

**Telmo Manuel Ferreira Eleutério**

***Viburnum treleasei* Gand.:**

**Efeito do tipo e da concentração das citocininas e das auxinas na  
proliferação, enraizamento e aclimação de rebentos com origem em  
embriões germinados *in vitro*.**



**Universidade dos Açores**

**Departamento de Biologia**

**Ponta Delgada**

**2015**



**Telmo Manuel Ferreira Eleutério**

***Viburnum treleasei* Gand.:**

**Efeito do tipo e da concentração das citocininas e das auxinas na  
proliferação, enraizamento e aclimatação de rebentos com origem em  
embriões germinados *in vitro*.**

Dissertação apresentada à Universidade dos Açores, no âmbito do Mestrado de Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal para efeitos de obtenção do grau de Mestre no Ramo de Biologia, Especialidade Biotecnologia Vegetal.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria João Bornes  
Teixeira Pereira Trota

Universidade dos Açores  
Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2015

‘Preservar a biodiversidade é respeitar todos os mecanismos que favorecem a existência Humana.’

José Aloísio Portes

## Agradecimentos

À minha orientadora Maria João Pereira, por ser incansável, e por todo apoio e ajuda prestada desde que sou aluno do Departamento de Biologia, que sem a qual não teria realizado esta dissertação.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Monica Moura pela ajuda prestada com as burocracias da candidatura do mestrado.

Aos técnicos de laboratório, por me ajudarem a manter o laboratório em excelentes condições.

A todos os professores do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal da Universidade dos Açores

A todos os professores que me acompanharam durante toda a minha jornada na Universidade dos Açores como aluno de Biologia, que me ajudaram a crescer academicamente.

Aos meus colegas de Mestrado, por todas as horas de trabalhos e discussões interessantes sobre os mais diversos tópicos das aulas.

A todos os meus amigos que estiveram comigo durante esta jornada em especial Ângela Vieira, Diogo Pavão, Joana Cabral e João Pedro Fontes pela paciência que tiveram comigo.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, sem os quais eu não seria quem sou hoje. Eu adoro-vos.

# Índice

Resumo.....	11
Introdução .....	12
Enquadramento .....	12
Caracterização Geral da espécie.....	13
Taxonomia.....	13
Descrição Morfológica.....	13
Ecologia e Distribuição da espécie.....	14
Estatuto de Conservação .....	15
Utilizações Actuais.....	15
Cultura <i>in vitro</i> .....	15
Objectivo do trabalho .....	17
Metodologia .....	19
Origem, colheita e armazenamento do material vegetal .....	19
Isolamento dos embriões.....	19
Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i> .....	20
Proliferação das culturas .....	21
Fase de Enraizamento.....	21
Aclimação.....	22
Recolha dos Dados e Tratamento Estatístico .....	23
Resultados .....	24
Germinação de embriões <i>in vitro</i> .....	24
Efeito das citocininas na fase proliferativa.....	24
Efeito da subcultura na fase proliferativa.....	26
Efeito das auxinas na fase de enraizamento .....	28
Efeito das citocininas usadas na fase proliferativa na fase de enraizamento.....	29
Efeito das citocininas usadas na fase proliferativa na fase de aclimação .....	30
Discussão.....	31
Teste de germinação.....	31
Efeito das citocininas na fase proliferativa.....	32
Efeito das auxinas na fase de enraizamento .....	33

Efeito das citocininas usadas na fase proliferativa na fase de enraizamento.....	33
Efeito da interacção das citocininas e auxinas na aclimação.....	34
Conclusão.....	35
Bibliografia .....	36
Anexos.....	41
Anexo 1 – Preparação de 1 l e 500 ml do meio WPM. SM = Solução-Mãe.....	41
Anexo 2 – Preparação das soluções-mãe (S-M) do meio WPM. ....	42
Anexo 3 – Fase Proliferativa (SPSS) .....	43
Anexo 4 – Subculturas (SPSS).....	48
Anexo 5 – Enraizamento (SPSS) .....	63
Anexo 6 – Aclimação (SPSS) .....	65

## Resumo

Este trabalho possui como objectivo geral, otimizar o protocolo de proliferação, enraizamento e aclimação de culturas de *Viburnum treleasei* Gand., estabelecidas a partir de embriões germinados *in vitro*, para tal foi testado: **a)** o efeito de concentrações crescentes de Zeatina, N6[2-isopentenil]adenina (2-iP) e 6-benzyladenine (BA) nas características do desenvolvimento dos explantados em duas subculturas da fase proliferativa; **b)** o efeito da subcultura nas características do desenvolvimento dos explantados na fase proliferativa; **c)** o efeito de concentrações crescentes do ácido nafenacetico (NAA), do ácido 3-indolbutirico (IBA), do ácido 3-indolacético (IAA) no enraizamento dos rebentos; **d)** o efeito das citocininas (2-iP 24,6 µM, e Zeatina 22,81 µM) usadas na fase proliferativa no enraizamento dos rebentos com NAA (5,37 µM); **e)** o efeito das citocininas (2-iP 24,6 µM, e Zeatina 22,81 µM) usadas na fase proliferativa na aclimação dos rebentos. Na fase proliferativa o melhor desenvolvimento foi obtido nos meios suplementados com Zeatina 22,81 µM, e 2-iP 24,6 µM. Na fase de enraizamento a melhor resposta foi obtida no meio suplementado com NAA 5,37 µM. Finalmente, na fase de aclimação, a sobrevivência e desenvolvimento das plantas foi significativamente superior naquelas que foram transferidas diretamente de meios suplementados com citocininas na fase proliferativa, para o meio com auxina na fase de enraizamento.

**Palavras-chaves:** Açores, conservação, espécie endémica; germinação de embriões; micropropagação; Zeatina; BA; IAA; IBA; 2iP; NAA.



## Introdução

### Enquadramento

Os Açores são um arquipélago isolado de nove ilhas localizado no Atlântico Norte, numa zona de tripla junção de placas, nomeadamente a Placa Americana, a Euroasiática e a Africana (França *et al.*, 2005). Em conjunto com os arquipélagos da Madeira, Canárias e Cabo Verde, definem a região biogeográfica da Macaronésia, considerada uma das regiões mais importantes ao nível da concentração e representatividade da biodiversidade. (Borges *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2009).

O arquipélago dos Açores é naturalmente susceptível à perda de biodiversidade pois são territórios pequenos e frágeis à actividade antropogénica, sendo objectos de estudo devido às suas dimensões, grau de isolamento, condições ecológicas e facilidade na identificação das suas populações naturais (Silva *et al.* 2009).

A situação geográfica do arquipélago dos Açores tem uma grande importância para entender as florestas existentes nas ilhas, uma vez que as barreiras oceânicas e as condições ecológicas conferiram ao arquipélago uma história natural muito própria. O facto dos Açores se terem desenvolvido numa sequência de erupções, influenciou sucessivas fases de esterilização e recolonização biológicas a partir das ilhas mais próximas (Dias *et al.*, 2007 a). Devido a estes factores as ilhas açorianas funcionam como um excelente modelo de ecossistema insular, de reduzidas dimensões, mas detentores de uma biodiversidade peculiar, fruto de grandes distâncias relativamente às fontes de colonização prováveis (MacArthur & Wilson 1963, 1967; Silva *et al.*, 2009), o que permitiu o desenvolvimento de uma flora endémica, devido às barreiras geográficas e ao isolamento reprodutivo.

A vegetação pertencente às ilhas Açorianas, apresenta um vasto número de plantas originárias no Período Terciário, na sua maioria endémicas e com estatuto de protecção. A Laurissilva dos Açores, cuja origem está relacionada com as florestas do Terciário existentes no sul da Europa e desaparecidas há milhões de anos aquando das últimas glaciações (Dias 1996), é uma floresta com um índice de endemismos muito elevados. A ausência de mamíferos herbívoros, permitiu a sobrevivência de muitas espécies

vegetais com características primitivas e que já foram eliminadas dos continentes adjacentes (Melville, 1979).

A floresta natural dos Açores inclui vários tipos de formações associadas a um clima ameno, de invernos pouco rigorosos e de verões sem *stress* hídrico, o que permitiu o desenvolvimento de florestas dominadas por laurifólias (Dias *et al.*, 2007 b).

Tendo em conta a perda de biodiversidade, na última década assistiu-se a um aumento do esforço por parte da Região Autónoma dos Açores na produção de espécies autóctones para a plantação em taludes de estrada, miradouros, recuperação paisagística e recuperação de habitats naturais. Estes esforços resultam numa pressão sobre as populações naturais quer na recolha de material vegetativo para realização de estacas, quer na recolha de frutos para a germinação das sementes em canteiros.

## **Caracterização Geral da espécie**

### **Taxonomia**

O género *Viburnum* já pertenceu à família *Caprifoliaceae*, pertencendo agora à família *Adoxaceae* (Winkworth, 2005). A espécie *Viburnum treleasei* Gand. era anteriormente designado como uma subespécies de *Viburnum tinus* (*V. tinus* ssp. *subcordatum* (Trel.) P. Silva; Palhinha, 1966). No entanto, na sequência de um estudo filogenético entre o endemismo açoriano e *Viburnum tinus* L. que utilizou dados morfológicos e moleculares (Moura, 2005) chegou-se à conclusão de que esta subespécie deveria ser elevada à categoria de espécie tal como Gandoger já o havia considerado em 1900 (IPNI, 2015).

### **Descrição Morfológica**

O *V. treleasei* é um arbusto que se desenvolve preferencialmente em bosques de louro e cedro-do-mato. Apresenta folhas ovais, quase obtusas de cor verde brilhante na parte superior e verde pálido na página inferior. As flores podem ser rosas ou brancas,

formando-se em corimbos, que se agrupam em densos cachos de pequenos frutos carnudos de cor azul metálico quando maduros (Figura 1) (Shaefer, 2005)



**Figura 1:** *Viburnum treleasei* Gand. A: Inflorescência (fonte: [www.parqueterranostra.com](http://www.parqueterranostra.com)). B: Frutos.

### **Ecologia e Distribuição da espécie**

Esta espécie encontra-se distribuída por todas as ilhas dos Açores com exceção da ilha da Graciosa. Ocorre naturalmente em florestas de *Laurus* (*Laurus azorica*) e *Juniperus* (*Juniperus brevifolia*) entre os quatrocentos metros e os oitocentos metros de altitude (Shaefer, 2005) (Figura 2).



**Figura 2:** Distribuição de *Viburnum treleasei* Gand. no arquipélago dos Açores (fonte: [www.azoresbioportal.angra.uac.pt](http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt))

## **Estatuto de Conservação**

O estado de conservação da *V.treleasei* de acordo com os critérios e categorias da IUCN (2001) varia entre a categoria ‘extinct’ na ilha da Graciosa (Pereira *et al.* 2004) e ‘Least Concern’ apenas na ilha das Flores (Shaefer, 2003). No entanto esta espécie não é protegida pela Convenção de Berna (Decisão 82/72/CEE do Conselho) nem pela Diretiva Habitats (Directiva 92/43/CEE do Conselho). Actualmente esta espécie, está a ser produzidas por semente para restauro do habitat do priolo (Laurissilva Sustentável - Project LIFE 07 NAT/P/000630 *in* European Commission – Life+, 2007, Secretaria Regional da Agricultura e Florestas) e foi produzida por cultura *in vitro* como uma planta ornamental (Pereira e Canhoto, 2010).

## **Utilizações Actuais**

O folhado é uma espécie autóctone e endémica dos Açores alvo de medidas de conservação, tendo já sido estabelecido em cultura *in vitro* a partir de arbustos adultos silvestres (Moura *et al.*, 2009); mas, as elevadas percentagens de contaminação tornam difícil o estabelecimento de diferentes clones. O estabelecimento de um protocolo de proliferação e enraizamento a partir de embriões germinados *in vitro* (Pereira e Canhoto, 2010; Pereira *et al.*, 2012), permite a produção de um número elevado de indivíduos geneticamente diferentes num curto período de tempo, conservando a biodiversidade genética presente na amostra de embriões e diminuindo a pressão de recolha de frutos sobre as populações *in situ*.

## **Cultura *in vitro***

A cultura *in vitro* de plantas é uma tecnologia com evidentes repercussões quer ao nível prático quer ao nível da ciência fundamental. Abrange uma variada gama de técnicas sob condições de assepsia controlada incluindo a germinação de sementes e de grãos de pólen, a micropropagação, a cultura de células e de tecidos. Estas técnicas têm sido vastamente usadas para a propagação e modificação de espécies agrícolas e hortícolas (George e Sherrington, 1984), mas também para a conservação da variabilidade genética de espécies com sementes recalcitrantes, pois estas não podem ser conservadas em condições convencionais existentes nos bancos de sementes (Dodds, 1991). Ao nível da investigação a cultura *in vitro*, permite uma abordagem aos processos de

morfogénese em plantas em condições controladas, contribuindo para o estudo e compreensão dos mecanismos moleculares, bioquímicos, e fisiológicos subjacentes aos desenvolvimentos dos diferentes órgãos e tecidos. (Canhoto, 2010)

A propagação e manutenção de células ou plantas em condições de laboratório, é essencial em muitos aspectos da biotecnologia vegetal. Esta metodologia permite obter um número elevado de plantas para ensaios num curto espaço de tempo partindo de um explantado, a propagação de espécies difíceis de clonar por técnicas convencionais, a produção de novas variedades de espécies, a regeneração de plantas com origem em células geneticamente modificadas, o estabelecimento de bancos de germoplasma e possibilita a troca de material vegetal rápida, pois devido ao estado fitossanitário em que o material vegetal é mantido, reduz significativamente o período de quarentena ou elimina-o totalmente (Fay, 1993; Canhoto, 2010)

Esta tecnologia, é recorrente em programas de conservação de espécies de plantas ameaçadas, realizados por organizações nacionais e internacionais bem como jardins botânicos e outras instituições do género, já tendo sido propagado uma ampla variedade de plantas ameaçadas com êxito (Fay, 1991). Apesar de existirem muitas vantagens na utilização da micropropagação, como o alto coeficiente de multiplicação, não ser necessário muito material original, nem muito espaço para manter as plantas; existem muitas desvantagens ao nível económico, pois o equipamento, e a mão-de-obra qualificada, tornam esta técnica cara (Mikulík, 1999)

Os reguladores do desenvolvimento são componentes essenciais dos meios de cultura *in vitro* pois são eles que permitem obter as respostas de crescimento e diferenciação desejadas. Estes reguladores podem ter origem sintética ou ocorrer naturalmente nas plantas (hormonas vegetais) distinguindo-se classicamente as auxinas, as citocininas, giberelinas, o etileno e o ácido abscísico (Gaspar, 1996). Neste trabalho foram utilizadas apenas hormonas de duas categorias, as citocininas e as auxinas.

As citocininas são compostos naturais ou sintéticos constituídos por compostos activos do tipo das citocininas, são aminopurinas substituídas (Canhoto, 2010). A síntese de citocininas ocorre nos ápices radiculares das plantas sendo depois transportadas através do xilema para outros locais da planta. Nas plantas elas controlam genes envolvidos na regulação do funcionamento dos meristemas (Canhoto, 2010). As citocininas são utilizadas na cultura *in vitro*, para acelerar o desenvolvimento do explantado - o que

ocorre devido à estimulação da divisão celular, e para a estimular gemas laterais dormentes (Gaspar, 1996).

Os auxinas são compostos de natureza simples sendo o IAA a auxina mais comum nas plantas. As auxinas controlam vários aspectos do desenvolvimento das plantas normalmente em interacção com outras hormonas como o etileno ou as citocininas. A nível celular estimulam o alongamento e conseqüente aumento do volume celular (Gaspar, 1996) através da activação de um mecanismo quimiosmótico que promove a extrusão de protões, com a conseqüente acidificação do apoplasto e activação de expansinas responsáveis pelo alongamento da parede celular (Canhoto, 2010). A nível da planta as auxinas estão envolvidas nos tropismos, na regulação da dominância apical, na formação dos meristemas florais e no estabelecimento dos padrões de filotaxia, na formação de raízes laterais, na diferenciação dos tecidos vasculares e no desenvolvimento dos frutos (Canhoto, 2010). Relativamente à cultura *in vitro*, as auxinas são utilizadas na formação e manutenção de calos ou suspensões celulares, na indução do enraizamento, na formação de embriões somáticos e na formação de meristemas caulinares adventícios nos processos de organogénese (Gaspar, 1996; Canhoto, 2010).

Muitos aspectos do crescimento celular, diferenciação celular, organogénese e cultura de tecidos, podem ser controlados pela interacção entre citocininas e auxinas, sendo que a concentração necessária de cada hormona depende sempre da espécie de planta a ser cultivada, das condições de cultura, e da forma como o regulador é utilizado (Gaspar, 1996; Canhoto, 2010)

### **Objectivo do trabalho**

Este trabalho teve como objectivo geral, optimizar o protocolo de proliferação, enraizamento e aclimação de culturas de *Viburnum treleasei* Gand., estabelecidas a partir de embriões germinados *in vitro*; e, como objectivos específicos testar:

a) o efeito de concentrações crescentes de Zeatina, N<sup>6</sup>[2-isopentenil]adenina (2-iP) e 6-benzyladenine (BA) nas características do desenvolvimento dos explantados em duas subculturas da fase proliferativa;

- b) o efeito da subcultura nas características do desenvolvimento dos explantados na fase proliferativa;
- c) o efeito de concentrações crescentes do ácido  $\alpha$ -nafalenoacético (NAA), do ácido 3-indolbutírico (IBA), do ácido 3-indolacético (IAA) no enraizamento dos rebentos;
- d) o efeito das citocininas (2-iP 24,6  $\mu$ M, e Zeatina 22,81  $\mu$ M) usadas na fase proliferativa no enraizamento dos rebentos com NAA (5,37  $\mu$ M); e,
- e) o efeito das citocininas (2-iP 24,6  $\mu$ M, e Zeatina 22,81  $\mu$ M) usadas na fase proliferativa na aclimação dos rebentos.

## **Metodologia**

### **Origem, colheita e armazenamento do material vegetal**

Os frutos de *V. treleasei* foram colhidos em Novembro sobre vários indivíduos na zona central da ilha de São Miguel. Os frutos foram deixados secar à temperatura ambiente, colocados no interior de envelopes de papel e armazenados à temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  em frascos de vidro com gel de sílica até ao seu uso.

### **Isolamento dos embriões**

Para a obtenção dos embriões recorreu-se à escarificação química dos frutos numa hotte. Para tal os frutos secos foram imersos em ácido sulfúrico (96%) e a matraz colocada durante 3 horas sobre um tabuleiro com algum gelo. Após a drenagem do ácido para um recipiente próprio, os frutos foram enxaguados com água da rede público. Os frutos foram divididos em grupos de 100 e colocados: a) 48h em água bidestilada (bidestilador eléctrico Millipore®), b) 48h em GA3 (1000 mg/l), c) 48h em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 50%, d) 24h em GA3 (1000 mg/l) e posteriormente 24h em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 50%, e e) 24h em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 50% e depois 24h em GA3 (1000 mg/l). Para controlar a contaminação posteriormente durante a germinação *in vitro*, todos os frutos foram desinfectados superficialmente numa câmara de fluxo laminar horizontal Sanyo®, imediatamente antes da excisão dos embriões; para tal os frutos foram agitados numa solução a 1% de benomyl (Benlate®) durante 20 min, enxaguados 3 vezes em água bidestilada esterilizada, agitados numa solução de lixívia comercial a 10% com 0,01% de Tween 20 (Sigma ®) durante 20 min, enxaguados 3 vezes com água bidestilada esterilizada, agitados 30 segundos em etanol (70%) e finalmente enxaguados 6 vezes com água bidestilada esterilizada. Os embriões foram isolados na câmara de fluxo laminar, sob uma lupa binocular, sobre o lado encerado do papel kraft com recurso a 2 bisturis. O papel e o material de dissecação foram primeiramente esterilizados 2h a 150°C numa estufa Memmert®. Cada embrião foi isolado com um par diferente de bisturis esterilizado, procedendo-se à sua posterior esterilização no interior da câmara de fluxo laminar, num esterilizador eléctrico Steri 350® durante 2 minutos a 250°C e ao seu arrefecimento sobre um suporte inox esterilizados na autoclave vertical (20 minutos a 121°C).



## Estabelecimento da cultura *in vitro*

Imediatamente após o isolamento, 500 embriões entre 0,5 a 1 mm de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio de 125 mm X 25 mm (Pyrex®) com tampas translúcidas (Kaput®) no meio de cultura de Lloyd e McCown (1981) (Tabela 1) – ‘Woody Plant Medium’ (WPM) - previamente testado para a cultura *in vitro* de explantados nodais de arbustos adultos desta espécie (Moura, 2005). Para a preparação de cada litro do meio de cultura WPM foram inicialmente colocados 200 ml de água destilada numa matraz sobre um termo-agitador electromagnético, de seguida adicionaram-se os vários volumes das soluções-mãe com o auxílio de provetas e pipetas graduadas, 100 mg de Inositol e 20 g de sacarose, acertou-se o volume para 1l e acertou-se o pH da solução para 5,6, adicionaram-se 9 g de Bacto Agar Difco® e deixou-se o meio a cozer até passar de translúcido a praticamente transparente. O meio cozido foi distribuído pelos tubos de ensaio utilizando um distribuidor manual (10ml de meio por tubo), esterilizado na autoclave (121°C, 20 minutos) e colocado a arrefecer na câmara de fluxo laminar. A germinação dos embriões no meio de cultura e o desenvolvimento das jovens plantas decorreu durante 12 semanas em câmaras climatizadas sob um regime de luz e temperatura de 8h de luz em cada 24h e 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) respetivamente e uma intensidade luminosa de 33  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 3.A, B).

**Tabela 1:** Formulação do meio WPM Loyd (1978) e referência do produto usado no laboratório de cultura *in vitro* em Ponta Delgada.

Macronutrientes - Formulação única		Peso mg/l	Laboratório Referência
Designação	Fórmula química		
Nitrato de Amónia	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	400	B52
Sulfato de Magnésio	$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	B4
Nitrato de Cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	556	B11
Bicloreto de Cálcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96	B7
Dihidrógenofosfato de Potássio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	B16
Sulfato de Potássio	$\text{K}_2\text{SO}_4$	990	B92
Micronutrientes - Formulação única		Peso mg/l	Laboratório Referência
Designação	Fórmula química		
Sulfato de Manganésio	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,300	*
Sulfato de Zinco	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600	B43
Ácido Bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,200	B3
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,250	B19
Molibdato de Sódio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250	B42

Sulfato de Ferro	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,800	B44
EDTA Sódico	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,300	B14
<b>Vitaminas de Mullin <i>et al.</i> (1974)B</b>		<b>Peso mg/l</b>	<b>Laboratório Referência</b>
<b>Designação</b>			
Thiamina.HCl		1	B34
Ácido nicotínico		0.5	B28
Piridoxina.HCl		0.5	B98
Inositol		100	B53
<b>Aminoácidos de Skoog (1944)</b>		<b>Peso mg/l</b>	<b>Laboratório Referência</b>
<b>Designação</b>			
Glicina		2	B59
<b>*Referências Laboratório</b>	<b>MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (B25)</b>	<b>MnSO<sub>4</sub>(B71)</b>	

### Proliferação das culturas

Na primeira subcultura utilizaram-se explantados nodais provenientes das jovens plantas germinadas *in vitro* (Figura 3C). Na segunda subcultura utilizaram-se explantados nodais provenientes de rebentos produzidos na primeira subcultura (Figura 3D). Na câmara de fluxo laminar procedeu-se ao corte das folhas e inoculação dos nós com gemas opostas nos meios de cultura. Na fase proliferativa foi testado nas duas subculturas o efeito de diferentes concentrações de citocininas na indução e proliferação de rebentos, usando como meio basal o mesmo usado para a germinação dos embriões mas suplementado com concentrações crescentes de Zeatina (1,14; 4,56 e 22,81  $\mu$ M), 2-iP (1,23; 4,92 e 24,6  $\mu$ M) e BA (1,11; 4,44 e 22,2  $\mu$ M). Na fase proliferativa manteve-se o regime de temperatura de 20°C ( $\pm$  1°C) enquanto o fotoperíodo foi aumentado para 16h (em cada 24h) (Figura 3E).

### Fase de Enraizamento

Os rebentos ( $\geq$  1cm) produzidos na segunda subcultura da fase proliferativa foram sincronizados no meio basal sem reguladores de desenvolvimento durante 8 semanas. A indução do enraizamento foi levada a cabo transferindo os rebentos para o meio basal WPM suplementado com diferentes concentrações de IBA (0; 1,23; 4,92 e 9,84  $\mu$ M), IAA (0; 1,43; 5,71 e 11,42  $\mu$ M), e NAA (0; 1,34; 5,37 e 10,74  $\mu$ M). Ao descobrir-se a melhor concentração de auxina esta foi novamente utilizada nos rebentos, desta vez

separados pelo seu histórico hormonal (sem citocinina, com 2-iP 4,92  $\mu\text{M}$ ; com Zeatina 22,81  $\mu\text{M}$ ) (Figura 3F).

### **Aclimação**

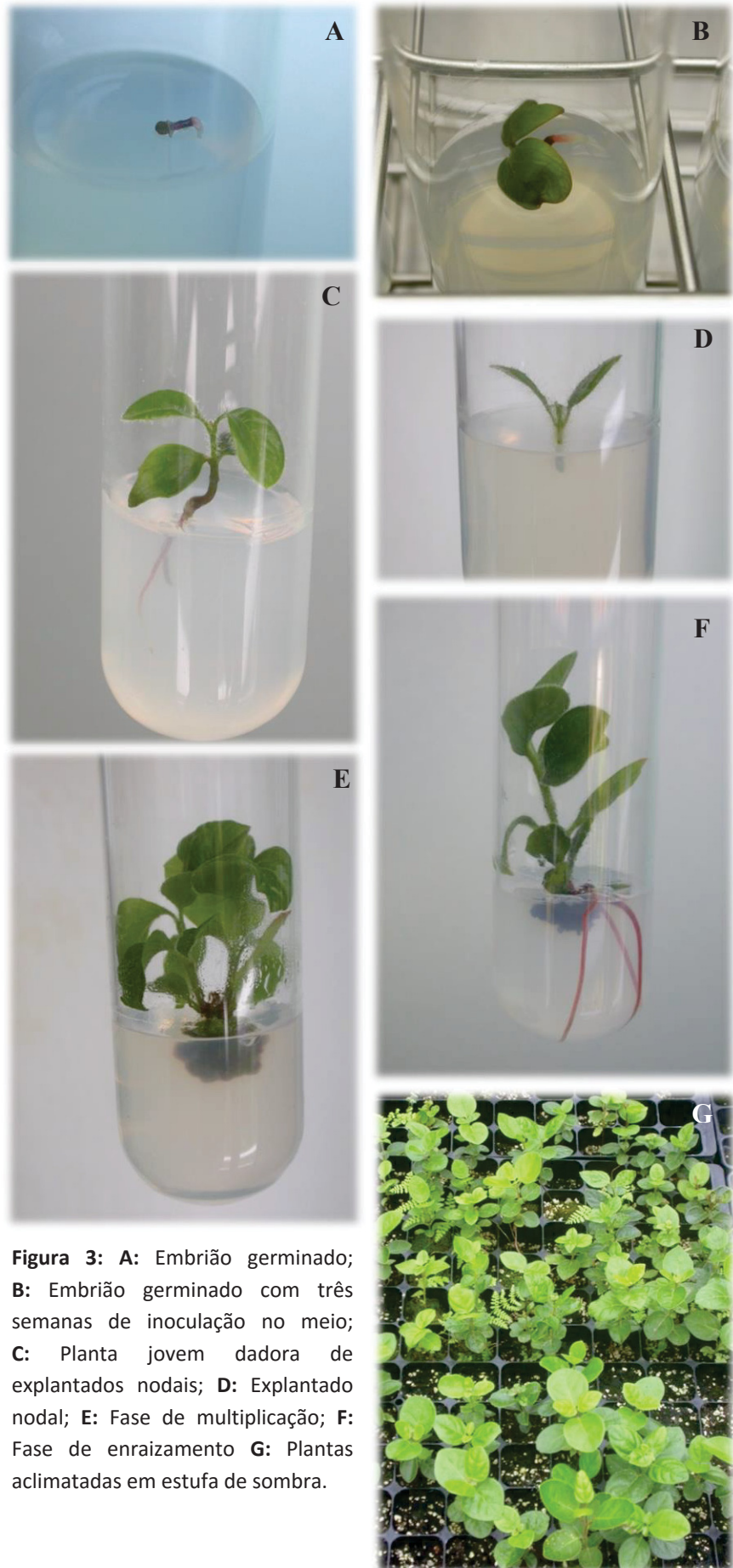
A aclimação iniciou-se com a remoção das plantas enraizadas dos tubos de ensaio, depois de lavadas em água destilada, foram plantadas em pequenos vasos de plástico incolor (4 cm de diâmetro) com uma mistura de substrato universal: perlite (3:1) sendo por fim colocadas em estufas de polipropileno com regulação de entrada de ar. Semanalmente era aumentado o arejamento das estufas. Este processo durou seis semanas, após o qual as plantas foram transferidas para uma estufa de sombra (figura 3 G.)

### **Recolha dos Dados e Tratamento Estatístico**

Na fase proliferativa (subcultura 1 e 2) e no enraizamento os dados foram recolhidos passado oito semanas de cultura. Na aclimação os dados foram recolhidos após seis semanas de aclimação.

As variáveis recolhidas na fase proliferativa para cada um dos explantados inoculados foram o número de rebentos, o número de nós e o comprimento dos rebentos (cm). Relativamente ao enraizamento, os dados recolhidos foram, presença de raiz, origem da raiz (no caule ou no callus) e o número de raízes. Por sua vez, para a aclimação foram, registados a sobrevivência, o comprimento da plântula e o número de gemas.

Foi utilizada a aplicação informática SPSS.22, para a realização dos testes estatísticos. Inicialmente começou-se por fazer um teste de homogeneidade de variâncias, o teste de Levene. Caso se verificasse que existia homogeneidade das variâncias, então as médias eram comparados utilizado a ANOVA ou o *test t student*. Se não existisse homogeneidade de variâncias, procedia-se à utilização dos testes de comparação múltipla não paramétricos equivalentes de Kruskal-Wallis ou de Mann-Whitney. Para o ANOVA utilizou-se o teste de comparação múltipla de Tukey e para o teste de Kruskal-Wallis om teste de comparação múltipla não paramétrico tipo tukey. No caso de variáveis proporcionais foi utilizado o teste do  $\chi^2$ .



**Figura 3:** A: Embrião germinado; B: Embrião germinado com três semanas de inoculação no meio; C: Planta jovem dadora de explantados nodais; D: Explantado nodal; E: Fase de multiplicação; F: Fase de enraizamento G: Plantas aclimatadas em estufa de sombra.

## Resultados

### Germinação de embriões *in vitro*

Para 4 ensaios cada um com 25 embriões (N=100) obtiveram-se os seguintes valores para as médias e os desvios-padrão: período de latência =  $21 \pm 0$  dias; tempo médio de germinação =  $33,1 \pm 0,1$  dias; e, germinação =  $100 \pm 0$  %.

### Efeito das citocininas na fase proliferativa

Da análise da tabela 2 verifica-se que na primeira subcultura da fase proliferativa todas as citocininas induziram a proliferação nos explantados. O maior número de rebentos por explantado foi obtido para as formulações 2-iP 4,92  $\mu\text{M}$  e BA 22,20  $\mu\text{M}$ ; o maior número de nós por rebento, foi obtido para as formulações Zeatina 1,14  $\mu\text{M}$ , BA 1,11  $\mu\text{M}$  e 4,44  $\mu\text{M}$ ; e o maior comprimento do rebento, foi obtido para as formulações Zeatina 1,14  $\mu\text{M}$  e 22,81  $\mu\text{M}$ . No entanto a melhor resposta proliferativa considerando todas as variáveis foi obtida com Zeatina 4,56  $\mu\text{M}$ , 2-iP 24,6  $\mu\text{M}$  e BA 4,44  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 2.** Efeito das citocininas na indução e proliferação de rebentos em explantados nodais de *Viburnum treleasei* na primeira subcultura da fase proliferativa, após 8 semanas de cultura. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão. Em cada coluna os valores afectados pela mesma letra não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Regulador de desenvolvimento ( $\mu\text{M}$ )	n	Rebentos por explantado (n°)	n	Nós por rebento (n°)	Comprimento do rebento (cm)
<b>Zeatina</b>					
1,14	95	$1,2 \pm 0,4$ (e)	109	$2,8 \pm 1,1$ (a)	$1,4 \pm 1,1$ (a)
4,56	88	$1,6 \pm 0,8$ (c)	137	$2,0 \pm 1,1$ (b)	$0,9 \pm 0,4$ (b)
22,81	96	$1,4 \pm 0,6$ (c)	137	$2,2 \pm 1,3$ (b)	$1,0 \pm 0,7$ (a,b)
<b>2-iP</b>					
1,23	33	$1,4 \pm 0,6$ (c,d)	46	$1,0 \pm 0,2$ (d)	$0,2 \pm 0,1$ (c)
4,92	37	$2,1 \pm 0,9$ (a)	91	$1,0 \pm 0,0$ (e)	$0,3 \pm 0,2$ (c)
24,60	44	$1,6 \pm 0,5$ (b,c)	69	$1,6 \pm 0,5$ (c)	$0,8 \pm 0,4$ (b)
<b>BA</b>					
1,11	59	$1,2 \pm 0,6$ (d,e)	72	$2,7 \pm 0,9$ (a)	$0,9 \pm 0,4$ (b)
4,44	22	$1,3 \pm 0,6$ (c,d,e)	29	$3,2 \pm 1,5$ (a)	$0,9 \pm 0,6$ (b)
22,20	26	$2,0 \pm 1,0$ (a,b)	52	$1,4 \pm 0,5$ (c)	$0,3 \pm 0,2$ (c)
N	500		742		
<b>Teste de Kruskal-Wallis</b>		80,2		279,3	288,2
gl		8		8	8

Da análise da tabela 3 verifica-se que na segunda subcultura da fase proliferativa mais uma vez todas as citocininas induziram a proliferação nos explantados. O maior número de rebentos por explantado foi obtido para as formulações Zeatina 4,56  $\mu\text{M}$  e BA 1,11  $\mu\text{M}$  e 4,44 $\mu\text{M}$ ; o maior número de nós por rebento, foi obtido para as formulações Zeatina 22,81  $\mu\text{M}$  e para todas as formulações de 2-iP; e o maior comprimento do rebento, foi obtido para as formulações Zeatina 4,56  $\mu\text{M}$  e 22,81  $\mu\text{M}$ , e 2-iP 1,23  $\mu\text{M}$ . No entanto a melhor resposta proliferativa considerando todas as variáveis foi obtida com Zeatina 22,81  $\mu\text{M}$ , 2-iP 24,60  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 3.** Efeito das citocininas na indução e proliferação de rebentos em explantados nodais de *Viburnum treleasei* na segunda subcultura da fase proliferativa, após 8 semanas de cultura. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão. Em cada coluna os valores afectados pela mesma letra não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Regulador de desenvolvimento ( $\mu\text{M}$ )	n	Rebentos por explantado (n°)	n	Nós por rebento (n°)	Comprimento do rebento (cm)
<b>Zeatina</b>					
1,14	120	1,5 $\pm$ 0,7 (b)	183	1,4 $\pm$ 0,6 (c)	0,5 $\pm$ 0,4 (c)
4,56	78	1,6 $\pm$ 0,8 (b,a)	126	1,7 $\pm$ 0,8 (b)	0,9 $\pm$ 0,6 (a,b)
22,81	404	1,6 $\pm$ 0,9 (b)	645	2,1 $\pm$ 1,0 (a)	1,0 $\pm$ 0,6 (a)
<b>2-iP</b>					
1,23	48	1,1 $\pm$ 0,2 (c)	51	2,3 $\pm$ 0,6 (a)	0,8 $\pm$ 0,4 (a,b)
4,92	86	1,1 $\pm$ 0,3 (c)	95	2,0 $\pm$ 0,8 (a)	0,7 $\pm$ 0,4 (b)
24,60	48	1,5 $\pm$ 0,7 (b)	73	2,0 $\pm$ 0,8 (a)	0,7 $\pm$ 0,5 (b)
<b>BA</b>					
1,11	112	1,9 $\pm$ 1,1 (a,b)	211	1,4 $\pm$ 0,6 (c)	0,5 $\pm$ 0,4 (c)
4,44	27	2,0 $\pm$ 1,2 (a)	55	1,5 $\pm$ 0,5 (c)	0,3 $\pm$ 0,2 (d)
<b>N</b>	923		1439		
<b>Teste de Kruskal-Wallis</b>		74,351		182,352	244,084
gl		7		7	7

## Efeito da subcultura na fase proliferativa

Da primeira para a segunda subcultura: o número de rebentos por explantado aumentou com BA, diminuiu com 2-iP e não diferiu com significado com a Zeatina, à excepção na menor concentração onde houve um aumento (tabela 4).

Após a subcultura o número de nós por rebentos diminuiu com BA, aumentou de forma geral com 2-iP e diminuiu de forma geral com Zeatina (tabela 5).

Finalmente na subcultura, o comprimento dos rebentos diminuiu com BA, aumentou não diferiu com significado (a maior concentração) com 2-iP, e não diferiu com significado ou diminuiu (a menor concentração) com Zeatina (tabela 6).

**Tabela.4** Efeito da subcultura na indução e proliferação de rebentos em explantados nodais de *Viburnum treleasei* inoculados em meios suplementados com citocininas. Primeira subcultura (S1), segunda subcultura (S2). Em cada linha os valores afectados pela mesma letra não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Regulador de Desenvolvimento $\mu\text{M}$	Rebentos por explantado (n°)		Teste U de Mann-Whitney	Teste t de Student
	S1	S2		
<b>Zeatina</b>				
1,14	1,2 (a)	1,5 (b)	4,875	
4,56	1,6 (a)	1,6 (a)		-0,468
22,81	1,4 (a)	1,6 (a)	1,103	
<b>2-iP</b>				
1,23	1,4 (a)	1,1 (b)	-3,185	
4,92	2,1 (a)	1,1 (b)	-7,348	
24,6	1,6 (a)	1,5 (b)	-0,841	
<b>BA</b>				
1,11	1,2 (a)	1,9 (b)	4,869	
4,44	1,3 (a)	2,0 (b)	2,361	

**Tabela.5** Efeito da subcultura na indução e proliferação dos nós por rebento, em explantados nodais de *Viburnum treleasei* inoculados em meios suplementados com citocininas. Primeira subcultura (S1), segunda subcultura (S2). Em cada linha os valores afectados pela mesma letra não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Regulador de Desenvolvimento $\mu\text{M}$	Nós por rebento (n°)		Teste U de Mann-Whitney
	S1	S2	
<b>Zeatina</b>			
1,14	2,8 (a)	1,4 (b)	-10,759
4,56	2,0 (a)	1,7 (a)	-1,783
22,81	2,2 (a)	2,1 (a)	0,788
<b>2-iP</b>			
1,23	1,0 (a)	2,3 (b)	8,265
4,92	1,0 (a)	2,0 (b)	10,186
24,6	1,6 (a)	2,0 (a)	-3,925
<b>BA</b>			
1,11	2,7 (a)	1,4 (b)	-9,793
4,44	3,2 (a)	1,5 (b)	-5,503

**Tabela.6** Efeito da subcultura no comprimento dos rebentos produzidos em explantados nodais de *Viburnum treleasei* inoculados em meios suplementados com citocininas. Primeira subcultura (S1), segunda subcultura (S2). Em cada linha os valores afectados pela mesma letra não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Regulador de Desenvolvimento $\mu\text{M}$	Comprimento (cm)		Teste U de Mann-Whitney	Teste t de Student
	S1	S2		
<b>Zeatina</b>				
1,14	1,4 (a)	0,5 (b)	-7,938	
4,56	0,9 (a)	0,9 (a)	-0,469	
22,81	1,0 (a)	1,0 (a)		0,860
<b>2-iP</b>				
1,23	0,2 (a)	0,8 (b)	8,092	
4,92	0,3 (a)	0,7 (b)	7,583	
24,60	0,8 (a)	0,7 (a)		0,801
<b>BA</b>				
1,11	0,9 (a)	0,5 (b)		6,419
4,44	0,9 (a)	0,3 (b)	.5,054	



## Efeito das auxinas na fase de enraizamento

No enraizamento apenas os meios suplementados com NAA conseguiram percentagens de enraizamento superiores a 50% e significativamente diferentes dos resultados obtidos com os outros reguladores. No ensaios realizado a maior percentagem de enraizamento (72,2%) foi obtida com a concentração de 5,37  $\mu\text{M}$  NAA (Table 7). Também para variável nº de raízes por rebento os resultados máximos foram obtidos novamente nos meios suplementados com NAA com o valor mais alto de 4,8 raízes por planta em 5,37  $\mu\text{M}$  de NAA.

**Tabela 7.** Efeito de auxinas sobre o enraizamento *in vitro* de rebentos de *Viburnum treleasei*, após 8 semanas de cultura. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão. Em cada coluna os valores afectados pela mesma letra não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Regulador do desenvolvimento ( $\mu\text{M}$ )	Enraizamento		Raízes/planta	
	n	(%)	n	(nº)
<b>Controlo</b>				
0	3x16	8,3 $\pm$ 3,6 (c)	4	2,3 $\pm$ 1,0 (a,b,c)
<b>IBA</b>				
1,23	3x16	16,7 $\pm$ 9,6 (c)	8	2,0 $\pm$ 0,9 (b,c)
4,92	3x16	18,8 $\pm$ 10,8 (c)	9	2,7 $\pm$ 2,8 (a,b,c)
9,84	3x16	16,7 $\pm$ 3,6 (c)	8	1,3 $\pm$ 0,5 (c)
<b>NAA</b>				
1,34	3x16	50 $\pm$ 16,5 (b)	24	3,3 $\pm$ 2,2 (a,b,c)
5,37	3x12	72,2 $\pm$ 17,4 (a)	26	4,8 $\pm$ 3,2 (a)
10,74	3x16	64,6 $\pm$ 3,6 (a,b)	31	4,2 $\pm$ 3,0 (a,b)
<b>IAA</b>				
1,43	3x16	16,7 $\pm$ 9,6 (c)	8	1,6 $\pm$ 0,7 (c)
5,71	3x16	14,6 $\pm$ 3,6 (c)	7	1,7 $\pm$ 0,5 (c)
11,42	3x12	16,7 $\pm$ 8,3 (c)	6	2,0 $\pm$ 1,1 (b,c)
N	<b>456</b>		<b>131</b>	
<b>Estatística</b>		<b><math>\chi^2</math> total</b>		<b>Teste de Kruskal-wallis</b>
<b>Valor</b>		18,906		32,255
<b>gl</b>		9		9

## Efeito das citocininas usadas na fase proliferativa na fase de enraizamento

Da análise da tabela 8 verificamos que a utilização de citocininas na fase proliferativa aumentou significativamente quer a percentagem de enraizamento dos rebentos, quer o desenvolvimento de tecido caloso. Apesar de terem sido obtidas maioritariamente (mais de 90%) raízes com origem no caule, nos rebentos multiplicados em Zeatina todas as raízes tiveram origem no caule.

**Tabela 8.** Influência das citocininas usadas na fase proliferativa no enraizamento dos rebentos num meio suplementados com 5,37  $\mu$ M de NAA. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão. Em cada coluna os valores afectados pela mesma letra não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Regulador do desenvolvimento presente na fase proliferativa ( $\mu$ M)		Enraizamento (%)	Plantas com callus (%)	Raízes/planta (n°)	Raízes com origem no caule (%)	
	N			N		
Controlo 0	3x16	66,7 $\pm$ 10,6 (b)	66,7 $\pm$ 13 (b)	32	3,3 $\pm$ 2,3 (b)	90,8 $\pm$ 10,1 (b)
2-iP 24,60	3x29	92 $\pm$ 1,63 (a)	88,5 $\pm$ 3,3 (a)	80	4,7 $\pm$ 2,2 (a)	91,3 $\pm$ 1,7 (b)
Zeatina 22,81	3x26	83,3 $\pm$ 7,3(a)	83,3 $\pm$ 8,9 (a)	65	3,2 $\pm$ 1,6 (b)	100 $\pm$ 0 (a)
Estatística		$\chi^2$ total	$\chi^2$ total	Kruskall-wallis	$\chi^2$ total	
Valor		14,089	11,044	23,827	0,293	
gl		2	2	2	2	

## **Efeito das citocininas usadas na fase proliferativa na fase de aclimação**

Na Tabela 9; podemos verificar que a utilização de citocininas na fase proliferativa aumentou significativamente: o nº de gemas dos rebentos, o comprimento dos rebentos e a sobrevivência das plantas em relação ao controlo. Apesar de terem sido obtidos resultados ligeiramente superiores para os rebentos multiplicados com Zeatina estes não foram significativamente diferentes dos obtidos com 2-iP.

**Tabela 9.** Influência das citocininas usadas na fase proliferativa na fase de enraizamento, respectivamente, na aclimação. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão. Em cada coluna os valores afectados pela mesma letra não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

<b>Regulador do desenvolvimento</b>	<b>Gemas por rebento</b>		<b>Comprimento do rebento</b>		<b>Sobrevivência (%)</b>
<b>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>N</b>	<b>(nº)</b>	<b>(cm)</b>	<b>N</b>	
Controlo 0	41	4,3 $\pm$ 1,5 (b)	3,7 $\pm$ 0,9 (b)	52	79,1 $\pm$ 13,9 (b)
2-iP 24,60	53	5,7 $\pm$ 1,7 (a)	4,4 $\pm$ 1,2 (a)	57	93 $\pm$ 8 (a)
Zeatina 22,81	32	5,9 $\pm$ 1,3 (a)	4,9 $\pm$ 1,0 (a)	33	97 $\pm$ 5,3 (a)
<b>Estatística</b>	<b>Anova</b>		<b>Anova</b>		<b><math>\chi^2</math> total</b>
<b>Valor</b>	11,583		11,602		8,353
<b>gl</b>	2		2		2

## Discussão

Numa análise geral, os explantados com origem em embriões germinados *in vitro*, provaram ser um recurso eficiente para o fácil estabelecimento de culturas de *V. treleasei in vitro*. Na verdade, plantas na fase juvenil de crescimento são mais fáceis para propagar vegetativamente do que plantas que já tenham alcançado o estado adulto (Preece, 2002). Os procedimentos de esterilização mais agressivos podem ser usados em sementes ou em frutos, o que por sua vez aumenta o número de explantados não contaminados, sendo assim um método rentável para o estabelecimento de culturas *in vitro*. Tendo isso em conta a contaminação que ocorreu foi pouco significativa ao longo do estudo. Na primeira subcultura da fase proliferativa, as concentrações de BA (1,1 e 4,4  $\mu\text{M}$ ) obtiveram resultados superiores em comparação com os obtidos em (Moura *et al* 2009), para o número de nós por rebento (2,7 e 3,2 contra 1,9 e 1,8; respectivamente). Isto poderá ser devido à origem do material vegetal, pois em (Moura *et al.* 2009) o material vegetal é proveniente de plantas adultas enquanto o material utilizado neste estudo foi proveniente de embriões germinados *in vitro*.

### Teste de germinação

Nos testes de germinação, podemos concluir que o embrião não é dormente e a germinação ocorre de forma contínua desde o alongamento do eixo embrionário até à expansão dos cotilédones, prosseguindo o desenvolvimento do primeiro par de folhas.

Como já foi relatado para *V. tinus* (Karlsson *et al*, 2004), a exigência de altas e baixas temperaturas para a protrusão da radícula e emergência do epicótilo, respectivamente, não se verificou para os embriões isolados de *V. treleasei*. Sendo assim pode-se concluir que o *V. tinus* não apresenta dormência no epicótilo profundo simples de acordo com bibliografia descrita (Nikolaeva, 1977; Baskin e Baskin, 1998).

Para o *V. treleasei* concluímos que a dormência primária das drupas é imposta pelo pericarpo, já que a remoção por escarificação química viabiliza a germinação. O pericarpo pode inibir a germinação, impedindo a embebição devido à sua impermeabilidade, ou elevada pressão osmótica proveniente dos açúcares dissolvidos ou ainda devido ao teor de inibidores de germinação (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989). Verificou-se que a remoção do pericarpo e do mesocarpo ou a remoção total do

pericarpo, melhora a germinação de *V. tinus* (Karlsson *et al.*, 2004) e a remoção do endocarpo ou a remoção forçada do exocarpo/mesocarpo (polpa), melhora a germinação de *V. trilobum* (Knowles e Zalík, 1958) e *V. dentatum* (Meyer e Witmer, 1998).

### **Efeito das citocininas na fase proliferativa**

De forma geral podemos dizer que as citocininas induziram a proliferação em *V. treleasei*, no entanto a melhor resposta proliferativa na primeira subcultura considerando todas as variáveis foi obtida com Zeatina 4,56  $\mu\text{M}$ , 2-iP 24,6  $\mu\text{M}$  e BA 4,44 $\mu\text{M}$  e a melhor resposta proliferativa na segunda subcultura considerando todas as variáveis foi obtida com Zeatina 22,81  $\mu\text{M}$ , 2-iP 24,60  $\mu\text{M}$ .

A zeatina é uma citocinina que ocorre naturalmente, comumente utilizada em propagação vegetativa (Gaspar *et al.*, 1996) mas apesar dos bons resultados obtidos em regra pela zeatina, esta é muito dispendiosa para a sua utilização em protocolos de micropropagação para espécies com valor comercial. Um exemplo é o caso da micropropagação da *Olea europaea* L., onde a zeatina foi substituída pelo BA e por água de coco (Peixe *et al.*, 2007).

Neste estudo, o BA na primeira subcultura foram utilizadas três concentrações de BA (1,11; 4,44; 22,20  $\mu\text{M}$ ), Na segunda já só foram utilizados apenas as concentrações de BA (1,11; 4,44  $\mu\text{M}$ ), pois o resultado obtido para a concentração mais alta de BA 22,20  $\mu\text{M}$  na primeira subcultura resultou em rebentos de muito difícil manipulação com cerca de 0,3 cm. O BA tem sido utilizado na micropropagação de *Viburnum* spp. (Nobre *et al.*, 2000; Ibanez *et al.*, 2003; Schoene e Yeager, 2005; Hatzilazarou *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2009). Os efeitos negativos do BA no comprimento do rebento já foram reportados para diversas espécies de plantas (Moncaleán *et al.*, 2001), incluindo *Viburnum* spp. para concentrações de BA superiores a 2,5  $\mu\text{M}$  para *V. opulus* (Ibañez *et al.*, 2003) e a 1,1  $\mu\text{M}$  para *V. odoratissimum* (Schoene e Yeager, 2005). Por este motivo, Schoene e Yeager (2005) utilizaram uma combinação de 0,5  $\mu\text{M}$  de BA com 14  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>, a fim de assegurar uma produção de rebentos com um comprimento adequado para as subculturas.

## **Efeito das auxinas na fase de enraizamento**

As percentagens de enraizamento neste estudo foram significativamente superiores para os meios suplementados com a auxina NAA, com valores que variam entre os 50 % (1,34  $\mu\text{M}$ ) e os 72,2 % (5,37  $\mu\text{M}$ ). Em relação à propagação vegetativa de *V. treleasei* por estacas tratadas com IBA (4 %) foi relatado como não sendo eficaz (Moura e Silva, 2009) neste estudo a utilização de IBA também resultou numa baixa percentagem de enraizamento (16,7-18,8%). Neste estudo a melhor auxina foi o NAA a uma concentração de 5,37  $\mu\text{M}$  com a indução de raízes em 72,2 % das plantas. Para a mesma concentração de NAA as percentagens de enraizamento de *V. odoratissimum*, *V. opulus* e *V. tinus* foi de 78 % (Schoene e Yeager, 2005), 85 % (Ibañez *et al.*, 2003) e 100 % (Nobre *et al.*, 2000).

As espécies do género *Viburnum*, variam na sua capacidade de enraizamento e na sua resposta às auxinas. *V. odoratissimum* (Schoene e Yeager, 2005), *V. dentatum* (Hatzilazarou *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2011) e *V. treleasei* (Moura *et al.*, 2009) necessitam de meios suplementados com auxinas para obterem percentagens de enraizamento comercialmente aceitáveis. Os rebentos de *V. dentatum* são reactivos para com NAA, IBA e IAA (Hatzilazarou *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2011); *V. odoratissimum* (Schoene e Yeager, 2005) e os rebentos de *V. opulus* (Ibañez *et al.*, 2003) são reactivos com as auxinas NAA e IBA. No caso do *V. tinus* (Nobre, *et al.*, 2000), os rebentos são afectados pelo NAA. Em Moura *et al.* (2009), a micropropagação de *V. treleasei* com origem em arbustos adultos obteve valores de enraizamento na ordem dos 80 % com uma concentração de NAA de 1.3  $\mu\text{M}$

## **Efeito das citocininas usadas na fase proliferativa no enraizamento dos rebentos.**

Os melhores resultados para o enraizamento foram obtidos para NAA 5,37  $\mu\text{M}$ , esta concentração foi utilizada no ensaio seguinte com intuito de estudar o efeito das citocininas usadas na fase proliferativa, na fase de enraizamento. Tendo isso em conta as citocininas utilizadas foram, as que apresentaram melhores resultados na fase proliferativa para todos os parâmetros analisados, nomeadamente, a Zeatina 22,81  $\mu\text{M}$  e

o 2-iP 24,60  $\mu\text{M}$ . Neste estudo verificou-se o efeito positivo das citocininas usadas na fase proliferativa na percentagem de enraizamento. Um aumento na percentagem de enraizamento com um aumento da concentração de 2-iP também já foi reportado em culturas produzidas *in vitro* (Frett *et al.*, 1982). A maior percentagem de raízes de melhor qualidade (com origem no caule) é obtida nos rebentos que proliferaram em zeatina (uma hormona vegetal) em vez de proliferados em 2iP (um precursor da hormona).

### **Efeito da interacção das citocininas e auxinas na aclimação**

Na aclimação os valores obtidos, para 2-iP e zeatina são significativos em comparação com os valores obtidos no controlo. Os valores entre ambas as concentrações em estudo 2-iP 24,60  $\mu\text{M}$ ; zeatina 22,81  $\mu\text{M}$  não diferem significativamente entre si. A taxa de sobrevivência foi elevada para as plântulas provenientes de meios com 2-iP e zeatina apresentando, uma taxa de sobrevivência de 93 % e 97 %, respectivamente, após seis semanas de aclimatização. Num estudo realizado por Moura (2009), após um mês de aclimação, a taxa de sobrevivência das plântulas de *V. treleasei* com origem em arbustos adultos foi de 50 % e todas as plantas exibiam a morfologia habitual. Tendo isto em conta, a melhor hormona para aplicar neste caso é o 2-iP pois esta apresenta resultados semelhantes aos apresentados pela zeatina e ainda tem vantagem de ser significativamente mais barata, o que torna o processo comercialmente viável. A utilização da melhor concentração de auxina NAA 5,37  $\mu\text{M}$  foi utilizada para os três ensaios em estudo, pois a concentração de auxina usada na fase de enraizamento, influencia a aclimação, tanto na frequência, como no crescimento das plântulas no substrato (Nobre *et al.*, 2000)

## Conclusão

Este trabalho permitiu construir um protocolo de micropropagação usando como material de partida embriões de *Viburnum treleasei* Gand., tendo por isso importância para a conservação da variabilidade genética da espécie. Isto é, a germinação de embriões somáticos, possibilita a produção em massa, por micropropagação *in vitro*, para restauração de habitats. Este método faz com que o impacto ecológico seja menor, pois haverá menos a pressão sobre as populações de *Viburnum*, ao nível da colheita de frutos, já que as percentagens de germinação obtidas foram de 100%.

Na fase proliferativa, a Zeatina 22,81  $\mu\text{M}$  e o 2-iP 24,60  $\mu\text{M}$  foram os reguladores de crescimento com os melhores resultados, para as variáveis em estudo. No enraizamento os melhores resultados foram obtidos por NAA 5,37 $\mu\text{M}$ . Relativamente ao estudo das citocininas usadas na fase proliferativa na fase de enraizamento, a Zeatina 22,81  $\mu\text{M}$  e o 2-iP 24,60  $\mu\text{M}$  afectaram positivamente, apresentando os melhores resultados. Na aclimação verificou-se que a sobrevivência aumentou para as plântulas provenientes dos reguladores de desenvolvimento a Zeatina 22,81  $\mu\text{M}$  e o 2-iP 24,60  $\mu\text{M}$ . Tendo isto em conta, este estudo permite concluir-se que as concentrações das citocininas, Zeatina 22,81  $\mu\text{M}$  e 2-iP 24,60  $\mu\text{M}$ , e a concentração da auxina NAA 5,37  $\mu\text{M}$  são as melhores concentrações para formular um protocolo de produção de culturas de *Viburnum treleasei* Gand *in vitro*.

A Zeatina apesar de ter apresentado bons resultados, devido ao seu elevado custo económico, não é viável a sua utilização em protocolos de conservação. O 2-iP para além de ter obtido bons resultados à semelhança da Zeatina, esta apresenta um custo mais baixo, tornando-a a citocinina a usar num protocolo de propagação em massa.

Futuramente, com base nestes resultados, pode realizar-se um protocolo de produção optimizado para *Viburnum treleasei*. Para tal efeito, devemos realizar uma recolha de frutos das várias populações de *Viburnum* presentes da ilha e identificar as amostras de frutos com a sua localização geográfica, de modo a preservar o património genético das populações considerando os estudos de Moura (2013).



## Bibliografia

Baskin CC, Baskin JM. (1998). Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego: Academic Press.

Bhella, H.S. & Moore, J. (1980). Vegetative propagation of *Viburnum* cvs. Alleghany, Mohican and Onondaga. Plant Propagator 26:5-9.

Canhoto, J.H. (2010). Biotecnologia Vegetal: Da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. 408 pp

Dai, W., Su, Y., Castillo, C. & Beslot, O. (2011). Plant regeneration from in vitro leaf tissues of *Viburnum dentatum* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104:257-262.

Dehgan, B., Gooch, M., Almira, F. & Kane, M. (1989). Vegetative propagation of Florida native plants: iii. Shrubs. Proc. Fla. State Hort. Soc. 102:254-260.

Dias, E. (1996). Classificação da vegetação dos Açores, Ecologia e sintaxonomia das Florestas naturais. Universidade dos Açores. Angra do Heroísmo.

Dias, E., Elias, R.B., Melo, C. & Mendes, C. (2007a) As florestas da Macaronésia - O elemento insular na estruturação das florestas da Macaronésia. *In: Árvores e florestas de Portugal* (ed.) Silva, J. S., 15 - 48. ISBN: 978-989-619-103-0. Lisboa: Público, Comunicação Social, SA/ Fundação Luso-Americana/ Liga para a Protecção da Natureza.

Dias, E., Elias, R. B., Melo, C. & Mendes, C. (2007b). Biologia e ecologia das florestas das ilhas - Açores. *In: Árvores e florestas de Portugal* (ed.) Silva, J. S., 51 - 80. ISBN: 978-989-619-103-0. Lisboa: Público, Comunicação Social, SA/ Fundação Luso-Americana/ Liga para a Protecção da Natureza.

Dirr, M.A. & Heuser, C.W. (1987). The Reference Manual of Woody Plant Propagation: from Seeds to Tissue Culture. Varsity Press, Athens.

Dodds, J.H. (ed.) (1991). In vitro methods for conservation of plant genetic resources. London: Chapman and Hall.

Fagundo, M.A. & Isidoro, A.M. (2004). Propagação das Espécies Lenhosas Endémicas dos Açores. Direcção Regional dos Recursos Florestais, Vila do Nordeste.

França, Z., Cruz, J.V., Nunes, J.C., Forjaz, V.H. (2005). - Geologia actual dos Açores: Uma perspectiva actual. 140 pp.

Frett, J.J. & Smagula. (1982). In vitro shoot production of lowbush blueberry. Can. J. Plant Sci. 63: 467-472.

George, E.F. & Sherrington, P.D. (1984). Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd.

Hatzilazarou, S., Rifaki, N., Patsou, M., Kostas, S. & Economou, A.S. (2009). *In vitro* propagation of *Viburnum dentatum* L. var. *Lucidum* Aiton. Propag. Ornam. Plants 9:39-42.

Ibañez, M.A., Martin, C. & Pérez, C. (2003). Alternative statistical analyses for 315 micropropagation: a practical case of proliferation and rooting phases in *Viburnum opulus*. *In vitro* Cell. Dev.-Pl. 39:429-436.

IPNI (2015). The International Plant Names Index <http://www.ipni.org/ipni/plantnamesearchpage.do> (Last updated 23 April 2015).

International Union for Conservation of Nature Red List Categories and Criteria, version 3.1. (2001). [www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria/2001](http://www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria/2001) categories-criteria.

Karlsson L. M., Hidayati, S.N., Walck, J.L. & Milberg, P. (2004). Complex combination of seed dormancy and seedling development determine emergence of *Viburnum tinus* (Caprifoliaceae). *Annals of Botany* 95(2):323-330.

Knowles, R.H. & Zalik, S. (1958). Effects of temperature treatment and of a native inhibitor on seed dormancy and of cotyledon removal on epicotyl growth in *viburnum trilobum* marsh. *Canadian Journal of Botany*. 36(5): 561-566.

Lloyd, G. & McCown, B.H. (1981). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-427.

Macarthur, R. H. & Wilson, E. O. (1963). Na equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution* 17: 373 – 387.

Macarthur, R. H. & Wilson, E. O. (1967). The theory of Island biogeography. Princeton University Press, Princeton.

Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber A. (1989). The germination of seeds, 4th ed. Oxford. Pergamon Press.

Melville, R. (1979). Endangered island flora. *In*: Bramwell D (ed.) Plants and islands, pp 361 – 377, Academic Press, London.

Meyer, G. A. & Witmer, M. C. (1998). Influence of Seed Processing by Frugivorous Birds on Germination Success of Three North American Shrubs. The American Midland Naturalist 140(1):129-139.

Mikulík, J. (1999). Propagation of Endangered Plant Species by Tissue Cultures. Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium.

Moncaleán, P., Rodríguez, A. & Fernández, B. (2001). *In vitro* response of *Actinidia deliciosa* explants to different BA incubation periods. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 67:257-266.

Moura, M. (2005). Desenvolvimento de estratégias para a conservação de *Viburnum tinus* ssp. *subcordatum* (Trel.) P.Silva. Multiplicação por via seminal e vegetativa e estudo da variabilidade genética das suas populações. Tese de doutoramento. Universidade dos Açores.

Moura, M. & Silva, L. (2009). Vegetative propagation of the Azorean endemic shrub *Viburnum treleasei* Gand. Arquipélago, Life and Marine Sciences 26:1-7.

Moura, M., Candeias, M. & Silva, L. (2009). *In vitro* propagation of *Viburnum treleasei* Gand., an Azorean endemic with high ornamental interest. HortScience 44:1668-1671.

Moura, M. & Silva, L., (2010). Seed Germination of *Viburnum Treleasei* Gand., An Azorean Endemic with High Ornamental Potential. *Propagation of Ornamental Plants*, 10: 129-135.

Moura, M., Silva, L., Caujapé-Castells, J. (2013). Population genetics in the conservation of the Azorean shrub *Viburnum treleasei* Gand. Plant Syst Evol. 299: 1809-1817.

Nikolaeva, M.G. (1977). Factors controlling the seed dormancy pattern. In: Kahn AA, ed. The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 51–74

Nobre, J., Santos, C. & Romano, A. (2000). Micropropagation of the Mediterranean species *Viburnum tinus*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60:75-78.

Peixe, A., Raposo A., Lourenço R., Cardoso, H. & Macedo E., (2007). Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. Scientia Horticulturae 113: 1-7.

Palhinha, R.T., 1966. Catálogo das plantas vasculares dos Açores. Sociedade de Estudos Açorianos Afonso Chaves (Ed.), Lisboa.

Pereira, M.J., Prisca, H., Furtado, D. & Gonçalves, V. (2004). Checklist of vascular plants of Graciosa Island. Catálogo das plantas vasculares da Ilha Graciosa. Relatórios e Comunicações do Departamento de Biologia 32: 69-92.

Pereira, M.J. & Canhoto, J. (2010). Somatic embryogenesis and *in vitro* germination of *Viburnum treleasei* Gand. Embryos. The International Symposium FloraMac2010. Ponta Delgada, Portugal 23-25 September. p.72.

Pereira, M.J., Prisca, H.M., Furtado, D.S. & Gonçalves, V. (2004). Catálogo das plantas vasculares da Ilha Graciosa. Relatórios e Comunicações do Departamento de Biologia 32:69-92.

Preece, J.E. (2008). Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. p.403-422. In: E.F. George, M.A. Hall and G.-J. De Klerk (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*, Third ed., Springer, Dordrecht.

Silva, L., Martins, M., Maciel, G. & Moura, M., (2009). *Flora Vascular dos Açores. Prioridades em Conservação*. Amigos dos Açores & CCPA, Ponta Delgada, 116 pp.

Schaefer H, (2005). *Flora of the Azores, a field guide*. 2nd edition. Margraf Publishers, Weikersheim.

Schaefer, H., (2003). *Chorology and Diversity of the Azorean Flora Part II Commented Checklist of the Azorean Flora Distribution Atlas of Flores, Faial and Santa Maria*. PhD Thesis. University of Regensburg, Regensburg.


Schoene, G. & Yeager, T. (2005). Micropropagation of sweet viburnum (*Viburnum odoratissimum*). *Plant Cell Tiss. Org Cult.* 83: 271-277

Talia, M.A.C., La Viola, F. & Cristiano, G. (2004). Influence of the sampling time, type of cutting and indole-3-butyric acid (IBA) on cutting rooting of *Viburnum tinus* L. p.33-40. In: L. Ciccarese, S. Lucci and A. Mattsson (eds.), *Nursery Production and Stand Establishment of Broad-leaves to Promote Sustainable Forest Management*, APAT, Rome.

Winkworth, R. C.; Donoghue, M. J. (2005). *Viburnum* phylogeny based on combined molecular data: implications for taxonomy and biogeography. *American Journal of Botany* 92 (4): 653–66. [doi:10.3732/ajb.92.4.653](https://doi.org/10.3732/ajb.92.4.653). [PMID 21652443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21652443/)

## Anexos

### Anexo 1 – Preparação de 1 l e 500 ml do meio WPM. SM = Solução-Mãe.

Ordem	Volumes e Pesos para:	Para 1 litro de meio retirar	500 ml de meio
A	Água destilada	≈200ml	≈100ml
B	SM 1	100 ml	50 ml
C	SM 2	100 ml	50 ml
D	SM 3	100 ml	50 ml
E	SM 4	100 ml	50 ml
F	SM 5	100 ml	50 ml
G	SM 6	100 ml	50 ml
H	SM 7	10 ml	5 ml
I	SM 8	10 ml	5 ml
J	SM 9	10 ml	5 ml
K	SM 10	10 ml	5 ml
L	SM 11	10 ml	5 ml
M	Inositol (B53)	Pesar 100 mg	Pesar 50 mg
N	Sacarose 2% (O9)	Pesar 20g	Pesar 10g
O			
P	Acertar volume para	1 litro	500 ml
Q	Acertar pH	5.6	5.6
R	Agar (O2)	9 g	4,5 g

## Anexo 2 – Preparação das soluções-mãe (S-M) do meio WPM.

	Peso	Laboratório	S-M	1l 10XCC	1l 10XCC	
WPM	mg/l	Referência	Nº	mg/l	g/l	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	B52	1	4000	4.000	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	556	B11	2	5560	5.560	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	96	B7	3	960	0.960	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990	B92	4	9900	9.900	
Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	B4	5	3700	3,700	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	B16	6	1700	1.700	
	Peso	Laboratório	S-M	1l 100 X CC	1l 100 X CC	500ml 100XCC
	mg/l	Referência	Nº	mg/l	g/l	g/500ml
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,8998	B25	7	1689,98	1.6901	0.84505
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,600	B43		860,0	0.860	0,430
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200	B3	8	620,0	0.620	0,310
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25	B19	9	25	0.0250	0,0125
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250	B42		25	0.0250	0,0125
				1l 100 X CC	100ml 100XCC	100ml 100XCC
				mg/l	mg/100ml	g/100ml
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,800	B44	10*	2780.0	278	0,278
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,300	B14		3730.0	373	0,373
Tiamina.HCl	1	B34	11	100	10	0,01
Ácido nicotínico	0.5	B28		50	5	0,005
Piridoxina.HCl	0.5	B98		50	5	0,005
Glicina	2	B59		200	20	0.20

### Anexo 3 – Fase Proliferativa (SPSS)

#### 1. Variável: Número de rebentos por explantado

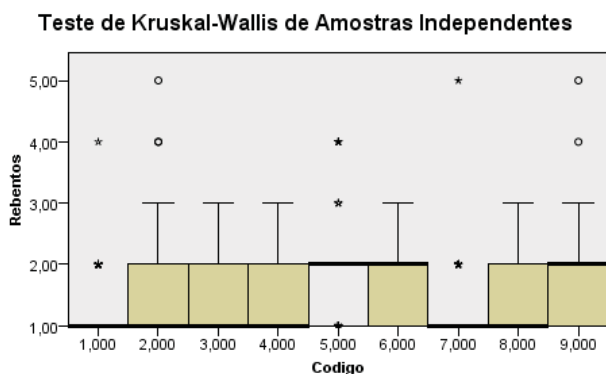
##### a. SPSS Estatística descritiva

$\mu$ M	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Zeatina 1,14	95		
Zeatina 4,56	88	1,56	,814	,087	1,38	1,73	1	5
Zeatina 22,81	96	1,43	,576	,059	1,31	1,54	1	3
2-iP 1,23	33	1,39	,609	,106	1,18	1,61	1	3
2-iP 4,92	37	2,05	,880	,145	1,76	2,35	1	4
2-iP 24,60	44	1,57	,545	,082	1,40	1,73	1	3
BA 1,11	59	1,22	,618	,080	1,06	1,38	1	5
BA 4,44	22	1,32	,568	,121	1,07	1,57	1	3
BA 20,22	26	2,00	,980	,192	1,60	2,40	1	5
Total	500	1,45	,705	,032	1,39	1,52	1	5

##### a. SPSS Teste à homogeneidade das variâncias

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6,678	8	491	,000

##### b. SPSS Teste de Kruskal-Walis



N total	500
Estatística de teste	80,157
Graus de liberdade	8
Sig. assintótico (teste de 2 lados)	,000

1. A estatística de teste está ajustada para empates.



Subconjuntos Homogêneos baseados em Rebentos						
		Subconjunto				
		1	2	3	4	5
Amostra <sup>1</sup>	Zeatina 1,14	190,168				
	BA 1,11	201,025	201,025			
	BA 4,44	227,341	227,341	227,341		
	2-iP 1,23		242,848	242,848		
	Zeatina 22,81			253,443		
	Zeatina 4,56			264,716		
	2-iP 24,60			289,352	289,352	
	BA 20,22				339,577	339,577
	2-iP 4,92					354,649
Estatística de teste		3,008	3,424	4,940	3,416	,148
Sig. (teste de 2 lado(s))		,222	,181	,293	,065	,700
Sig. Ajustada (teste de 2 lado(s))		,529	,450	,465	,259	,996
Subconjuntos homogêneos são baseados em significâncias assintóticas. O nível de significância é ,05.						
<sup>1</sup> Cada célula mostra a posição média de amostra de Rebentos.						

## 2. Variável: Número de nós por rebento

### a. SPSS Estatística descritiva

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Zeatina 1,14	109	2,8349	1,11815	,10710	2,6226	3,0472	1,00	6,00
Zeatina 4,56	137	2,0292	1,11105	,09492	1,8415	2,2169	1,00	6,00
Zeatina 22,81	137	2,1533	1,31110	,11201	1,9318	2,3748	1,00	6,00
2-iP 1,23	46	1,0435	,20618	,03040	,9822	1,1047	1,00	2,00
2-iP 4,92	91	1,0000	,00000	,00000	1,0000	1,0000	1,00	1,00
2-iP 24,60	69	1,5507	,50106	,06032	1,4304	1,6711	1,00	2,00
BA 1,11	72	2,6667	,93447	,11013	2,4471	2,8863	1,00	5,00
BA 4,44	29	3,2069	1,49712	,27801	2,6374	3,7764	1,00	6,00
BA 20,22	52	1,3846	,49125	,06812	1,2479	1,5214	1,00	2,00
Total	742	2,0013	1,16922	,04292	1,9171	2,0856	1,00	6,00

b. SPSS Teste à homogeneidade das variâncias

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
41,319	8	733	,000

c. SPSS Teste de Kruskal-Walis

Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Nº_de_nós_por_rebento
Chi-Square	279,346
df	8
Asymp. Sig.	,000

a.Kruskal Wallis Test

b.Grouping Variable: Codigo

Subconjuntos Homogêneos baseados em Nº_de_Nós						
		Subconjunto				
		1	2	3	4	5
Amostra <sup>1</sup>	2-iP 4,92	166,500				
	2-iP 1,23		178,304			
	BA 20,22			270,923		
	2-iP 24,60			316,022		
	Zeatina 4,56				384,668	
	Zeatina 22,81				389,434	
	BA 1,11					515,160
	Zeatina 1,14					527,014
	BA 4,44					545,448
Estatística de teste		. <sup>2</sup>	. <sup>2</sup>	3,251	,057	2,781
Sig. (teste de 2 lado(s))		.	.	,071	,812	,249
Sig. Ajustada (teste de 2 lado(s))		.	.	,283	,999	,576
Subconjuntos homogêneos são baseados em significâncias assintóticas. O nível de significância é ,05.						
<sup>1</sup> Cada célula mostra a posição média de amostra de Nº_de_Nós.						
<sup>2</sup> Não é possível calcular, pois o subconjunto contém somente uma amostra.						

### 3. Variável: Comprimento do rebento (cm)

#### a. SPSS Estatística descritiva

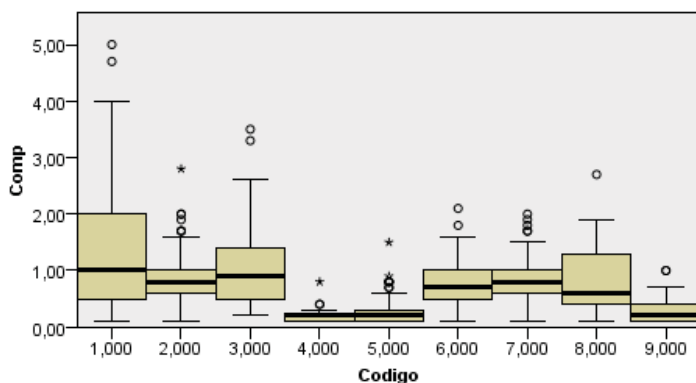
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
<b>Zeatina 1,14</b>	109	1,3532	1,07390	,10286	1,1493	1,5571	,10	5,00
<b>Zeatina 4,56</b>	137	,8482	,44969	,03842	,7722	,9242	,10	2,80
<b>Zeatina 22,81</b>	137	1,0474	,69187	,05911	,9306	1,1643	,20	3,50
<b>2-iP 1,23</b>	46	,1891	,12334	,01819	,1525	,2258	,10	,80
<b>2-iP 4,92</b>	91	,2670	,24543	,02573	,2159	,3181	,10	1,50
<b>2-iP 24,60</b>	69	,7638	,44224	,05324	,6575	,8700	,10	2,10
<b>BA 1,11</b>	72	,8514	,40663	,04792	,7558	,9469	,10	2,00
<b>BA 4,44</b>	29	,8862	,64294	,11939	,6416	1,1308	,10	2,70
<b>BA 20,22</b>	52	,2750	,22481	,03118	,2124	,3376	,10	1,00
<b>Total</b>	742	,8008	,69930	,02567	,7504	,8512	,10	5,00

#### b. SPSS Teste à homogeneidade das variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
35,420	8	733	,000

c. SPSS Teste de Kruskal-Walis

Teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes



<b>N total</b>	742
<b>Estatística de teste</b>	288,169
<b>Graus de liberdade</b>	8
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

1. A estatística de teste está ajustada para empates.

Subconjuntos Homogêneos baseados no Comprimento				
		Subconjunto		
		1	2	3
Amostra <sup>1</sup>	2-iP 1,23	118,065		
	2-iP 4,92	156,385		
	BA 20,22	163,279		
	2-iP 24,60		396,413	
	BA 4,44		412,069	
	Zeatina 4,56		430,478	
	BA 1,11		439,236	
	Zeatina 22,81		465,073	465,073
	Zeatina 1,14			494,335
<b>Estatística de teste</b>		2,225	7,228	2,658
<b>Sig. (teste de 2 lado(s))</b>		,329	,124	,103
<b>Sig. Ajustada (teste de 2 lado(s))</b>		,697	,213	,387
Subconjuntos homogêneos são baseados em significâncias assintóticas. O nível de significância é ,05.				
<sup>1</sup> Cada célula mostra a posição média de amostra de Comp.				

## Anexo 4 – Subculturas (SPSS)

### Rebentos por explantado (nº) - Zeatina 1,14 µM

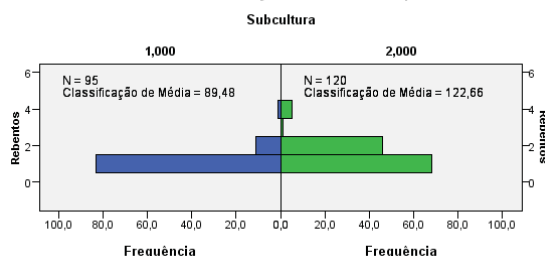
#### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	95	1,1474	,43683	,04482	1,0584	1,2364	1,00	4,00
2,00	120	1,5250	,72137	,06585	1,3946	1,6554	1,00	4,00
Total	215	1,3581	,63916	,04359	1,2722	1,4441	1,00	4,00

#### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
41,391	1	213	,000

#### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



<b>N total</b>	215
<b>U de Mann-Whitney</b>	7.459,500
<b>Wilcoxon W</b>	14.719,500
<b>Estatística de teste</b>	7.459,500
<b>Erro padrão</b>	360,953
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	4,875
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

### Nós por rebento (nº) - Zeatina 1,14 µM

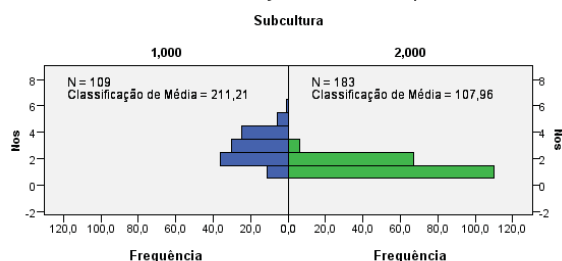
#### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	109	2,8349	1,11815	,10710	2,6226	3,0472	1,00	6,00
2,00	183	1,4317	,55912	,04133	1,3501	1,5132	1,00	3,00
Total	292	1,9555	1,05911	,06198	1,8335	2,0775	1,00	6,00

#### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
64,275	1	290	,000

#### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



<b>N total</b>	292
<b>U de Mann-Whitney</b>	2.920,000
<b>Wilcoxon W</b>	19.756,000
<b>Estatística de teste</b>	2.920,000
<b>Erro padrão</b>	655,584
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	-10,759
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

## Comprimento (cm) - Zeatina 1,14 µM

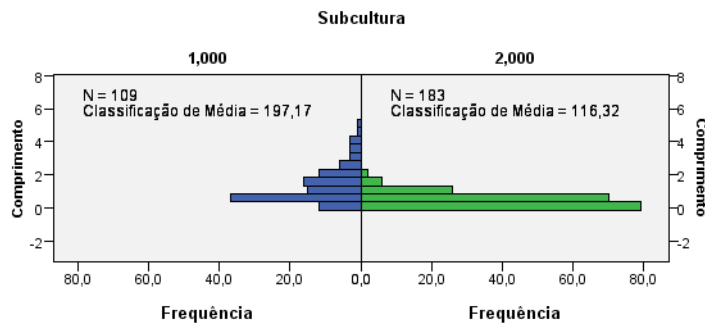
### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	109	1,3532	1,07390	,10286	1,1493	1,5571	,10	5,00
2,00	183	,5235	,39230	,02900	,4663	,5807	,10	2,00
Total	292	,8332	,82817	,04847	,7378	,9286	,10	5,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
101,521	1	290	,000

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



N total	292
U de Mann-Whitney	4.451,000
Wilcoxon W	21.287,000
Estatística de teste	4.451,000
Erro padrão	695,701
Estatística de Teste Padronizado	-7,938
Sig. assintótico (teste de 2 lados)	,000

## Rebentos por explantado (nº) - Zeatina 4,56 µM

### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	88	1,5568	,81449	,08683	1,3842	1,7294	1,00	5,00
2,00	78	1,6154	,79333	,08983	1,4365	1,7943	1,00	4,00
Total	166	1,5843	,80272	,06230	1,4613	1,7074	1,00	5,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
,004	1	164	,947

### Teste de amostras independentes

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
	Z	Sig.	t	df	Sig.(2 extremidades)	Diferença a média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
								Inferior	Superior
Variâncias iguais assumidas	,004	,947	-,468	164	,640	-,05857	,12513	-,30564	,18851
Variâncias iguais não assumidas			-,469	162,529	,640	-,05857	,12493	-,30526	,18813

## Nós por explantado (nº) - Zeatina 4,56 µM

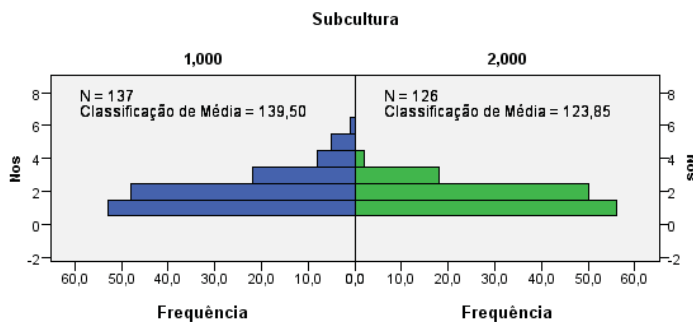
### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	137	2,0292	1,11105	,09492	1,8415	2,2169	1,00	6,00
2,00	126	1,7302	,76328	,06800	1,5956	1,8647	1,00	4,00
Total	263	1,8859	,97012	,05982	1,7681	2,0037	1,00	6,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
5,009	1	261	,026

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



<b>N total</b>	263
<b>U de Mann-Whitney</b>	7.604,000
<b>Wilcoxon W</b>	15.605,000
<b>Estatística de teste</b>	7.604,000
<b>Erro padrão</b>	575,957
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	-1,783
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,075

## Comprimento (cm) - Zeatina 4,56 µM

### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	137	,8482	,44969	,03842	,7722	,9242	,10	2,80
2,00	126	,8921	,57517	,05124	,7907	,9935	,20	2,60
Total	263	,8692	,51311	,03164	,8069	,9315	,10	2,80

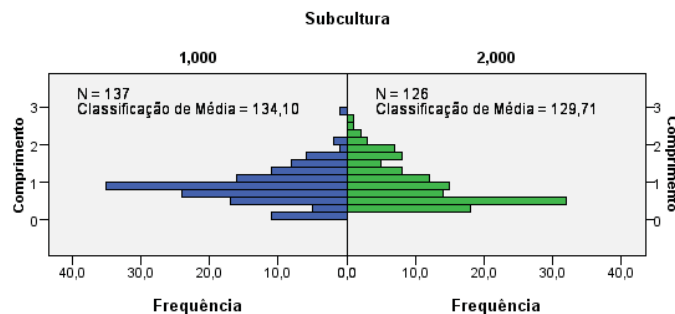
### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Comprimento

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
12,953	1	261	,000

<b>N total</b>	263
<b>U de Mann-Whitney</b>	8.343,000
<b>Wilcoxon W</b>	16.344,000
<b>Estatística de teste</b>	8.343,000
<b>Erro padrão</b>	614,598
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	-,469
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,639

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



## Rebentos por explantado (nº) - Zeatina 22,81 µM

### Descritivos

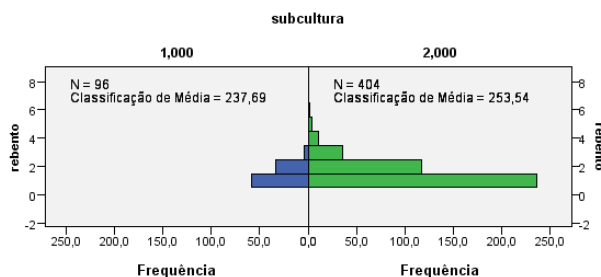
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	96	1,4271	,57573	,05876	1,3104	1,5437	1,00	3,00
2,00	404	1,5965	,86457	,04301	1,5120	1,6811	1,00	6,00
Total	500	1,5640	,81930	,03664	1,4920	1,6360	1,00	6,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
10,384	1	498	,001

<b>N total</b>	500
<b>U de Mann-Whitney</b>	20.621,500
<b>Wilcoxon W</b>	102.431,500
<b>Estatística de teste</b>	20.621,500
<b>Erro padrão</b>	1.114,529
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	1,103
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,270

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes





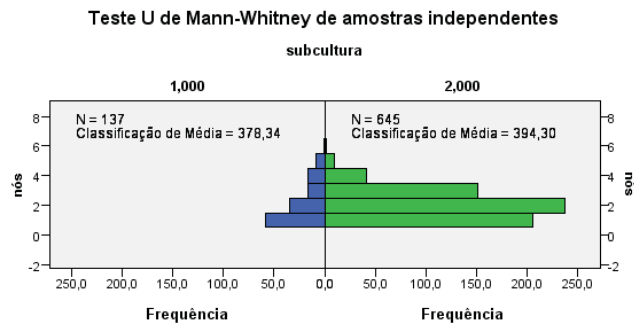
## Nós por explantado (nº) - Zeatina 22,81 µM

### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	137	2,1533	1,31110	,11201	1,9318	2,3748	1,00	6,00
2,00	645	2,0961	,98122	,03864	2,0203	2,1720	1,00	6,00
Total	782	2,1061	1,04581	,03740	2,0327	2,1796	1,00	6,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
25,769	1	780	,000



N total	782
U de Mann-Whitney	45.986,000
Wilcoxon W	254.321,000
Estatística de teste	45.986,000
Erro padrão	2.289,511
Estatística de Teste Padronizado	,788
Sig. assintótico (teste de 2 lados)	,431

## Comprimento (cm) - Zeatina 22,81 µM

### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	137	1,0474	,69187	,05911	,9306	1,1643	,20	3,50
2,00	645	,9921	,64448	,02538	,9423	1,0419	,10	3,20
Total	782	1,0018	,65291	,02335	,9560	1,0476	,10	3,50

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
1,255	1	780	,263

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Comprimento	Equal variances assumed	1,255	,263	,901	780	,368	,05535	,06143	-,06523	,17594
	Equal variances not assumed			,860	189,391	,391	,05535	,06433	-,07154	,18224

**Rebentos por explantado (nº) - 2-IP 1,23 µM**

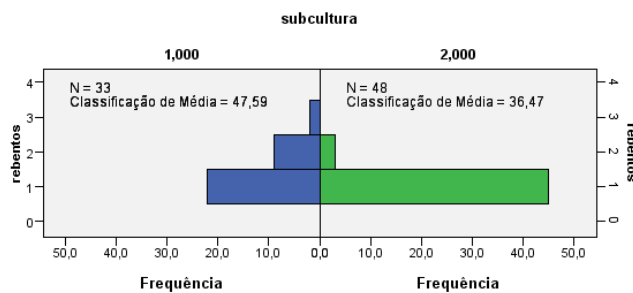
**Descritivos**

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	33	1,3939	,60927	,10606	1,1779	1,6100	1,00	3,00
2,00	48	1,0625	,24462	,03531	,9915	1,1335	1,00	2,00
Total	81	1,1975	,45880	,05098	1,0961	1,2990	1,00	3,00

**Teste de Homogeneidade de Variâncias**

Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
52,205	1	79	,000

**Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes**



<b>N total</b>	81
<b>U de Mann-Whitney</b>	574,500
<b>Wilcoxon W</b>	1.750,500
<b>Estatística de teste</b>	574,500
<b>Erro padrão</b>	68,291
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	-3,185
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,001

## Nós por explantado (nº) - 2-IP 1,23 µM

### Descritivos

Nos

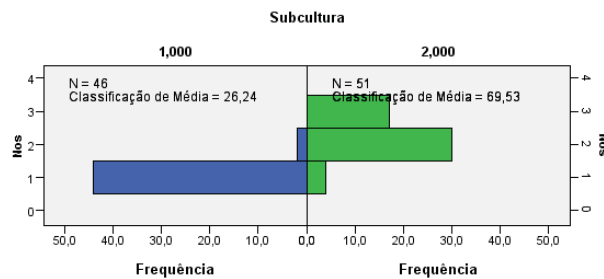
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	46	1,0435	,20618	,03040	,9822	1,1047	1,00	2,00
2,00	51	2,2549	,59475	,08328	2,0876	2,4222	1,00	3,00
Total	97	1,6804	,75755	,07692	1,5277	1,8331	1,00	3,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Nos

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
58,675	1	95	,000

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



<b>N total</b>	97
<b>U de Mann-Whitney</b>	2.220,000
<b>Wilcoxon W</b>	3.546,000
<b>Estatística de teste</b>	2.220,000
<b>Erro padrão</b>	126,681
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	8,265
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

## Comprimento (cm) - 2-IP 1,23 µM

### Descritivos

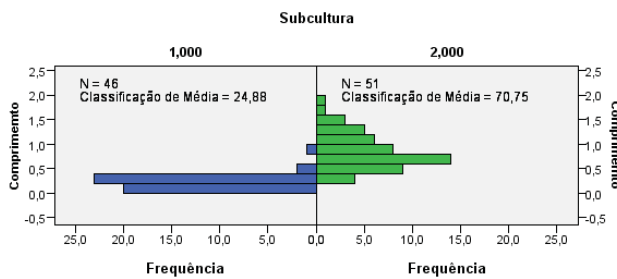
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	46	,1891	,12334	,01819	,1525	,2258	,10	,80
2,00	51	,8000	,37630	,05269	,6942	,9058	,20	1,90
Total	97	,5103	,41820	,04246	,4260	,5946	,10	1,90

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Comprimento

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
37,777	1	95	,000

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



<b>N total</b>	97
<b>U de Mann-Whitney</b>	2.282,500
<b>Wilcoxon W</b>	3.608,500
<b>Estatística de teste</b>	2.282,500
<b>Erro padrão</b>	137,108
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	8,092
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

## Rebentos por explantado (nº) - 2-IP 4,92 µM

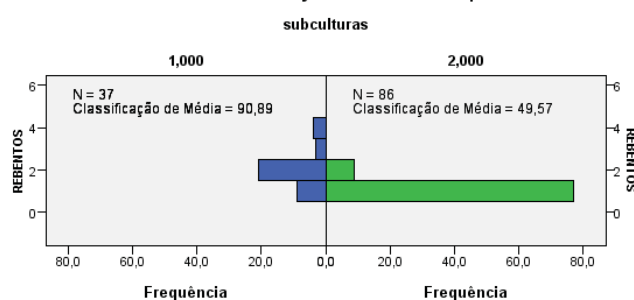
### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	37	2,0541	,88021	,14471	1,7606	2,3475	1,00	4,00
2,00	86	1,1047	,30790	,03320	1,0386	1,1707	1,00	2,00
Total	123	1,3902	,69700	,06285	1,2658	1,5147	1,00	4,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
22,582	1	121	,000

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



<b>N total</b>	123
<b>U de Mann-Whitney</b>	522,000
<b>Wilcoxon W</b>	4.263,000
<b>Estatística de teste</b>	522,000
<b>Erro padrão</b>	145,480
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	-7,348
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

## Nós por explantado (nº) - 2-IP 4,92 µM

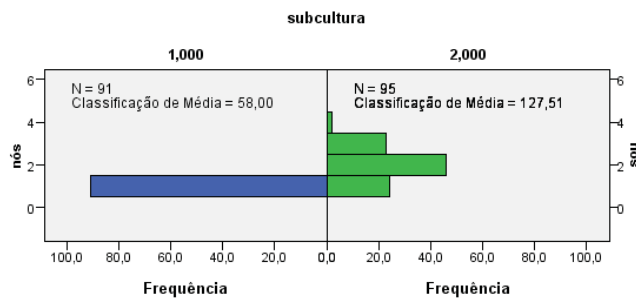
### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	91	1,0000	,00000	,00000	1,0000	1,0000	1,00	1,00
2,00	95	2,0316	,76426	,07841	1,8759	2,1873	1,00	4,00
Total	186	1,5269	,75109	,05507	1,4182	1,6355	1,00	4,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
100,232	1	184	,000

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



<b>N total</b>	186
<b>U de Mann-Whitney</b>	7.553,000
<b>Wilcoxon W</b>	12.113,000
<b>Estadística de teste</b>	7.553,000
<b>Erro padrão</b>	317,156
<b>Estadística de Teste Padronizado</b>	10,186
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

## Comprimento (cm) - 2-IP 4,92 µM

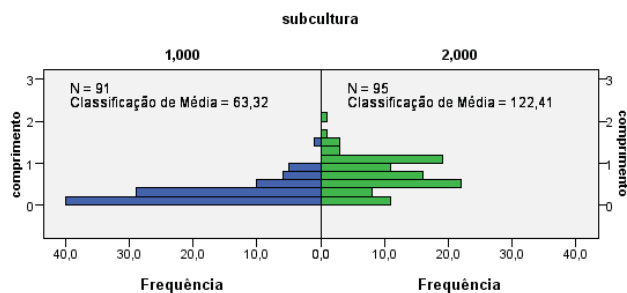
### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	91	,2670	,24543	,02573	,2159	,3181	,10	1,50
2,00	95	,6747	,38756	,03976	,5958	,7537	,10	2,00
Total	186	,4753	,38391	,02815	,4197	,5308	,10	2,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
20,619	1	184	,000

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



<b>N total</b>	186
<b>U de Mann-Whitney</b>	7.069,000
<b>Wilcoxon W</b>	11.629,000
<b>Estadística de teste</b>	7.069,000
<b>Erro padrão</b>	362,195
<b>Estadística de Teste Padronizado</b>	7,583
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

## Rebentos por explantado (nº) - 2-IP 24,60 µM

### Descritivos

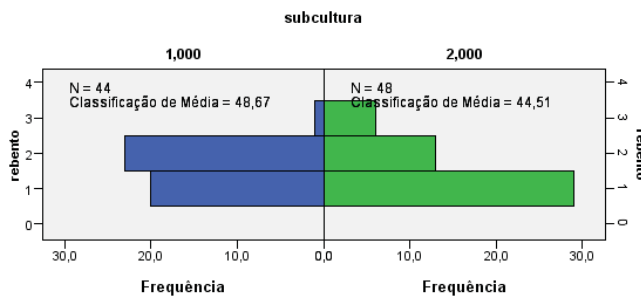
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	44	1,5682	,54550	,08224	1,4023	1,7340	1,00	3,00
2,00	48	1,5208	,71428	,10310	1,3134	1,7282	1,00	3,00
Total	92	1,5435	,63615	,06632	1,4117	1,6752	1,00	3,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
4,365	1	90	,040

<b>N total</b>	92
<b>U de Mann-Whitney</b>	960,500
<b>Wilcoxon W</b>	2.136,500
<b>Estatística de teste</b>	960,500
<b>Erro padrão</b>	113,616
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	-,841
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,401

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



## Nós por explantado (nº) - 2-IP 24,60 µM

### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	69	1,5507	,50106	,06032	1,4304	1,6711	1,00	2,00
2,00	73	2,0000	,81650	,09556	1,8095	2,1905	1,00	5,00
Total	142	1,7817	,71574	,06006	1,6629	1,9004	1,00	5,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
,533	1	140	,467

**Teste de amostras independentes**

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
No Variâncias iguais assumidas	,533	,467	3,925	140	,000	-,44928	,11447	-,67559	-,22296	
Variâncias iguais não assumidas			3,976	120,542	,000	-,44928	,11301	-,67302	-,22554	

**Comprimento (cm) - 2-IP 24,60 µM**

**Descritivos**

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	69	,7638	,44224	,05324	,6575	,8700	,10	2,10
2,00	73	,7014	,48319	,05655	,5886	,8141	,10	2,00
Total	142	,7317	,46316	,03887	,6549	,8085	,10	2,10

**Teste de Homogeneidade de Variâncias**

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
,267	1	140	,606

**Teste de amostras independentes**

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
Comprimento	Variâncias iguais assumidas	,267	,606	,801	140	,424	,06240	,07787	-,09155	,21634
	Variâncias iguais não assumidas			,803	139,859	,423	,06240	,07767	-,09116	,21596

## Rebentos por explantado (nº) - BA 1,11 µM

### Descritivos

rebentos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	59	1,2203	,61778	,08043	1,0593	1,3813	1,00	5,00
2,00	112	1,8839	1,07171	,10127	1,6833	2,0846	1,00	6,00
Total	171	1,6550	,99008	,07571	1,5055	1,8044	1,00	6,00

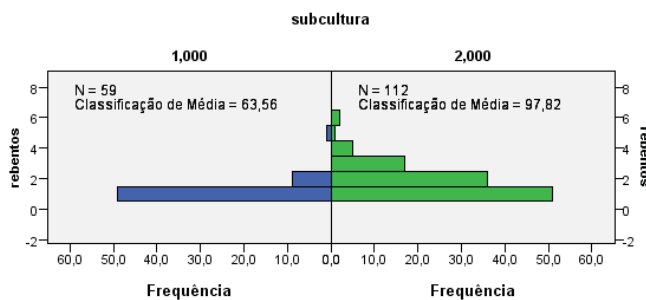
### Teste de Homogeneidade de Variâncias

rebentos

Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
18,204	1	169	,000

<b>N total</b>	171
<b>U de Mann-Whitney</b>	4.628,000
<b>Wilcoxon W</b>	10.956,000
<b>Estadística de teste</b>	4.628,000
<b>Erro padrão</b>	271,943
<b>Estadística de Teste Padronizado</b>	4,869
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



## Nós por explantado (nº) - BA 1,11 µM

### Descritivos

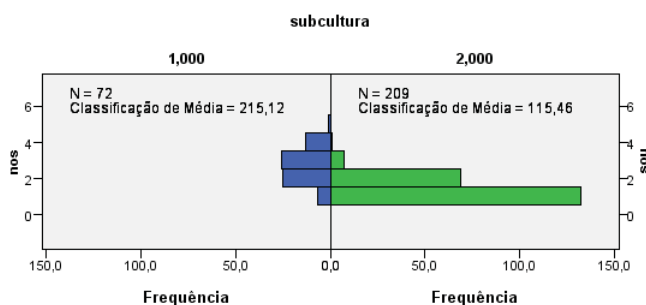
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	72	2,6667	,93447	,11013	2,4471	2,8863	1,00	5,00
2,00	209	1,4115	,58265	,04030	1,3320	1,4909	1,00	4,00
Total	281	1,7331	,88030	,05251	1,6297	1,8365	1,00	5,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
33,827	1	279	,000

<b>N total</b>	281
<b>U de Mann-Whitney</b>	2.187,000
<b>Wilcoxon W</b>	24.132,000
<b>Estadística de teste</b>	2.187,000
<b>Erro padrão</b>	544,954
<b>Estadística de Teste Padronizado</b>	-9,793
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes





## Comprimento (cm) – BA 1,11 µM

### Descritivos

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	72	,8514	,40663	,04792	,7558	,9469	,10	2,00
2,00	209	,5043	,39190	,02711	,4509	,5577	,10	1,90
Total	281	,5932	,42316	,02524	,5435	,6429	,10	2,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
,064	1	279	,801

### Teste de amostras independentes

	Teste de Levene para igualdade de variâncias	teste-t para Igualdade de Médias								
						Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
		Z	Sig.	t	df				Inferior	Superior
comprimento	Variâncias iguais assumidas	,064	,801	6,419	279	,000	,34708	,05407	,24064	,45353
	Variâncias iguais não assumidas			6,304	119,531	,000	,34708	,05506	,23807	,45610

## Rebentos por explantado (nº) - BA 4,44 µM

### Descritivos

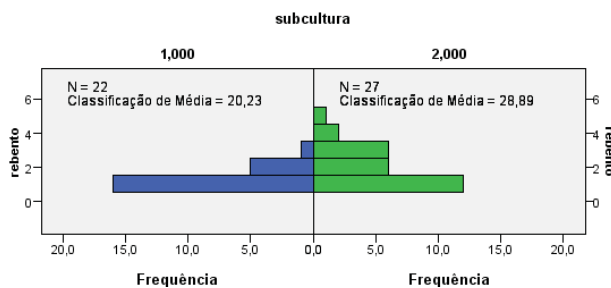
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	22	1,3182	,56790	,12108	1,0664	1,5700	1,00	3,00
2,00	27	2,0370	1,15962	,22317	1,5783	2,4958	1,00	5,00
Total	49	1,7143	1,00000	,14286	1,4271	2,0015	1,00	5,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
9,718	1	47	,003

<b>N total</b>	49
<b>U de Mann-Whitney</b>	402,000
<b>Wilcoxon W</b>	780,000
<b>Estatística de teste</b>	402,000
<b>Erro padrão</b>	44,482
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	2,361
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,018

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes



## Nós por explantado (nº) - BA 4,44 µM

### Descritivos

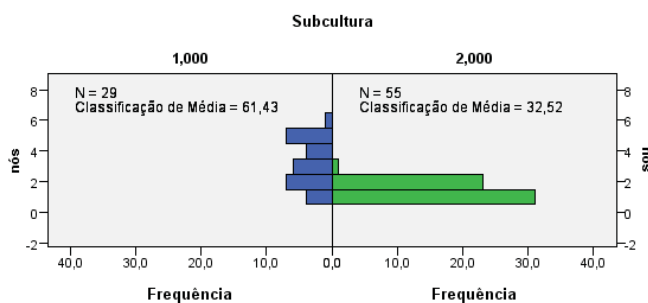
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1,00	29	3,2069	1,49712	,27801	2,6374	3,7764	1,00	6,00
2,00	55	1,4545	,53811	,07256	1,3091	1,6000	1,00	3,00
Total	84	2,0595	1,28336	,14003	1,7810	2,3380	1,00	6,00

### Teste de Homogeneidade de Variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
54,646	1	82	,000

<b>N total</b>	84
<b>U de Mann-Whitney</b>	248,500
<b>Wilcoxon W</b>	1.788,500
<b>Estatística de teste</b>	248,500
<b>Erro padrão</b>	99,765
<b>Estatística de Teste Padronizado</b>	-5,503
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

### Teste U de Mann-Whitney de amostras independentes





## Anexo 5 – Enraizamento (SPSS)

### 1. Variável: Número de Raízes por Planta

#### a. SPSS Estatística Descritiva

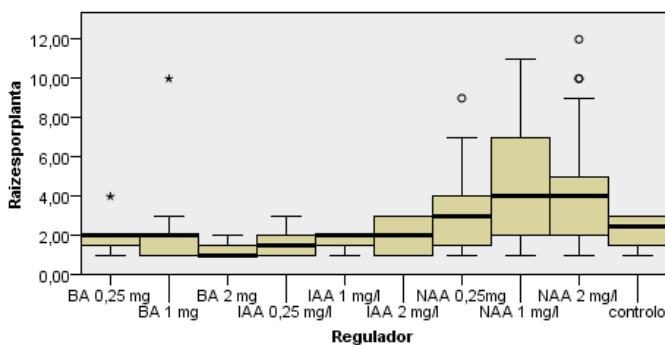
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
<b>Controlo</b>	4	2,2500	,95743	,47871	,7265	3,7735	1,00	3,00
<b>IBA 1,23</b>	8	2,0000	,92582	,32733	1,2260	2,7740	1,00	4,00
<b>IBA 4,92</b>	9	2,6667	2,82843	,94281	,4925	4,8408	1,00	10,00
<b>IBA 9,84</b>	8	1,2500	,46291	,16366	,8630	1,6370	1,00	2,00
<b>NAA 1,34</b>	24	3,2917	2,15647	,44019	2,3811	4,2023	1,00	9,00
<b>NAA 5,37</b>	26	4,8077	3,16252	,62022	3,5303	6,0851	1,00	11,00
<b>NAA 10,74</b>	31	4,2258	2,99677	,53824	3,1266	5,3250	1,00	12,00
<b>IAA 1,43</b>	8	1,6250	,74402	,26305	1,0030	2,2470	1,00	3,00
<b>IAA 5,71</b>	7	1,7143	,48795	,18443	1,2630	2,1656	1,00	2,00
<b>IAA 11,42</b>	6	2,0000	1,09545	,44721	,8504	3,1496	1,00	3,00
<b>Total</b>	131	3,2901	2,63552	,23027	2,8345	3,7456	1,00	12,00

#### b. SPSS Teste à homogeneidade das variâncias

Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
4,664	9	121	,000

#### c. SPSS Teste de Kruskal-Walis

##### Teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes



<b>N total</b>	131
<b>Estadística de teste</b>	32,255
<b>Graus de liberdade</b>	9
<b>Sig. assintótico (teste de 2 lados)</b>	,000

1. A estatística de teste está ajustada para empates.

**Subconjuntos Homogêneos baseados no nº de Raizes por planta**

		Subconjunto		
		1	2	3
<b>Amostra<sup>1</sup></b>	<b>IBA 9,84</b>	26,875		
	<b>IAA 1,43</b>	39,000		
	<b>IAA 5,71</b>	43,357		
	<b>IAA 11,42</b>	48,750	48,750	
	<b>IBA 1,23</b>	50,000	50,000	
	<b>IBA 4,92</b>	52,778	52,778	52,778
	<b>Controlo</b>	57,625	57,625	57,625
	<b>NAA 1,34</b>	70,521	70,521	70,521
	<b>NAA 10,74</b>		80,806	80,806
	<b>NAA 5,37</b>			85,385
<b>Estatística de teste</b>		13,963	10,338	7,771
<b>Sig. (teste de 2 lado(s))</b>		,052	,066	,100
<b>Sig. Ajustada (teste de 2 lado(s))</b>		,064	,108	,191

Subconjuntos homogêneos são baseados em significâncias assintóticas. O nível de significância é ,05.

<sup>1</sup>Cada célula mostra a posição média de amostra de Raizes por planta.

## Anexo 6 – Aclimação (SPSS)

### 1 Variável: Gemas por explantado

#### a. SPSS Estatística descritiva

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
<b>Controlo 0</b>	41	4,3415	1,47665	,23061	3,8754	4,8076	2,00	6,00
<b>2-iP 24,60</b>	53	5,6604	1,69777	,23321	5,1924	6,1283	2,00	10,00
<b>Zeatina 22,81</b>	32	5,8750	1,33803	,23653	5,3926	6,3574	4,00	10,00
<b>Total</b>	126	5,2857	1,66785	,14858	4,9916	5,5798	2,00	10,00

#### b. SPSS Teste à homogeneidade das variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
2,958	2	123	,056

#### c. SPSS Teste ANOVA

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
<b>Entre Grupos</b>	55,108	2	27,554	11,583	,000
<b>Nos grupos</b>	292,606	123	2,379		
<b>Total</b>	347,714	125			

#### d. SPSS Teste Tukey

μM	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Controlo 0	41	4,3415	
2-iP 24,60	53		5,6604
Zeatina 22,81	32		5,8750
Sig.		1,000	,807

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o Tamanho de Amostra de Média Harmônica = 40,264.

b. Os tamanhos de grupos são desiguais. A média harmônica dos tamanhos de grupos é usada. Os níveis de erro de Tipo I não são garantidos.

## 2 Variável: Comprimento

#### a. SPSS Estatística descritiva

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Controlo 0	41	3,7220	,92669	,14472	3,4295	4,0145	2,10	6,40
2-iP 24,60	53	4,3585	1,15082	,15808	4,0413	4,6757	2,90	8,40
Zeatina 22,81	32	4,8906	,97397	,17218	4,5395	5,2418	3,40	8,00
Total	126	4,2865	1,12302	,10005	4,0885	4,4845	2,10	8,40

#### b. SPSS Teste à homogeneidade das variâncias

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
,712	2	123	,493

**c. SPSS Teste ANOVA.**

	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>df</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Z</b>	<b>Sig.</b>
<b>Entre Grupos</b>	25,021	2	12,510	11,602	,000
<b>Nos grupos</b>	132,626	123	1,078		
<b>Total</b>	157,647	125			

**d. SPSS Teste Tukey.**

	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.05</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Controlo 0</b>	41	3,7220	
<b>2-iP 24,60</b>	53		4,3585
<b>Zeatina 22,81</b>	32		4,8906
<b>Sig.</b>		1,000	,060

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o Tamanho de Amostra de Média Harmônica = 40,264.

b. Os tamanhos de grupos são desiguais. A média harmônica dos tamanhos de grupos é usada. Os níveis de erro de Tipo I não são garantidos.