacas enraizadas.**

- v) A aplicação de AIB na concentração de 0,5% parece ser favorável ao enraizamento quando as estacas são descascadas, conduzindo a percentagens de enraizamento superiores a 60%, após de três meses de ensaio.

- vi) A técnica de escurecimento não altera a quantidade nem a qualidade do enraizamento em relação à testemunha. Conduz, no entanto, a modificações na estrutura da estaca mesmo antes desta ser posta a enraizar, especialmente quando se aplica AIB à base da futura estaca juntamente com a banda preta.

- vii) O tratamento de escurecimento parece ter influenciado o comprimento da maior raiz das estacas a que não se aplicou auxina e também aquelas que não foram descascadas.

- viii) O tratamento de estiolamento não teve resultados favoráveis no enraizamento e, no tratamento mais prolongado, as plantas-mãe ficaram debilitadas por um início de ataque de fungos.

- ix) A origem da estaca também não conduz a resultados significativamente diferentes relativamente à percentagem de enraizamento. Esta observação indica-nos que, com este tipo de material, usar estacas de topo ou da base é indiferente, o que duplica a quantidade de material que podemos dispor para a propagação vegetativa.

- x) Sobrevivem menos estacas quando se usa uma época vegetativa mais tardia (fins de Junho) em relação aos ensaios realizados em Abril.

- xi) A aplicação de BAP estimula favoravelmente o abrolhamento de gomos axilares das estacas que tinham entrado em dormência logo após o enraizamento, evitando uma mortalidade elevada

⇒ Acompanhamento do processo rizogénico em cortes histológicos:

- i) No dia zero observam-se diferenças na estrutura das secções basais das estacas após a utilização do método de escurecimento (com ou sem aplicação de AIB) durante um mês, relativamente à testemunha. As modificações surgem inicialmente a nível do nó, com formação de uma estrutura do tipo *callus* e observam-se também ao nível da periderme e do xilema.

- ii) O prolongamento da permanência das estacas na bancada de enraizamento acentua as diferenças a nível estrutural, entre as estacas sujeitas ao escurecimento, especialmente se este foi efectuado com aplicação de AIB (*Banda+AIB*).
- iii) Nas estacas testemunha (*Sem Banda*) com ou sem aplicação de AIB, praticamente não se observaram alterações estruturais, mesmo depois de 20 dias na bancada de enraizamento.
- iv) No dia 20, as estacas sujeitas ao tratamento *Banda+AIB* com ou sem aplicação posterior de AIB, mostraram as maiores alterações da estrutura, com perda do padrão anatómico normal, com formação abundante de *callus*, interrupções ou mesmo desaparecimento do anel de fibras perivasculares e proliferação de células de parênquima especialmente a nível do córtex e floema secundário.
- v) As alterações estruturais devidas ao factor escurecimento parecem ser mais evidentes do que as devidas à aplicação de AIB, à base da estaca antes de esta ser posta a enraizar.
- vi) De um modo geral, as modificações estruturais, em qualquer dos tratamentos aplicados, foram primeiro visíveis na zona do nó e só depois na zona do entrenó

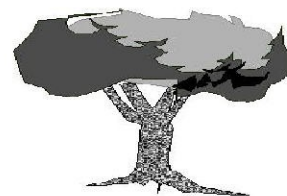
⇒ **Recomendações para futuras linhas de investigação:**

Parece conveniente realizar novos ensaios com o objectivo de esclarecer melhor o processo de enraizamento, nomeadamente os seguintes:

- i) Relação da época do ano com a resposta das estacas à aplicação de AIB
- ii) Tratamentos com outras auxinas, em especial o ANA, em diferentes concentrações.
- iii) Realização de outro tipo de feridas na base da estaca.
- iv) Pulverizações com BAP em diferentes concentrações antes das estacas entrarem em dormência.
- v) Prolongamento da duração do período de escurecimento e observação da sua influência na qualidade e quantidade do enraizamento.

- vi) Utilização de estiolamento de preferência sem a exclusão total de luz e com acompanhamento de tratamentos anti-fúngicos.**
- vii) Influência da permanência de um nó na base da estaca sobre a percentagem de enraizamento.**
- viii) Aplicação de outras condições de enraizamento: a) substrato; b) nevoeiro *versus* nebulização intermitente; c) número de folhas da estaca e seu comprimento; d) duração e influência do tratamento anti-fúngico.**
- ix) Acompanhamento anatómico do processo rizogénico em tempos superiores a 20 dias.**
- x) Análise da sobrevivência futura das estacas estabelecidas no campo e comparação com plantas provenientes de semente.**
- xi) Aplicação da metodologia apurada a estacas provenientes de pés-mãe originados a partir de plantas adultas, através de cultura de tecidos, de amontôa ou enxertia.**
- xii) Verificação da manutenção da capacidade de enraizamento nos rebentos de touça de pés-mãe.**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANÓNIMO 1982. Propagação Vegetativa do *Eucalyptus globulus* Labill. Enraizamento de estacas CELBI (ed.). Figueira da Foz. 12 pp.**
- ARBEZ M. 1982. Oak breeding in France: Objectives and first results. Reunion Tecnica Principios de Introduccion de Especies. IUFRO. Lourizan. 13 pp.**
- AYALA J.F., KIGER J.A. 1984. Modern genetics. 2th ed. Benj. Cumm. Publ. Comp. Califórnia. 923 pp.**
- AZEVEDO O. 1992. Da evolução da vegetação florestal em portugal. D.G.F. Informação. 9:3-4.**
- BEAKBANE A.B. 1961. Structure of the plant stem in relation to adventitious rooting. *Nature*. 192(4806):954-955.**
- BELLAROSSA R. 1981. In vitro culture of *Quercus suber* L. embryos. *Proc. Coll. Int. Cul. in vitro des Essences Forestières*. pp.119-125. AFOCEL. Fontainebleau..**
- BERTHON J.Y., MALDINEY R., SOTTA B., GASPAR T., BOYER N. 1989. Endogenous levels of plant hormones during the course of adventitious rooting in cuttings of *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) in vitro. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 184:405-412.**
- BLAZICH F., HEUSER C.W. 1979. A histological study of adventitious root initiation in mung bean cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104(1):63-67.**

- BLAZICH F., WRIGHT R.D., SHAFFER H.E. 1983. Mineral nutrient status of "Convexa" holly cuttings during intermitent mist propagation as influenced by exogenous auxin application. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108(3):425-429.**
- BLAZICH F. 1988. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. *In Adventitious Root Formation in Cuttings*, T. Davies, B.E. Haissig, N. Sankhla, eds., pp 132-149, Dicorides Press. Portland.**
- BONGA J.M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. *In Tissue Culture in Forestry*, J.M. Bonga, D.J. Durzan, eds., pp.387-412. Martinus Nijhoff Publishers. Dorderecht.**
- BOULAY M. 1979. Multiplication et clonage rapide du *Sequoia sempervirens* par la culture *in vitro*. *Études et Recherches*.12:49-55.**
- BRAUN-BLANQUET J., PINTO DA SILVA A.R., ROZEIRA A. 1956. Resultats de deux excursions geobotaniques a travers le Portugal septentrional et moyen. II. Chenaies a feuilles caduques (*Quercion occidentale*) et chenaies a feuilles persistantes (*Quercion fagineae*) au Portugal. *Agronomia Lusitana*. 18(3):167-235.**
- BURDON R.D., SHELBORNE C.J. 1974. The use of vegetative propagules for obtaining genetic information. *N. Z. J. For. Sci.* 4(2):418-425.**
- BURDON R.D. 1982. The roles and optimal place of vegetative propagation on tree breeding strategies. *Proc. of the IUFRO Jonit Meet. of Work. Part. on Gen. about Bree. Strat. Incl. Multiclonaal Var.* pp. 66-83. Lower Saxony Forest Research Institute. Esherode.**
- BUTTING S.C., REGO F.C. 1988. Human impact on Portugal's vegetation. *Rangelands*. 10(6):251-255.**
- CABRAL M.T., SARDINHA R.M.A. 1992. Prespectiva integrada do declinio dos montados de sobro alentejanos. 2º Encontro dos Montados de Sobro e Azinho. pp.217-231. Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais. Évora.**
- CABRAL M.T. 1993. Protecção integrada dos montados. *Floresta e Ambiente*. 22:47-50.**

- CALDAS C.C. 1978. A agricultura portuguesa no limiar da reforma agrária. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 258 pp.**
- CASTRO L.F.T.1989. Izoenzimas do *Pinus pinaster* Ait. numa prespectiva de aplicação ao melhoramento genético da espécie. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.**
- CASTROVIEJO S., LAÍNIZ M., LÓPEZ GONZÁLEZ G., MONSERRAT P., MUÑOZ GARMENDIA F., PAIVA J., VILLAR L. (Eds.). 1990. Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Peninsula Ibérica e Islas Baleares. Vol. II. Real Jardín Botánico. Madrid. 897 pp.**
- CAUVIN B. 1981. Réjuvénilization, multiplication d'ortets séniles - *Eucalyptus*. *Annales de Recherches Sylvicoles*. pp.73-105.**
- CORNU C., DELGRAN S., GARBAYE J., LE TACON F. 1977. Recherches des meilleures conditions d'enracinement des boutures herbacées de chêne rouvre (*Quercus petraea* Liebl.) et de hêtre (*Fagus sylvatica* L.). *Ann. Sci. For.* **34(1):1-16.****
- CORREIA C.A.P. 1954. Estudos sobre o sobreiro em Portugal. *Boletim da Junta Nacional da Cortiça*. **200: 217-220.****
- CORREIA C.A.P. 1981. Aspectos suberícolas. A investigação ao serviço de uma subericultura renovada. *Boletim do Instituto dos Produtos Florestais. Cortiça*. **511:112-118.****
- CRUZ C.S. 1986. Algumas considerações sobre a vegetação natural potencial. 1º Congresso Florestal Nacional. pp. 230-238. Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais Lisboa.**
- DAGNELIE P. 1973. Estatística. Teoria e métodos. Vol. II Publicações Europa-América. Lisboa. 535 pp.**
- DAVID A. 1982. In vitro propagation of angiosperms. In *Tissue Culture in Forestry*, J.M. Bonga, D.J. Durzan, eds., Martinus Nijhoff Publishers., Dordrecht.**
- DAVIES F.T. 1984. Shoot RNA, cambial activity and indolebutyric acid effectivity in seasonal rooting of juvenile and mature *Ficus pumila* cuttings. *Physiol. Plant.* **62:571-575.****

- DEHGAN B., ALMIRA M., GOOCH M., SHEEHAN T. 1989. Vegetative propagation of Florida native plants: IV. *Quercus* spp. (oaks). *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 102:260-264.**
- DEIDDA P., AZZENA M., COINU G. 1988 *In vitro* plantelet regeneration from *Quercus suber* L. seedlings. *Acta Horticulturae.* 227:393-395.**
- DIRECÇÃO GERAL DAS FLORESTAS (DGF). 1990. A propos du liège ...M.A.P.A. Lisboa. 13 pp.**
- DIRECÇÃO GERAL DAS FLORESTAS (DGF). 1992. Le Portugal, pays de forêts. Lisboa. 60 pp.**
- DIRECÇÃO GERAL DAS FLORESTAS (DGF). 1993. A distribuição da floresta em Portugal Continental. Áreas florestais por distritos. *Estudos e Informação.* 303.**
- DOUD J.L., CARLSON R.F. 1977. Effects of etiolation, stem anatomy and starch reserves on root initiation of layered *Malus* clones. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102(4):487-491.**
- DREW J.J., DIRR M.A. 1989. Propagation of *Quercus* L. species by cuttings. *J. Environ. Hort.* 7(3):115-117.**
- DRUART P., KEVERS C., BOXUS P., GASPARD T. 1982. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots during darkness effect on endogenous phenols and peroxidase. *Z. Pflanzenphysiol.* 108:429-436.**
- ENESCU V., ENESCU V. 1988. Short note: research studies on oak cutting (*Quercus robur* L.): Premises for the improvement based on clonal selection. *Silvae Genetica.* 37:3-4.**
- EVERS P., DONKERS J., PRATT A., VEMEER E. 1986. Micropropagation of forest trees through tissue culture. Final Report in the EEC Program - *Wood as Renewable Raw Material - Growers Introduction to an Adaptation of Tissue Culture Biotechnology to Forest Tree Propagation.* Dorchkam. Wageningen. 103 pp.**
- FALCONER D.S. 1974. Introduction a la génétique quantitative. Masson. Paris. 284pp.**

- FAVRE J.M. 1977. Rizogenèse et bouturage. In *La Multiplication Vegetative des Plantes Superieures*, C. Bigout, ed., pp.51-75, Gautiers-Villars, Paris.**
- FERRAZ J.F.P., MOREIRA A.C. 1993. O declínio dos sobreiros. *Floresta e Ambiente*. 21:59-60.**
- FJELL I. 1987. Structure and development of adventitious roots in *Salix caprea* and *S. caprea* x *S. viminalis*. *Nord. J. Bot.* 7(3):311-323.**
- FRANCLET A. 1977. Manipulation des pieds-mères et amélioration des qualités des boutures. *Études et Recherches*. 8. 20 pp.**
- FRANCLET A. 1980. Rajeunissement et propagation végétative des ligneux. *Annales de Recherches Sylvicoles*. pp.11-41.**
- FRANCLET A. 1981. La motte de culture melfert. *Information Forêt*. 1(165):1-15.**
- FRANCLET A. 1982. Rajeunissement et micropropagation des ligneux. *Proc. IUFRO Int. Workshop In Vitro Cultivation For. Tree Species*. pp.55-64. Foitanebleau.**
- FRANCLET A. 1983. Rejuvenation: Theory and practical experiences in clonal silviculture. *Proc. 19th Meet. Can. Tree Impro. Asso.* pp.96-134. Toronto.**
- FRANCO J.A. 1943. Dendrologia Florestal. Edições AGROS. Lisboa. 244 pp.**
- FRANCO J.A. 1971. Nova flora de Portugal (Continente e Açores). Vol I. Lisboa. 247 pp.**
- GASPAR T., COUMANS M. 1987. Root formation. In *Cell and Tissue Culture in Forestry*, J.M. Bonga, D.J. Durzan, eds., Vol.2, pp. 202-217, Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.**
- GASPAR T., HOFINGER M. 1988. Auxin metabolism during adventitious rooting. In *Adventitious Root Formation in Cuttings*, T. Davies, B.E. Haissig, N. Sankhla, eds., pp 117-131, Dicorides Press. Portland.**
- GASPAR T., KEVERS C., HAUSMAN J.F., BERTHON J.Y, RIPETTI V. 1992. Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie*. 12:757-765.**

- GRAÇA J., BARROS L., PEREIRA H. 1985. Importância da produção de cortiça de qualidade para a indústria transformadora. *Boletim do Instituto dos Produtos Florestais. Cortiça.* 566:697-707.**
- GRAÇA J., PEREIRA H. 1993. Formação e desenvolvimento da primeira periderme no sobreiro. Relações com as características da cortiça amadia. Relatório sobre a qualidade e processamento da cortiça. I.S.A. Lisboa. 28 pp.**
- GOES E. 1991. A floresta portuguesa. Portucl. Lisboa. 259 pp.**
- GOMES A.L. 1986. O sobreiro. Linhas básicas para a definição da estratégia do seu melhoramento genético. 1ª Congresso Florestal Nacional. pp.110-112. Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais. Lisboa.**
- GOMES A.L. 1989. Regeneração e melhoramento genético do montado de sobro. *Workshop sobre Identificação de Prioridades e Recursos de I & D sobre Cortiça.* pp. 67-78. Fundação Luso Americana para o Desenvolvimento. Lisboa.**
- GONÇALVES J.C., RAINHO C.T. 1992. Micropropagação do sobreiro (*Q. suber* L.) por rebentamento axilar. 2º Encontro Sobre Montados de Sobro e Azinho. pp.109-118. Universidade de Évora. Évora.**
- GONÇALVES J.C., RAINHO C.T. 1993. Efecto de algunos macronutrientes y del AIB en el enraizamiento *in vitro* del alcornoque (*Q. suber* L.) y en su posterior aclimatation. *Congreso Forestal Español.* 2:331-336. Xunta de Galicia. Pontevedra.**
- GONZÁLEZ A., RODRÍGUEZ R., SÁNCHEZ-THAMÉS R. 1991. Ethylene and *in vitro* rooting of hazelnut (*Corylus avellana*) cotyledones. *Physiol. Plant.* 81:227-233.**
- GUIJARRO F.R., CELESTINO C., TORIBIO M. 1993. Obtención de plantas a partir de embriones somáticos de *Quercus suber* L. *Congreso Forestal Español.* 2:337-341. Xunta de Galicia. Pontevedra.**
- HACKETT W.P. 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Hortic. Revue.* 7:109-105.**

- HAISSIG B.E. 1972. Meristematic activity during adventitious root primordium development. *Plant Physiol.* 49:886-892.**
- HAISSIG B.E. 1982. Carbohydrate and aminoacid concentration during adventitious root formation and development in *Pinus banksiana* Lamb. *Forest Sci.* 28(4):813-821.**
- HAISSIG B.E. 1986. Metabolic processes in adventitious rooting. In *New Root Formation in Plants and Cuttings*, M.B. Jackson, ed., pp.141-189, Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.**
- HANSEN O.B. 1989. Propagating apple rootstocks by semi-hardwood cuttings. *Norwegian Journ. Agri. Sci.* 3:351-365.**
- HARTMANN H.T. KESTER D.E. 1983. Plant propagation: principles and practices. 4th ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs. 727 pp.**
- HARTNEY V.J. 1980. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. *Aust. Jour. Res.* 10:191-211.**
- HOWARD B.H., HARRISON-MURRAY R.S. 1985. Optimising the rooting response of stem cuttings to applied auxin. In *Growth Regulators in Horticulture*, R. Menhennett, M.B. Jackson, eds., pp. 101-111. Monograph 13. British Plant Regulator. Wantage.**
- IGLESIAS I., MANTILLA J.L.G., DÍAZ T., GONZÁLEZ E. 1989. Effects of propagation media and carriers on the rooting of *Camelia reticulata* Lindley variety Captain Rawes. *Acta Horticulturae.* 246:171-174.**
- JACQUIOT C. 1952. Sur les phénomènes d'histogenèse observés dans la culture *in vitro* de tissu cambial de chênes (*Quercus sessiflora* Sm., *Q. pedunculata* Ehrl., *Q. suber* L.). *C. R. Acad. Sci. Paris.* 234:1468-1470.**
- JARVIS B.C. 1986. Endogenous control of adventitious in non-woody cuttings. In *New Root Formation in Plants and Cuttings*, M.B. Jackson, ed., pp.191-222, Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.**
- JENSEN W.A. 1962. *Botanical histochemistry*. W.H.Freeman and Company. S.Francisco. 408 pp.**

- KLEINSCHMIT J. 1977. Problems of vegetative reproduction. *Third World Consultation of Forest Tree Breeding*, pp.1-10, FAO/IUFRO. Canberra.**
- KLEINSCHMIT J. 1983. Concepts and experiences in clonal plantation of conifers. *Proc. 19th Meet. Can. Tree Impro. Asso.* pp.26-56. Toronto.**
- KLEINSCHMIT J. 1985. Juvenility and serial vegetative propagation of norway spruce clones (*Picea abies* Karst.). *Silvae Genetica*. 34(1):42-48.**
- LABEL P., CORNU D., SOTTA B., MIGINAC E. 1989. Internal levels of plant growth regulators during *in vitro* culture of wild cherry (*Prunus avium* L.). *Ann. Sci. For.* 46(Supl.):117-120.**
- L'HELGOUAL'CH M., ESPAGNAC H. 1987. Premières observations sur les capacités de rizogénèse adventive du chêne vert (*Quercus ilex* L.). *Ann. Sci. For.* 44(3):325-334.**
- LIBBY W.J., BROWN A.J., FIELDING J.M. 1972. Effects of hedging radiata pine on production, rooting and early growth of cuttings. *N. Z. J. For. Sci.* 2(2).263-283.**
- LIBBY W.J. 1983. Potential of clonal forestry. *Proc. 19th Meet. Can. Tree Impro. Asso.* pp.1-11. Toronto.**
- LIBBY W.J., RAUTER R.M. 1984. Advantages of clonal forestry. *Forestry Chronicle*. 60(3):145-149.**
- LITTLE C.H.A. 1985. Increasing lateral shoot production in Balsam Fir Christmas trees with cytokinin application. *Hortscience*. 20(4):713-714.**
- LOVELL P.H., WHITE J. 1986. Anatomical changes during adventitious root formation. In *New Root Formation in Plants and Cuttings*, M.B. Jackson, ed., pp. 111-140, Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.**
- MAËTAOUI M.E., ESPAGNAC H. 1987. Néof ormation des stures de type embryons somatiques sur des cultures de tissus de chêne liège (*Quercus suber* L.). *C.R. Acad. Sci. Paris. Série III*, 304(3):83-88.**

- MACKENZIE K.A.D., HOWARD B.H., HARRISON-MURRAY R.S. 1986.** The anatomical relationship between cambial regeneration and root initiation in wounded winter cuttings of apple rootstock M.26. *Ann. Bot.* **58:649-661.**
- MALDINEY R., PELÈSE F., PILATE G., SOTTA B., SOSSOUNTZOV L., MIGINAC E. 1986.** Endogenous levels of abscisic acid, indole-3-acetic acid, zeatin and zeatin ribose during the course of adventitious root formation in cuttings of *Craigella* lateral supressor tomatoes. *Physiol. Plant.* **68:426-430.**
- MANZANERA J.A., PARDOS J.A. 1990.** Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* **21:1-8.**
- MARQUES J.J., REIS R.G. 1987.** Propagação vegetativa do sobreiro. *Enxertia. Boletim do Instituto dos Produtos Florestais. Cortiça.* **583:13-14.**
- MARTIN B., PRATT D. 1985.** Biotechnologie et forêt. Quelle place pour la forèsterie clonale ? *Biofutur.* **pp.1-9.**
- MATTOSO A.G. 1947.** O sobreiro. Da humildade à opulência. *Boletim da Junta Nacional da Cortiça.* **103:341-346.**
- MAYNARD B.K., BASSUK N.L. 1988.** Etiolation and banding effects on adventitious root formaton. *In New root Formation in Plants and Cuttings*, M.B. Jackson, ed., pp.29-46, Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.
- MONCOUSIN C., FAVRE J.M., GASPAR T. 1988.** Changes in peroxidase activity and endogenous IAA levels during adventitious root formation in vine cuttings. *In Physiology and Biochemistry of Auxin in Plants* , R.S. Bandurski, J. Krekule, eds, pp. 331-337, Academie. Prague.
- MONTEUUIS O. 1984.** La multiplication du sequoia geant en vue du clonage. *Annales de Recherches Sylvicoles.* **pp.140-171.**
- MONTEUUIS O. 1989.** Maturation concepts and possible rejuvenation of arborescent species. Limits and promises of shoot apical meristems to ensure successful cloning. *Proc. Breed. Trop. Trees: Pop. Strut. and Gen. Improv. Strat. in Clon. and Seedl. For.* **pp.106-118. Pataya.**

- MUDGE K.W. 1988. Effect of ethylene on rooting. In Adventitious Root Formation in Cuttings, T. Davies, B.E. Haissig, N. Sankhla, eds., pp 150-161, Dicorides Press. Portland.**
- NATIVIDADE J.V. 1934. Cortiças. Contribuição para estudo do melhoramento da qualidade. Publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas. 1(1):1-143.**
- NATIVIDADE J.V. 1938. Alguns problemas da propagação vegetativa das espécies lenhosas. Separata da Agros. 21(2):41-52.**
- NATIVIDADE J.V. 1950. Subericultura. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas. Lisboa. 387 pp.**
- NEVES C.M.B. 1949. A seca dos sobreiros. Gazeta das Aldeias. 2168:730-734.**
- NÓBREGA F. 1992. Polimorfismo enzimático do sobreiro. 2º Encontro sobre os Montados de Sobro e Azinho. pp. 373-380. Universidade de Évora. Évora.**
- NORDSTRÖM A.C., ELIASSON L. 1991. Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspatic acid during adventitious root formation in pea cuttings. Physiol. Plant. 82:599-605.**
- NOGUEIRA C.D.S. 1989. Técnicas culturais, exploração e protecção. Identificação de Prioridades e Recursos de I & D sobre Cortiça. pp.45-66. Fundação Luso Americana para o Desenvolvimento. Lisboa.**
- OLESON P.O. 1978. On ciclofisis and topofisis. Silvae Genetica. 27(5):173-178.**
- PARDOS J.R. 1981. In vitro plants formation from stem pieces of Quercus suber L. Proc. Coll. Int. Cul. in vitro des Essences Forestières. pp. 186-190. AFOCEL. Fontainebleau..**
- PATON D.M., WILING R.R., PRYOR L.D. 1981 Root shoot gradients in Eucalyptus ontogeny. Ann. Bot. 47: 835-838.**
- PILATE G., SOTTA B., MALDINEY R., JAQUES M., SOSSOUNTZOV L., MIGINAC E. 1989. Absisic acid, indole-3-acetic acid and cytokinin changes in buds of Pseudotsuga menziesii during bud quiescence release. Physiol. Plant. 76:100-106.**

- PIMENTEL A.A.L. 1946. O sobreiro também é parasitado pela *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis., agente da doença da tinta do castanheiro. Publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas 13(1-2):45-49.**
- PINTO M.J., SOARES J. 1987. O sobreiro e a cortiça em Portugal. Boletim do Instituto dos Produtos Florestais. Cortiça. 584: 143-150.**
- POWEL L.E. 1987. The hormonal control of bud and seed dormancy in woody plants. In Plants Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. P.J. Davies, ed., pp.539-552, Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.**
- PSOTA V. 1987. Rhizogenesis of stem cuttings in *Alnus glutinosa* (L.) Gaerth. and *Quercus robur* L. species as related to dormancy and plant growth regulator. Acta Universitatis Agriculturae. 35(3-4):27-44.**
- QAMARUDDIN M., DORMLING I., ELIASSON L. 1990. Increases in cytokinin levels in Scots Pine in relation to chilling and bud burst. Physiol. Plant. 79:236-241.**
- RAUTER R.M. 1983. Current status of macropropagation. Proc. 19th Meet. Can. Tree Impro. Assn. pp.58-74. Toronto.**
- RIBEIRO M.M., 1993. Maturação e propagação vegetativa em espécies florestais. Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Castelo Branco. 53 pp.**
- RIBEIRO O. 1987. Portugal o mediterrâneo e o atlântico. Livraria Sá da Costa. Lisboa. 188 pp.**
- RINALLO R., GELLINI R., FABBRI A. 1987. Studies on rhizogenesis in *Castanea sativa* Mill. cuttings. Adv. Hort. Sci. 1:27-33.**
- RIO C. DEL, CABALLERO J.M., RALLO L. 1986. Influencia de las incisiones basales sobre la variacion estacional del enraizamiento de estaquillas de *Picual y Gordal sevillana*. Olea. 17:27-29.**
- RODRIGUES J.F. 1989. Montado de sobreiro. Workshop sobre Identificação de Prioridades e Recursos de I & D sobre Cortiça. pp.35-44. Fundação Luso Americana para o Desenvolvimento. Lisboa.**

- RODRIGUEZ A., ALBUERNE M., SANCHEZ-TAMÉS R. 1988. Rooting ability of *Corylus avellana* L.: macromorphological and histological studies. *Scientia Horticulturae*. 35:131-142.**
- ROLDÃO I.F. 1987. Propagação vegetativa - estacaria do sobreiro. *Boletim do Instituto dos Produtos Florestais. Cortiça*. 583:11-12.**
- ROLDÃO IF. 1990. Macropropagação vegetativa do sobreiro. 2º Congresso Florestal Nacional. pp.477-481. Fundo Europeu de Orientação e Garantia Agrícola. Porto.**
- ROLDÃO I.F., ALPUIM M.H., BOHM J. 1992. Considerações sobre os resultados já obtidos na propagação vegetativa do sobreiro. *Scientia Gerundensis*. 18:85-89.**
- ROMANO A., MARTINS-LOUÇÃO M.A. 1992. Micropropagation of mature cork oak (*Quercus suber* L.): Establishment problems. *Scientia gerundensis*. 18:17-27.**
- ROMANO A., NORONHA C., CAÇORINHO A.I., MARTINS-LOUÇÃO M.A. 1992. Técnicas de propagação aplicadas ao melhoramento do sobreiro. 2º Encontro dos Montados de Sobre e Azinho. pp. 196-202. Universidade de Évora. Évora.**
- SAMPAIO J.S. 1977. À la recherche d'une politique économique pour le liège au Portugal. Grafitécnica Editora. Lisboa. 243 pp.**
- SAMPAIO J.S. 1989. O sobreiro, a cortiça e o homem. Aspectos económicos do caso português. Workshop para a Identificação de Prioridades e Recursos de I & D sobre Cortiça. pp.35-44. Fundação Luso Americana para o Desenvolvimento. Lisboa.**
- SAN-JOSÉ M.C., VIDAL N., BALLESTER A. 1992. Anatomical and biochemical changes during root formation in oak and apple shoots cultured *in vitro*. *Agronomie*. 12:767-774.**
- SEN S.M., COUVILLON G.A. 1983. Factors affecting survival of *in field* rooted hardwood peach cuttings. *Hortscience*. 18(3):324-325.**
- SHANKHLA N., UPADHYAYA A. 1988. Poliamines and adventitious root formation. In *Adventitious Root Formation in Cuttings*, T. Davies, B.E. Haissig, N. Sankhla, eds., pp 202-213, Dicorides Press. Portland.**

- SMALLEY T., DIRR M. 1986. The overwinter problem of rooted cuttings. *The Plant Propagator*. 32(3):10-14.**
- SMITH D.J., SCHWABE W.W. 1984. Acceleration of early growth of seedlings and rooted cuttings of *Quercus robur* L. *Forestry*. 57(2):143-157.**
- SOKAL R., RHOLF J. 1981. Biometry. 2th ed. W.H. Freeman and Company. New York. 859 pp.**
- STEEL R.G., TORRIE J.H. 1981. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2th ed. McGraw-Hill. Singapore. 633 pp.**
- SUN W.Q., BASSUK N.L. 1991. Effects of banding and AIB on rooting and budbreak in cuttings of apple rootstock MM.106 and *Franklinia*. *J. Environ. Hort.* 91(1):40-43.**
- TESTOLIN R., AVANZATO D., COUVILLON G.A. 1988. Rooting peach by malet cuttings. *Acta Horticulturae*. 227:224-299.**
- TORIBIO M. 1986. Rejuvenescimiento de tejidos de especies leñosas. Inducción de la brotación en *Quercus suber* L. mediante tratamientos con benziladenina. 1º Congreso Florestal Nacional. pp.124-127. Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais. Lisboa.**
- THULIN I.J., FAULDS T. 1968. The use of cuttings in the breeding and afforestation of *Pinus radiata*. *N. Z. Jour. For.* 13(1):66-77.**
- VALDECANTOS J.L.G. 1992. Las técnicas de selección y propagación en la mejora genética del alcornoque. *Scientia Gerundensis*. 18:11-15.**
- VIEITEZ A.M., VIEITEZ E. 1974. Efecto de la etiolación en la rizogénesis de *Castanea sativa* Mill. *Anales de Edafología y Agrobiología*. 33:955-956.**
- VIEITEZ A.M., BALLESTER A., GARCIA M.T., VIEITEZ E. 1980. Starch depletion and anatomical changes during the rooting of *Castanea sativa* Mill. cuttings. *Scientia Horticulturae*. 13:261-266.**

WAREING PF., SAUDERS P.F. 1971. Hormones and dormancy. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 22:261-288.

WEISMAN Z., RIOV J., EPSTEIN E. 1989. Characterization and rooting ability of indole-3-butyric acid conjugates formed during rooting of mung bean cuttings. *Plant. Physiol.* 91:1080-1084.

ZOBEL B., IKEMORI Y.K. 1983. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. *Proc. 19th Meet. Can. Tree Impro. Assn.* pp.136-144. Toronto.

ZOBEL B., TALBERT J. 1984. Applied forest tree improvement. John Wiley & Sons. New York. 505 pp.

ANEXO I- Análises de variância

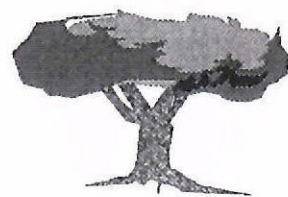


Tabela I.1 - Análise de Variância para o 1ºensaio, em relação à percentagem de enraizamento ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.2434896	3	.0811632	3.896	.0176
B:Origem	.0013021	1	.0013021	.062	.8068
C:Casca	.2200521	1	.2200521	10.562	.0027
INTERACÇÕES					
AB	.1705729	3	.0568576	2.729	.0602
AC	.1809896	3	.0603299	2.896	.0503
BC	.0013021	1	.0013021	.063	.8068
ABC	.0039063	3	.0013021	.062	.9792
RESIDUAL	.6666667	32	.0208333		
TOTAL (CORRIGIDO)	1.4882813	47			

Tabela I.2 - Análise de Variância para o 1ºensaio, em relação à percentagem de enraizamento ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.5455729	3	.1818576	4.505	.0096
B:Origem	.0013021	1	.0013021	.032	.8605
C:Casca	.2200521	1	.2200521	5.452	.0260
INTERACÇÕES					
AB	.0768229	3	.0256076	.634	.5983
AC	.1289063	3	.0429688	1.065	.3779
BC	.0638021	1	.0638021	1.581	.2178
ABC	.0976563	3	.0325521	.806	.4996
RESIDUAL	1.2916667	32	.0403646		
TOTAL (CORRIGIDO)	2.4257813	47			

Tabela I.3 - Análise de Variância para o 1ºensaio, em relação à percentagem de enraizamento ao fim de 3 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.8580729	3	.2860243	3.723	.0211
B:Origem	.0638021	1	.0638021	.831	.3786
C:Casca	.1575521	1	.1575521	2.051	.1618
INTERACÇÕES					
AB	.0039063	3	.0013021	.017	.9969
AC	.1393229	3	.0464410	.605	.6169
BC	.1575521	1	.1575521	2.051	.1618
ABC	.0976563	3	.0325521	.424	.7373
RESIDUAL	2.4583333	32	.0768229		
TOTAL (CORRIGIDO)	3.9361979	47			

Tabela I.4 - Análise de Variância para o 1ºensaio, em relação à sobrevivência ao fim de 5 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.8177083	3	.2725694	3.489	.0268
B:Origem	.0833333	1	.0833333	1.067	.3094
C:Casca	.0833333	1	.0833333	1.067	.3094
INTERACÇÕES					
AB	.0312500	3	.0104167	.133	.9395
AC	.0520833	3	.0173611	.222	.8802
BC	.1302083	1	.1302083	1.667	.2060
ABC	.0468750	3	.0156250	.200	.8956
RESIDUAL	2.5000000	32	.0781250		
TOTAL (CORRIGIDO)	3.7447917	47			

Tabela I.5 - Análise de Variância para o 1º ensaio, em relação à percentagem de estacas mortas ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0989583	3	.0329861	1.490	.2359
B:Origem	.0833333	1	.0833333	3.765	.0612
C:Casca	.0208333	1	.0208333	.941	.3495
INTERACÇÕES					
AB	.1250000	3	.0416667	1.882	.1524
AC	.1041667	3	.0347222	1.569	.2161
BC	.0468750	1	.0468750	2.118	.1554
ABC	.0572917	3	.0190972	.863	.4704
RESIDUAL	.7083333	32	.0221354		
TOTAL (CORRIGIDO)	1.2447917	47			

Tabela I.6 - Análise de Variância para o 1º ensaio, em relação à percentagem de estacas mortas ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0768229	3	.0256076	.756	.5268
B:Origem	.1575521	1	.1575521	4.654	.0386
C:Casca	.1054687	1	.1054687	3.115	.0871
INTERACÇÕES					
AB	.1184896	3	.0394965	1.167	.3377
AC	.1705729	3	.0568576	1.679	.1910
BC	.0325521	1	.0325521	.962	.3446
ABC	.0976563	3	.0325521	.962	.4220
RESIDUAL	1.0833333	32	.0338542		
TOTAL (CORRIGIDO)	1.8424479	47			

Tabela I.7 - Análise de Variância para o 1º ensaio, em relação à percentagem de estacas mortas ao fim de 3 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.2395833	3	.0798611	1.917	.1467
B:Origem	.1302083	1	.1302083	3.125	.0866
C:Casca	.2552083	1	.2552083	6.125	.0188
INTERACTIONS					
AB	.0677083	3	.0225694	.542	.6573
AC	.1093750	3	.0364583	.875	.4643
BC	.0208333	1	.0208333	.500	.4921
ABC	.1354167	3	.0451389	1.083	.3701
RESIDUAL	1.3333333	32	.0416667		
TOTAL (CORRECTED)	2.2916667	47			

Tabela I.8 - Análise de Variância para o 1º ensaio, em relação à percentagem de estacas com callus, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.2018229	3	.0672743	1.099	.3637
B:Origem	.4700521	1	.4700521	7.681	.0092
C:Casca	.0013021	1	.0013021	.021	.8865
INTERACÇÕES					
AB	.2955729	3	.0985243	1.610	.2064
AC	.8476563	3	.2825521	4.617	.0086
BC	.2929688	1	.2929688	4.787	.0361
ABC	.1184896	3	.0394965	.645	.5916
RESIDUAL	1.9583333	32	.0611979		
TOTAL (CORRIGIDO)	4.1861979	47			

Tabela I.9 - Análise de Variância para o 1ºensaio, em relação à percentagem de estacas com callus, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.3854167	3	.1284722	2.819	.0546
B:Origem	.3333333	1	.3333333	7.314	.0109
C:Casca	.0000000	1	.0000000	.000	1.0000
INTERACÇÕES					
AB	.0520833	3	.0173611	.381	.7674
AC	.2187500	3	.0729167	1.600	.2087
BC	.1875000	1	.1875000	4.114	.0509
ABC	.3437500	3	.1145833	2.514	.0760
RESIDUAL	1.4583333	32	.0455729		
TOTAL (CORRIGIDO)	2.9791667	47			

Tabela I.10 - Análise de Variância para o 1ºensaio, em relação à percentagem de estacas com callus, ao fim de 3 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.5559896	3	.1853299	3.472	.0273
B:Origem	.0117188	1	.0117188	.220	.6476
C:Casca	.0117187	1	.0117187	.220	.6476
INTERACÇÕES					
AB	.0664063	3	.0221354	.415	.7436
AC	.0039063	3	.0013021	.024	.9947
BC	.0638021	1	.0638021	1.195	.2825
ABC	.1393229	3	.0464410	.870	.4668
RESIDUAL	1.7083333	32	.0533854		
TOTAL (CORRIGIDO)	2.5611979	47			

Tabela I.11 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação à percentagem de enraizamento, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0044444	2	.0022222	.121	.8861
B:Origem	.0450000	1	.0450000	2.455	.1238
C:Escuro	.0683333	3	.0227778	1.242	.3047
INTERACÇÕES					
AB	.0400000	2	.0200000	1.091	.3441
AC	.0400000	6	.0066667	.364	.8983
BC	.0194444	3	.0064815	.354	.7868
ABC	.1822222	6	.0303704	1.657	.1524
RESIDUAL	.8800000	48	.0183333		
TOTAL (CORRIGIDO)	1.2794444	71			

Tabela I.12 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação à percentagem de enraizamento, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.1411111	2	.0705556	1.245	.2970
B:Origem	.1800000	1	.1800000	3.176	.0810
C:Escuro	.2244444	3	.0748148	1.320	.2787
INTERACÇÕES					
AB	.0233333	2	.0116667	.206	.8146
AC	.4055556	6	.0675926	1.193	.3262
BC	.3044444	3	.1014815	1.791	.1615
ABC	.2655556	6	.0442593	.781	.5889
RESIDUAL	2.7200000	48	.0566667		
TOTAL (CORRIGIDO)	4.2644444	71			

Tabela I.13 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação à percentagem de enraizamento, ao fim de 3 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0700000	2	.0350000	.521	.5974
B:Origem	.1605556	1	.1605556	2.388	.1288
C:Escuro	.4372222	3	.1457407	2.168	.1040
INTERACÇÕES					
AB	.0144444	2	.0072222	.107	.8983
AC	.2677778	6	.0446296	.664	.6790
BC	.1038889	3	.0346296	.515	.6738
ABC	.1544444	6	.0257407	.383	.8863
RESIDUAL	3.2266667	48	.0672222		
TOTAL (CORRIGIDO)	4.4350000	71			

Tabela I.14 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação à sobrevivência, ao fim de 5 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0077778	2	.0038889	.071	.9318
B:Origem	.1250000	1	.1250000	2.273	.1382
C:Escuro	.3883333	3	.1294444	2.354	.0838
INTERACÇÕES					
AB	.0700000	2	.0350000	.636	.5336
AC	.3433333	6	.0572222	1.040	.4113
BC	.0594444	3	.0198148	.360	.7819
ABC	.3255556	6	.0542593	.987	.4449
RESIDUAL	2.6400000	48	.0550000		
TOTAL (CORRIGIDO)	3.9594444	71			

Tabela I.15 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação à percentagem de estacas mortas, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0077778	2	.0038889	1.750	.1847
B:Origem	.0022222	1	.0022222	1.000	.3223
C:Escuro	.0044444	3	.0014815	.667	.5766
INTERACÇÕES					
AB	.0011111	2	.0005556	.250	.7798
AC	.0055556	6	.0009259	.417	.8643
BC	.0111111	3	.0037037	1.667	.1866
ABC	.0122222	6	.0020370	.917	.4913
RESIDUAL	.1066667	48	.0022222		
TOTAL (CORRIGIDO)	.1511111	71			

Tabela I.16 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação à percentagem de estacas mortas, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0077778	2	.0038889	.467	.6299
B:Origem	.0050000	1	.0050000	.600	.4506
C:Escuro	.0105556	3	.0035185	.422	.7379
INTERACTIONS					
AB	.0033333	2	.0016667	.200	.8194
AC	.0411111	6	.0068519	.822	.5583
BC	.0327778	3	.0109259	1.311	.2817
ABC	.0188889	6	.0031481	.378	.8896
RESIDUAL	.4000000	48	.0083333		
TOTAL (CORRIGIDO)	.5194444	71			

Tabela I.17 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação à percentagem de estacas mortas, ao fim de 3 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0344444	2	.0172222	.705	.4994
B:Origem	.0200000	1	.0200000	.818	.3798
C:Escuro	.0111111	3	.0037037	.152	.9282
INTERACÇÕES					
AB	.0233333	2	.0116667	.477	.6234
AC	.1122222	6	.0187037	.765	.6009
BC	.0111111	3	.0037037	.152	.9282
ABC	.1588889	6	.0264815	1.083	.3858
RESIDUAL	1.1733333	48	.0244444		
TOTAL (CORRIGIDO)	1.5444444	71			

Tabela I.18 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação à percentagem de estacas com callus, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0144444	2	.0072222	.186	.8311
B:Origem	.0138889	1	.0138889	.357	.5593
C:Escuro	.1083333	3	.0361111	.929	.4342
INTERACÇÕES					
AB	.0077778	2	.0038889	.100	.9050
AC	.1366667	6	.0227778	.586	.7399
BC	.0950000	3	.0316667	.814	.4923
ABC	.1166667	6	.0194444	.500	.8052
RESIDUAL	1.8666667	48	.0388889		
TOTAL (CORRIGIDO)	2.3594444	71			

Tabela I.19 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação à percentagem de estacas com callus, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0833333	2	.0416667	.789	.4599
B:Origem	.1088889	1	.1088889	2.063	.1574
C:Escuro	.1355556	3	.0451852	.856	.4703
INTERACÇÕES					
AB	.0411111	2	.0205556	.389	.6795
AC	.3477778	6	.0579630	1.098	.3772
BC	.4111111	3	.1370370	2.596	.0631
ABC	.1588889	6	.0264815	.502	.8039
RESIDUAL	2.5333333	48	.0527778		
TOTAL (CORRIGIDO)	3.8200000	71			

Tabela I.20 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação à percentagem de estacas com callus, ao fim de 3 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	.0300000	2	.0150000	.314	.7320
B:Origem	.0355556	1	.0355556	.744	.4018
C:Escuro	.3244444	3	.1081481	2.264	.0930
INTERACÇÕES					
AB	.1144444	2	.0572222	1.198	.3108
AC	.1522222	6	.0253704	.531	.7819
BC	.1022222	3	.0340741	.713	.5489
ABC	.1477778	6	.0246296	.516	.7936
RESIDUAL	2.2933333	48	.0477778		
TOTAL (CORRIGIDO)	3.2000000	71			

Tabela I.21 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação à percentagem de enraizamento, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	.0435556	2	.0217778	1.361	.2629
B:Casca	.0444444	1	.0444444	2.778	.0999
C:Auxina	.2782222	2	.1391111	8.694	.0004
INTERACÇÕES					
AB	.0382222	2	.0191111	1.194	.3088
AC	.1191111	4	.0297778	1.861	.1266
BC	.0008889	2	.0004444	.028	.9726
ABC	.0924444	4	.0231111	1.444	.2282
RESIDUAL	1.1520000	72	.0160000		
TOTAL (CORRIGIDO)	1.7688889	89			

Tabela I.22 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação à percentagem de enraizamento, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	.0862222	2	.0431111	.942	.3947
B:Casca	.4840000	1	.4840000	10.573	.0017
C:Auxina	.5262222	2	.2631111	5.748	.0048
INTERACÇÕES					
AB	.1146667	2	.0573333	1.252	.2920
AC	.3937778	4	.0984444	2.150	.0833
BC	.1706667	2	.0853333	1.864	.1624
ABC	.1466667	4	.0366667	.801	.5285
RESIDUAL	3.2960000	72	.0457778		
TOTAL (CORRIGIDO)	5.2182222	89			

Tabela I.23 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação à percentagem de enraizamento, ao fim de 3 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	.1128889	2	.0564444	1.008	.3701
B:Casca	.4840000	1	.4840000	8.643	.0044
C:Auxina	.5662222	2	.2831111	5.056	.0088
INTERACÇÕES					
AB	.0506667	2	.0253333	.452	.6379
AC	.4284444	4	.1071111	1.913	.1176
BC	.1626667	2	.0813333	1.452	.2408
ABC	.1226667	4	.0306667	.548	.7013
RESIDUAL	4.0320000	72	.0560000		
TOTAL (CORRIGIDO)	5.9595556	89			

Tabela I.24 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação à sobrevivência, ao fim de 5 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	.1342222	2	.0671111	1.248	.2932
B:Casca	.5760000	1	.5760000	10.711	.0016
C:Auxina	.5662222	2	.2831111	5.264	.0073
INTERACÇÕES					
AB	.0720000	2	.0360000	.669	.5152
AC	.3857778	4	.0964444	1.793	.1395
BC	.1626667	2	.0813333	1.512	.2273
ABC	.1493333	4	.0373333	.694	.5984
RESIDUAL	3.8720000	72	.0537778		
TOTAL (CORRIGIDO)	5.9182222	89			

Tabela I.25 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação à percentagem de estacas mortas, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	.0106667	2	.0053333	1.333	.2700
B:Casca	.0004444	1	.0004444	.111	.7434
C:Auxina	.0026667	2	.0013333	.333	.7176
INTERACÇÕES					
AB	.0035556	2	.0017778	.444	.6429
AC	.0026667	4	.0006667	.167	.9546
BC	.0008889	2	.0004444	.111	.8950
ABC	.0151111	4	.0037778	.944	.4434
RESIDUAL	.2880000	72	.0040000		
TOTAL (CORRIGIDO)	.3240000	89			

Tabela I.26 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação à percentagem de estacas mortas, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	.1608889	2	.0804444	4.415	.0155
B:Casca	.0751111	1	.0751111	4.122	.0460
C:Auxina	.0435556	2	.0217778	1.195	.3086
INTERACÇÕES					
AB	.0382222	2	.0191111	1.049	.3557
AC	.1991111	4	.0497778	2.732	.0355
BC	.0435556	2	.0217778	1.195	.3086
ABC	.1031111	4	.0257778	1.415	.2378
RESIDUAL	1.3120000	72	.0182222		
TOTAL (CORRIGIDO)	1.9755556	89			

Tabela I.27 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação à percentagem de estacas mortas, ao fim de 3 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	.1608889	2	.0804444	2.642	.0781
B:Casca	.2151111	1	.2151111	7.066	.0097
C:Auxina	.0435556	2	.0217778	.715	.4925
INTERACÇÕES					
AB	.2142222	2	.1071111	3.518	.0348
AC	.3537778	4	.0884444	2.905	.0275
BC	.0808889	2	.0404444	1.328	.2713
ABC	.1457778	4	.0364444	1.197	.3196
RESIDUAL	2.1920000	72	.0304444		
TOTAL (CORRIGIDO)	3.4062222	89			

Tabela I.28 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação à percentagem de estacas com callus, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	.0462222	2	.0231111	.867	.4247
B:Casca	.1777778	1	.1777778	6.667	.0119
C:Auxina	.1528889	2	.0764444	2.867	.0634
INTERACÇÕES					
AB	.5368889	2	.2684444	10.067	.0001
AC	.0151111	4	.0037778	.142	.9661
BC	.0142222	2	.0071111	.267	.7667
ABC	.3831111	4	.0957778	3.592	.0100
RESIDUAL	1.9200000	72	.0266667		
TOTAL (CORRIGIDO)	3.2462222	89			

Tabela I.29 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação à percentagem de estacas com callus, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	.0506667	2	.0253333	.559	.5743
B:Casca	.0017778	1	.0017778	.039	.8457
C:Auxina	.1786667	2	.0893333	1.971	.1468
INTERACÇÕES					
AB	.6035556	2	.3017778	6.657	.0022
AC	.1866667	4	.0466667	1.029	.3981
BC	.0808889	2	.0404444	.892	.4143
ABC	.1297778	4	.0324444	.716	.5839
RESIDUAL	3.2640000	72	.0453333		
TOTAL (CORRIGIDO)	4.4960000	89			

Tabela I.30 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação à percentagem de estacas com callus, ao fim de 3 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	.0168889	2	.0084444	.212	.8092
B:Casca	.0640000	1	.0640000	1.609	.2087
C:Auxina	.3048889	2	.1524444	3.832	.0262
INTERACÇÕES					
AB	.5146667	2	.2573333	6.469	.0026
AC	.5164444	4	.1291111	3.246	.0166
BC	.0666667	2	.0333333	.838	.4368
ABC	.1146667	4	.0286667	.721	.5806
RESIDUAL	2.8640000	72	.0397778		
TOTAL (CORRIGIDO)	4.4622222	89			

Tabela I.31 - Análise de Variância para o 1ºensaio, em relação ao número médio de raízes, por estaca enraizada, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:IBA	18.706349	3	6.235450	1.601	.2408
B:Origem	11.443522	1	11.443522	2.939	.1122
C:Casca	.899874	1	.899874	.231	.6444
RESIDUAL	46.728033	12	3.8940028		
TOTAL (CORRIGIDO)	77.777778	17			
174 valores em falta foram excluídos.					

Tabela I.32 - Análise de Variância para o 1ºensaio, em relação ao número médio de raízes, por estaca enraizada, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	14.815459	3	4.938486	.483	.6964
B:Origem	15.163443	1	15.163443	1.483	.2320
C:Casca	26.551280	1	26.551280	2.597	.1166
INTERACÇÕES					
AB	41.823750	3	13.941250	1.363	.2710
AC	.555719	3	.185240	.018	.9966
BC	2.948766	1	2.948766	.288	.6006
RESIDUAL	337.44593	33	10.225634		
TOTAL (CORRIGIDO)	439.30435	45			
146 valores em falta foram excluídos.					

Tabela I.33 - Análise de Variância para o 1º ensaio, em relação ao comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	346.53968	3	115.51323	1.402	.2902
B:Origem	103.82060	1	103.82060	1.260	.2837
C:Casca	71.70361	1	71.70361	.870	.3791
RESIDUAL	989.04722	12	82.420602		
TOTAL (CORRIGIDO)	1511.1111	17			
174 valores em falta foram excluídos.					

Tabela I.34 - Análise de Variância para o 1º ensaio, em relação ao comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:IBA	24217.440	3	8072.480	2.840	.0529
B:Origem	5574.315	1	5574.315	1.961	.1707
C:Casca	13234.772	1	13234.772	4.656	.0383
INTERAÇÕES					
AB	17888.913	3	5962.9711	2.098	.1194
AC	3098.163	3	1032.7209	.363	.7799
BC	69.154	1	69.1545	.024	.8787
RESIDUAL	93793.699	33	2842.2333		
TOTAL (CORRIGIDO)	157876.46	45			
146 valores em falta foram excluídos.					

Tabela I.35 - Análise de Variância para o 2º ensaio, em relação ao número médio de raízes, por estaca enraizada, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:IBA	6.4255744	2	3.2127872	2.285	.1204
B:Origem	.7536653	1	.7536653	.536	.4779
C:Escuro	5.7402081	3	1.9134027	1.361	.2750
RESIDUAL	39.366267	28	1.4059381		
TOTAL (CORRIGIDO)	52.285714	34			
325 valores em falta foram excluídos.					

Tabela I.36 - Análise de Variância para o 2º ensaio, em relação ao número médio de raízes, por estaca enraizada, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	9.0582206	2	4.5291103	1.289	.2792
B:Origem	1.3046022	1	1.3046022	.371	.5499
C:Escuro	8.5053925	3	2.8351308	.807	.4924
INTERAÇÕES					
AB	12.741586	2	6.3707930	1.812	.1673
AC	17.312181	6	2.8853635	.821	.5557
BC	26.986295	3	8.9954318	2.559	.0579
ABC	33.054240	6	5.5090401	1.567	.1617
RESIDUAL	456.94008	130	3.5149237		
TOTAL (CORRIGIDO)	565.90260	153			
206 valores em falta foram excluídos.					

Tabela I.37 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação ao comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	4.3419620	2	2.1709810	1.266	.3073
B:Origem	3.6438850	1	3.6438850	2.124	.1632
C:Escuro	2.1640139	3	.7213380	.421	.7406
INTERACÇÕES					
AB	5.329373	2	2.6646867	1.553	.2401
AC	17.709277	6	2.9515461	1.721	.1767
BC	3.517726	3	1.1725752	.684	.5742
RESIDUAL	29.160621	17	1.7153306		
TOTAL (CORRIGIDO)	65.866857	34			
325 valores em falta foram excluídos.					

Tabela I.38 - Análise de Variância para o 2ºensaio, em relação ao comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:AIB	7897.6798	2	3948.8399	2.972	.0547
B:Origem	248.0686	1	248.0686	.187	.6710
C:Escuro	6278.4055	3	2092.8018	1.575	.1985
INTERACÇÕES					
AB	4090.958	2	2045.4790	1.539	.2184
AC	6819.966	6	1136.6609	.855	.5297
BC	1547.558	3	515.8527	.388	.7617
ABC	10642.517	6	1773.7529	1.335	.2462
RESIDUAL	172735.50	130	1328.7346		
TOTAL (CORRIGIDO)	210260.66	153			
206 valores em falta foram excluídos.					

Tabela I.39 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação ao número médio de raízes, por estaca enraizada, ao fim de 1 mês

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	163.89879	2	81.949393	1.745	.1900
B:Casca	.12422	1	.124219	.003	.9598
C:Auxina	74.52385	2	37.261924	.793	.4606
RESIDUAL	1597.0531	34	46.972151		
TOTAL (CORRIGIDO)	1835.6000	39			
410 valores em falta foram excluídos.					

Tabela I.40 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação ao número médio de raízes, por estaca enraizada, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	10.390073	2	5.195036	.268	.7655
B:Casca	8.960381	1	8.960381	.462	.5053
C:Auxina	57.677541	2	28.838770	1.487	.2303
INTERACÇÕES					
AB	18.426457	2	9.213229	.475	.6231
AC	55.783347	4	13.945837	.719	.5807
BC	11.174008	2	5.587004	.288	.7503
ABC	30.282962	4	7.570741	.390	.8153
RESIDUAL	2308.5753	119	19.399792		
TOTAL (CORRIGIDO)	2501.2701	136			
313 valores em falta foram excluídos.					

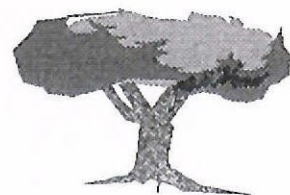
Tabela I.41 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação ao comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada, ao fim de 1 mês.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	1681.4786	2	840.73931	3.052	.0604
B:Casca	132.3014	1	132.30142	.480	.5003
C:Auxina	165.8412	2	82.92059	.301	.7420
RESIDUAL	9365.4788	34	275.45526		
TOTAL (CORRIGIDO)	11345.100	39			
410 valores em falta foram excluídos.					

Tabela I.42 - Análise de Variância para o 3ºensaio, em relação ao comprimento médio da maior raiz, por estaca enraizada, ao fim de 2 meses.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Pr>F
EFEITO MÉDIO					
A:Banda	4399.2121	2	2199.6061	.860	.4257
B:Casca	5325.1910	1	5325.1910	2.082	.1517
C:Auxina	4412.9146	2	2206.4573	.863	.4246
INTERACÇÕES					
AB	6337.394	2	3168.6969	1.239	.2934
AC	5248.137	4	1312.0342	.513	.7263
BC	40.258	2	20.1289	.008	.9922
ABC	23212.364	4	5803.0910	2.269	.0658
RESIDUAL	304336.89	119	2557.4529		
TOTAL (CORRIGIDO)	353312.36	136			
313 valores em falta foram excluídos.					

ANEXO II- Interacções



Tab. II.1 - Interação entre a aplicação de AIB e a retirada da casca, na percentagem de formação de callus ao fim de 1 mês, para o primeiro ensaio.

AIB (%)	0	0,5	1	2
Casca				
inteira	81	71	78	42
retirada	83	58	46	79

LSD (5%)=29; LSD (1%)=39; LSD (0,1%)=51

Tab. II.2 - Interação entre a aplicação de AIB e a retirada da casca, na percentagem de enraizamento ao fim de 1 mês, para o primeiro ensaio.

AIB (%)	0	0,5	1	2
Casca				
inteira	0	8	4	4
retirada	8	21	38	4

LSD (5%)=17; LSD (1%)=23; LSD (0,1%)=30

Tab. II.3 - Interação entre a origem da estaca e a retirada da casca, na percentagem de formação de callus ao fim de 1 mês, para o primeiro ensaio.

Origem	topo	base
Casca		
inteira	48	83
retirada	65	69

LSD (5%)=21; LSD (1%)=28; LSD (0,1%)=37

Tab. II.4 - Interação entre a origem da estaca e a retirada da casca, na percentagem de formação de callus ao fim de 2 meses, para o primeiro ensaio.

Origem	topo	base
Casca		
inteira	38	67
retirada	50	54

LSD (5%)=18; LSD (1%)=24; LSD (0,1%)=32

Tab. II.5 - Interação entre o escurecimento e a retirada da casca, na percentagem de formação de callus ao fim de 1 mês, para o terceiro ensaio.

Escurecimento	Banda+AIB	Com Banda	Sem Banda
Casca			
inteira	83	75	59
retirada	75	80	88

LSD (5%)=12; LSD (1%)=16; LSD (0,1%)=21

Tab. II.6 - Interação entre o escurecimento e a retirada da casca, na percentagem de formação de callus ao fim de 2 meses, para o terceiro ensaio.

Escurecimento	Banda+AIB	Com Banda	Sem Banda
Casca			
inteira	61	52	36
retirada	41	49	56

LSD (5%)=15; LSD (1%)=21; LSD (0,1%)=27

Tab. II.7 - Interação entre o escurecimento e a retirada da casca, na percentagem de enraizamento ao fim de 3 meses, para o terceiro ensaio.

Escurecimento	Banda+AIB	Com Banda	Sem Banda
Casca			
inteira	51	33	31
retirada	24	37	37

LSD (5%)=15; LSD (1%)=19; LSD (0,1%)=24

Tab. II.8 - Interação entre o escurecimento e a retirada da casca, na percentagem de estacas mortas ao fim de 3 meses, para o terceiro ensaio.

Escurecimento	Banda+AIB	Com Banda	Sem Banda
Casca			
inteira	20	28	37
retirada	24	11	21

LSD (5%)=13; LSD (1%)=17; LSD (0,1%)=22

Tab. II.9 - Interação entre o escurecimento e a aplicação de auxina, na percentagem de formação de callus ao fim de 3 meses, para o terceiro ensaio.

Escurecimento	Banda+AIB	Com Banda	Sem Banda
Auxina			
Sem auxina	34	42	44
0,5% AIB	22	30	30
0,1% ANA	56	34	23

LSD (5%)=18; LSD (1%)=24; LSD (0,1%)=31

Tab. II.10 - Interação entre o escurecimento e a aplicação de auxina, na percentagem de estacas mortas ao fim de 2 meses, para o terceiro ensaio.

Escurecimento	Banda+AIB	Com Banda	Sem Banda
Auxina			
Sem auxina	4	20	14
0,5% AIB	10	2	16
0,1% ANA	10	10	24

LSD (5%)=12; LSD (1%)=16; LSD (0,1%)=21



Tab. II.11 - Interação entre o escurecimento e a aplicação de auxina, na percentagem de estacas mortas ao fim de 3 meses, para o terceiro ensaio.

Escurecimento	Banda+AIB	Com Banda	Sem Banda
Auxina			
Sem auxina	22	32	24
0,5% AIB	26	8	28
0,1% ANA	18	18	36

LSD (5%)=16; LSD (1%)=21; LSD (0,1%)=27

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 LABORATÓRIO DE GENÉTICA
 2012

ERRATA

	Onde se lê	Deve ler-se
Pag. 11	foi referida com	foi referida como
Pag. 24		
Pag. 32	após o escurecimento, ...	após o escurecimento, que durou 1 mês, ...
Pag. 51	estacas postas a enraizar	estacas enraizadas ao fim de três meses
Pag. 62	refere 49 %	refere 50 %
Pag. 64	BLAZICH (1983)	BLAZICH (1988)