

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE SOBREIROS
SELECCIONADOS**

DOUTORAMENTO EM ENGENHARIA FLORESTAL

MARIA ISABEL CARRASQUINHO DE FREITAS ROLDÃO

Orientador: Doutor Cândido Pereira Pinto Ricardo

Júri:

Presidente: Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Amélia Botelho de Paulo Martins Campos Loução, professora catedrática da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa;

Doutor João Manuel Dias dos Santos Pereira, professor catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutor Cândido Pereira Pinto Ricardo, professor catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Sara Barros Queiroz Amâncio, professora associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida, professora associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Maria Margarida Moutinho Girão de Oliveira Barroso, professora auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

LISBOA

2000

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia, da Universidade Técnica de Lisboa, para obtenção do grau de Doutor

Aos meus filhos, Luís Pedro e Ana Teresa e aos meus pais

Agradecimentos

Ao finalizar este trabalho não posso deixar de expressar os meus agradecimentos às pessoas que de várias formas contribuíram para a sua realização:

Ao Professor Catedrático Doutor Cândido Pinto Ricardo, meu orientador, pela confiança que depositou em mim aceitando-me no laboratório de Bioquímica Vegetal do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, pelo seu incentivo e constante apoio a nível científico e pessoal, assim como pela sua disponibilidade na revisão do manuscrito.

À Direcção da Estação Florestal Nacional, por me ter proporcionado a possibilidade de elaboração deste trabalho.

Ao Professor Catedrático Doutor Raúl Sardinha pelo seu incentivo à minha candidatura a doutoramento.

À Engenheira Margarida Santos Hall D'Alpuim, coordenadora do Departamento de Ecofisiologia e Melhoramento Florestal da Estação Florestal Nacional, pela confiança que tem depositado em mim ao longo dos anos e pela liberdade que sempre me proporcionou. Agradeço-lhe ainda o seu constante apoio científico e pessoal.

Ao colega José Baeta pela preciosa ajuda no tratamento dos dados e pelas infundáveis sessões de discussão dos resultados.

Ao colega Alexandre Aguiar pelos frequentes diálogos sobre o Melhoramento Genético nas espécies florestais.

Ao Dr. Valente de Almeida pela sua ajuda na utilização do programa GENSTAT para análise estatística dos resultados.

Aos meus colegas de Departamento, Carolina Varela, Joaquim Figueiredo, Teresa David, João Pessoa, Amílcar Ferro, Patrícia, Manuela, Isabel, Teresa, José Pedro, Eduardo e D. Zulmira Miranda, que me acompanharam no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Engenheiro Albino de Carvalho por ter disponibilizado a localização das parcelas e a classificação qualitativa dos sobreiros seleccionados.

Ao Engenheiro Técnico Agrário Rui Nogueira pela sua constante disponibilidade e rigor demonstrados na identificação das parcelas de sobreiro e colheita de garfos nas árvores seleccionadas.

Ao Engenheiro Técnico Agrário João Pessoa pelas sugestões e acompanhamento dos ensaios de enxertia e de estacaria.

Ao Sr. António Siopa pela realização dos trabalhos de enxertia.

Ao Sr. Jorge Bohm pela disponibilização das infra-estruturas dos viveiros da PLANSEL necessárias para a realização dos ensaios de enraizamento.

À Anne Souillart, pelo criterioso acompanhamento dos ensaios de enraizamento e pela excelente ajuda na colheita dos dados.

Ao Doutor Philip Jackson pela sua orientação e acompanhamento no estudo das peroxidases no sobreiro.

À Paula Chicau, minha cunhada, pela sua valiosa ajuda no laboratório e pelo apoio proporcionado em algumas fases da minha vida.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica Vegetal do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Doutora Ana Paula Regalado, Cláudia Dias, Manuela, Susana, Ana Sofia e Sara, pelo bom ambiente de trabalho e pelo espírito de entreajuda.

À Dalila e à Cecília pela composição gráfica, ao António pela ajuda no tratamento de imagem e ao Mário pelas sugestões na apresentação geral do trabalho.

Aos meus sogros Maria Emília e Manuel Roldão pelo apoio familiar prestado e em especial ao meu sogro pela revisão ortográfica.

A todos os meus amigos Manuela e Zé, Ana Paula e Zé Manuel, Ana Margarida e Francisco, Inês, Paula Maria e Zé, Luísa, Ana e António Manuel, Ana Paula e Jaime, Mena e Bill, Cristina e Zé, pela vossa presença.

Aos meus pais, filhos, e a todos os familiares que duma forma ou de outra me mostraram a importância deste trabalho.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E CONVENÇÕES

- ACC** - Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
- ACP** - Análise de Componentes Principais
- ANOVA** - Análise de variância (do inglês Analysis of variance)
- CAP** - Circunferência altura do peito (1,30 m)
- CC** - Percentagem de estacas com *callus*
- CCt** - Percentagem de estacas com *callus* (variável transformada)
- CR** - Percentagem de estacas com raiz
- CRt** - Percentagem de estacas com raiz (variável transformada)
- Da** - Dalton
- Fig.** - Figura
- IAA** - Ácido indol-3-acético (do inglês Indole-3 acetic acid)
- IBA** - Ácido indol-3-butírico (do inglês Indole-3 butiric acid)
- g** - Unidade de campo gravítico ($9,8 \text{ ms}^{-1}$) usada como unidade de força centrífuga
- LSD** - Menor diferença significativa (do inglês Least significance difference)
- MO** - Percentagem de estacas mortas
- Mot** - Percentagem de estacas mortas (variável transformada)
- NEIEF** - Focagem isoeléctrica não equilibrada (do inglês Non-Equilibrated isoelectric focusing)
- n.s.** - Não significativo
- n.t.** - Nível de tratamento
- PAF** - Plano de Acção Florestal
- PAL** - Fenilalanina amónia liase (do inglês Phenylalanine ammonia lyase)
- PCS-PLANSEL** - Parque de Clones de Sobreiro da PLANSEL
- PDF** - Plano de Desenvolvimento Florestal
- PE** - Pegamentos de enxertia de gomo
- PEt** - Pegamentos de enxertia de gomo (variável transformada)
- p.f.** - Peso fresco
- PSA** - Persulfato de amónia
- PVP** - Polivinilpirrolidona
- SR** - Percentagem de estacas sem resposta
- SRt** - Percentagem de estacas sem raiz (variável transformada)
- TEMED** - N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
- Tris** - Tris (hidroximetil) aminometano
- Unid.** - Unidades
- α** - Nível de significância

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Formas de macropropagação vegetativa, sua definição e modalidades existentes.....	8
Tabela 2.1 - Localização e caracterização das árvores seleccionadas.....	23
Tabela 2.2 - Lista dos clones de sobreiro e número de ramos existentes nas três fases do Parque clonal de sobreiro de Montemor-o-Novo.....	25
Tabela 2.3 - Lista dos clones utilizados nos diferentes ensaios de estacaria realizados em 1992 e 1993.....	25
Tabela 2.4 - Plano das acções a desenvolver e calendarização a praticar para o estabelecimento de um programa de multiplicação vegetativa por enxertia de sobreiros adultos seleccionados.....	26
Tabela 2.5 - Ensaios de substratos realizados e condições gerais estabelecidas.....	31
Tabela 2.6 - Ensaios de avaliação dos efeitos da concentração de IBA e dos métodos de aplicação, na capacidade de enraizamento de estacas retiradas de diferentes fontes de material vegetal.....	32
Tabela 2.7 - Condições dos ensaios de enraizamento sobre o efeito da época de colheita das estacas recolhidas no parque de clones.....	33
Tabela 2.8 - Condições gerais de estabelecimento dos ensaios de avaliação dos efeitos da concentração de IBA na capacidade de enraizamento de estacas.....	34
Tabela 2.9 - Listagem de clones estudados ao longo dos ensaios realizados em 1992 e 1993 e respectivo ano de enxertia.....	35
Tabela 3.1 - ANOVA modelo hierárquico para a variável transformada percentagem de pegamentos da enxertia de gomo (PEt) relativamente ao ano e época de enxertia.....	40
Tabela 3.2 - ANOVA a um factor para a variável transformada percentagem de estacas com raiz relativamente aos substratos utilizados nos ensaios estabelecidos em Junho, Agosto e Outubro para diferentes temperaturas de bancada.....	42
Tabela 3.3 - Testes de hipóteses para a igualdade de variâncias e para comparação de médias relativamente ao estudo do efeito do ensombramento na variável transformada percentagem de estacas com raiz (CRt).....	43
Tabela 3.4 - Teste de Wilcoxon aplicado aos resultados de enraizamento (CR) observados no ensaio n°3/89 em que se comparam os dois diferentes métodos de aplicação da auxina em estacas sujeitas a duas temperaturas de substrato pré-estabelecidas, 25°C e 28°C.....	43
Tabela 3.5 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para diferentes aplicações de IBA, em dois meses de colheita de estacas, relativamente a variável percentagem de estacas com raiz (CR).....	44
Tabela 3.6 - Anova a dois factores para a variável transformada da percentagem de estacas com raiz (CRt) relativamente à concentração de IBA aplicada na base da estaca e ao mês de colheita de estacas.....	44
Tabela 3.7 - Valores médios (retransformados) obtidos relativamente às diferentes aplicações de IBA para a variável percentagem de estacas com raiz (CR). Os valores representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	45
Tabela 3.8 - Valores percentuais médios para as variáveis resposta das estacas obtidos nos diferentes ensaios realizados com material juvenil.....	45

Tabela 3.9 - Matriz de correlação entre as variáveis de resposta das estacas obtidas para os diferentes níveis de tratamentos.....	46
Tabela 3.10 - Valores próprios das diferentes componentes e percentagem da variação total explicada.....	47
Tabela 3.11 - Contribuição das variáveis iniciais para a formação dos dois primeiros eixos principais.....	47
Tabela 3.12 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos nos diferentes meses de colheita de estacas, para as percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO).....	49
Tabela 3.13 - ANOVA a um factor para o efeito do mês de colheita das estacas nas variáveis transformadas das percentagens de estacas com raiz (CRt), com <i>callus</i> (CCt) sem resposta (SRt) e mortas (MOt).....	49
Tabela 3.14 - Efeito da época de colheita das estacas nas percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	50
Tabela 3.15 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as diferentes durações do ensaio nas percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO).....	50
Tabela 3.16 - ANOVA a um factor para as variáveis transformadas percentagem de estacas com raiz (CRt), com <i>callus</i> (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (MOt) relativamente à duração do ensaio.....	51
Tabela 3.17 - Efeito da duração do ensaio nas percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	51
Tabela 3.18 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO), relativamente ao efeito da enxertia e do mês de colheita de estacas.....	52
Tabela 3.19 - ANOVA a dois factores para as variáveis transformadas, percentagens de estacas com raiz (CRt), com <i>callus</i> (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (MOt), relativamente ao efeito da enxertia e do mês de colheita de estacas.....	53
Tabela 3.20 - Efeito da enxertia nas percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	53
Tabela 3.21 - Efeito do mês de colheita de estacas nas percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	54
Tabela 3.22 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO), relativamente aos efeitos da concentração de IBA e do mês de colheita das estacas.....	55
Tabela 3.23 - ANOVA a dois factores para as variáveis transformadas, percentagens de estacas com raiz (CRt), com <i>callus</i> (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (MOt), relativamente aos efeitos da concentração de IBA e do mês de colheita de estacas.....	56

Tabela 3.24 - Efeito da concentração de IBA nas percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	57
Tabela 3.25 - Percentagem de estacas com raiz (CR), para cada clone em diferentes níveis de tratamento.....	58
Tabela 3.26 - ANOVA de Medições Repetidas para o efeito do clone na variável transformada, percentagem de estacas com raiz (CRt).....	58
Tabela 3.27 - Capacidade média de enraizamento dos clones pertencentes à fase I do parque de clones. Os valores (retransformados) apresentados com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si para um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	59
Tabela 3.28 - Valores médios das variáveis de resposta das estacas para os diferentes tratamentos analisados.....	59
Tabela 3.29 - Matriz de correlação entre as variáveis de resposta das estacas obtidas para os diferentes níveis de tratamentos.....	60
Tabela 3.30 - Valores próprios das diferentes componentes e percentagem da variação total explicada.....	61
Tabela 3.31 - Contribuição das variáveis iniciais para a formação dos dois primeiros eixos principais.....	62
Tabela 3.32 - Caracterização das quatro classes, obtidas pelo método de classificação hierárquica, relativamente às variáveis CR, CC, SR e MO.....	62
Tabela 3.33 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO) relativamente ao efeito do ano de enxertia dos rametos.....	65
Tabela 3.34 - ANOVA a um factor para as variáveis transformadas, percentagens de estacas com raiz (CRt), com <i>callus</i> (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (MOt), relativamente ao efeito do ano de enxertia dos rametos.....	65
Tabela 3.35 - Efeito do ano de enxertia dos rametos nas percentagem de estacas com raiz (CR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	66
Tabela 3.36 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO) relativamente aos efeitos do clone e do mês de colheita de estacas.....	67
Tabela 3.37 - ANOVA a dois factores para as variáveis transformadas, percentagens de estacas com raiz (CRt) com <i>callus</i> (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (MOt), relativamente aos efeitos do mês de colheita de estacas e do clone.....	68
Tabela 3.38 - Efeito do mês de colheita de estacas nas percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC); sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	69
Tabela 3.39 - Efeito do clone nas percentagens de estacas com raiz (CR); com <i>callus</i> (CC) e sem resposta (SR). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	69

Tabela 3.40 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO) relativamente aos efeitos da intensidade de poda, do mês de colheita de estacas e do clone.....	70
Tabela 3.41 - ANOVA a três factores para as variáveis transformadas, percentagem de estacas com raiz (CRt), com <i>callus</i> (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (MOt) relativamente aos efeitos da intensidade de poda, do mês de colheita de estacas e do clone.....	71
Tabela 3.42 - Efeitos do mês de colheita de estacas e do clone nas percentagens de estacas com <i>callus</i> (CC); sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	72
Tabela 3.43 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO), relativamente aos efeitos da concentração de IBA, do mês de colheita de estacas e do clone.....	74
Tabela 3.44 - ANOVA a dois factores para as variáveis transformadas, percentagens de estacas com raiz (CRt), com <i>callus</i> (CCt), sem resposta (SRt) e de estacas mortas (MOt), relativamente aos efeitos da concentração de IBA, do mês de colheita de estacas e do clone.....	76
Tabela 3.45 - Efeito da aplicação de IBA na base das estacas nas percentagens de estacas com <i>callus</i> (CC) e sem resposta (SR). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	77
Tabela 3.46 - Efeito do mês de colheita de estacas nas percentagens de estacas com raiz (CR); com <i>callus</i> (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	77
Tabela 3.47 - Efeito do clone nas percentagens de estacas com raiz (CR); com <i>callus</i> (CC); sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD _{0,05}).....	78
Tabela 3.48 - Valores percentuais médios para as variáveis resposta das estacas obtidos para os diferentes clones.....	79
Tabela 3.49 - Matriz de correlação entre as variáveis de resposta das estacas obtidas para os diferentes clones.....	80
Tabela 3.50 - Valores próprios das diferentes componentes e percentagem da variação total explicada.....	80
Tabela 3.51 - Contribuição das variáveis iniciais para a formação dos dois primeiros eixos principais.....	80
Tabela 3.52 - Valores médios das variáveis CR, CC, SR e MO para os cinco grupos de clones obtidos pelo método de classificação hierárquica.....	82
Tabela 3.53 - Actividade peroxidásica total de diferentes partes de estacas enraizadas, raízes, segmentos basais, intermédios e superiores.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Carta de distribuição do sobreiro á escala 1: 2 500 000 (fonte D.G.F. - IFN 1995).....	2
Figura 2.1 - Enxertia de gomo em escudo: o abrolhamento do gomo indicia o sucesso da enxertia.....	27
Figura 2.2 - Enxertia de gomo em escudo: pormenor da zona de união do enxerto.....	27
Figura 2.3 - Planta pertencente ao clone 8/6-6, obtida por enxertia de gomo em escudo.....	27
Figura 2.4 - Enraizamento de estacas de sobreiro em contentores colocados em bancada aquecida a 28°C.....	29
Figura 2.5 - Estaca de sobreiro enraizada, após quatro meses em bancada aquecida a 28°C (clone 8/6-6).....	29
Figura 2.6 - Estaca de sobreiro com callus, após quatro meses em bancada aquecida a 28°C (clone 8/6-6).....	29
Figura 3.1 - Percentagens médias de pegamentos (PE) e respectivos desvios padrões obtidos nas enxertias de gomo realizadas nas duas épocas aconselhadas (Junho/Julho e Setembro) ao longo dos quatro anos estudados.....	40
Figura 3.2 - Percentagens médias de enraizamento e respectivos desvios padrões para os diferentes substratos testados, obtidos nos ensaios 2/89, 4/89 e 5/89, estabelecidos em Junho, Agosto e Outubro para diferentes temperaturas do substrato.....	41
Figura 3.3 - Representação gráfica do plano principal dos níveis de tratamentos (mês de colheita de estacas e temperatura de substrato) e das variáveis iniciais (CR - % estacas com raiz; CC - % estacas com <i>callus</i> ; SR - % estacas sem resposta; MO - % estacas mortas); a- Agosto, 25°C; b- Outubro 25°C; c- Agosto, 28°C; d- Outubro, 28°C.....	48
Figura 3.4 - Efeito da interacção dos factores mês de colheita das estacas e idade da planta-mãe nas variáveis transformadas CRt, CCt e MOt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%.....	54
Figura 3.5 - Efeito da interacção da concentração de IBA com o mês de colheita das estacas para as variáveis transformadas CCt e SRt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%.....	57
Figura 3.6 - Representação gráfica do plano principal dos níveis de tratamentos e das variáveis iniciais: CR - % de estacas com raiz; CC - % de estacas com <i>callus</i> ; SR - % de estacas sem resposta e MO - % de estacas mortas. <u>Época de colheita de estacas</u> : 1- Maio; 2- Junho; 3- Julho; 4- Agosto; 5- Setembro; 6- Outubro; <u>Duração do ensaio</u> : Um mês; Dois meses; Três meses; Quatro meses; Cinco meses.....	61
Figura 3.7 - Dendrograma dos 56 níveis de tratamentos analisados pelo método de classificação hierárquica utilizando as distâncias euclidianas e do "vizinho mais próximo".....	63
Figura 3.8 - Efeito da interacção da intensidade de poda com o mês de colheita de estacas na variável transformada CCt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%.....	72
Figura 3.9 - Efeito da interacção da intensidade de poda com o clone nas variáveis transformadas CRt e MOt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%.....	73

Figura 3.10 - Efeito da interacção do mês de colheita de estacas com o clone nas variáveis transformadas CRt, CCt, SRt e MOt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%.....	73
Figura 3.11 - Efeito da interacção da concentração de IBA com o mês de colheita nas variáveis transformadas CCt e SRt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%.....	78
Figura 3.12 - Efeito da interacção do mês de colheita com o clone nas variáveis transformadas CCt e MOt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%.....	79
Figura 3.13 - Representação gráfica do plano principal dos diferentes clones e das variáveis iniciais	81
Figura 3.14 - Dendrograma dos 10 clones analisados pelo método de classificação hierárquica utilizando as distâncias euclidianas e do "vizinho mais próximo".....	82
Figura 3.15 - Zimograma de peroxidases ionicamente ligadas, separadas por NEIEF de amostras de raízes (pista 1), de segmentos basais (pista 2), intermédios (pista 3) e superiores (pista 4) de caules de estacas enraizadas.....	84
Figura 3.16 - Alterações na actividade peroxidásica da fracção ionicamente ligada, durante o período de enraizamento de estacas. Classe I- Estacas com caules entumescidos; Classe II- Estacas com raízes incipientes (comprimento inferior a 2 cm); Classe III- Estacas com raízes desenvolvidas (comprimento superior a 2 cm).....	85
Figura 3.17 - Zimograma de peroxidases ionicamente ligadas, separadas por NEIEF, de extractos de segmentos basais de estacas retiradas de sobreiros jovens em diferentes fases do processo de formação de raízes. Número de dias em substrato de enraizamento: controlo - zero dias (pista 1); um dia (pista 2); cinco dias (pista 3); sete dias (pista 4); vinte dias- classe I (pista 5); vinte dias- classe II (pista 6); vinte dias- classe III (pista7).....	86
Figura 3.18 - Actividade peroxidásica de extractos de segmentos basais de estacas de sobreiro imediatamente após o destacamento da planta-mãe, 12 e 72 horas depois, correspondentes à fracção ionicamente ligada.....	87
Figura 3.19 - Zimograma de peroxidases ionicamente ligadas, separadas por NEIEF, de extractos de segmentos basais de estacas retiradas de sobreiros jovens imediatamente após o corte (pista 1), 12 horas (pista 2) e 72 horas após o destacamento (pista 3).....	87
Figura 3.20 - Percentagem de desnaturação irreversível em extractos de segmentos superiores e basais de caules sujeitos à técnica de desnaturação irreversível pelo calor (70°C).....	88
Figura 3.21 - Zimograma de peroxidases ionicamente ligadas, separadas por NEIEF, de extractos de segmentos basais (pista 1 e 2) e superiores (pista 3 e 4) de estacas retiradas de sobreiros jovens, sujeitos à técnica de desnaturação irreversível pelo calor. Controlo – pistas 1 e 3; amostra exposta a uma temperatura de 70°C durante 26 segundo – pista 4.....	89

RESUMO

O objectivo consistiu em avaliar a possibilidade de propagar vegetativamente sobreiros adultos de forma a desenvolver uma metodologia para um programa de melhoramento genético. Estudou-se a enxertia homoplástica de gomo para rejuvenescimento de sobreiros seleccionados e a estacaria para a sua multiplicação massal.

Na sequência da enxertia reproduziram-se, para parques de clones, 46 sobreiros. Setembro revelou-se como a época mais favorável, comparativamente a Junho/Julho.

A temperatura do substrato e o mês de colheita revelaram-se importantes fontes de variação na estacaria de material juvenil. O enraizamento mais elevado foi obtido em Agosto num substrato a 28°C (57,0%). A duração do enraizamento influenciou a resposta do material enxertado, sendo o período de quatro meses o mais favorável (16,4%). As estacas de plantas rejuvenescidas necessitam de concentração de IBA mais elevada (1%) que as de plantas jovens (0,5%). A diminuição do enraizamento com a idade de enxertia mostrou que a gestão de um parque de clones implica uma produção dinâmica de pés-mães.

Analisaram-se as peroxidases em estacas para identificar isoformas associadas ao enraizamento. Surgiram três isoperoxidasas neutras que parecem relacionadas com a indução radicular ou com a cicatrização. Numa fase posterior aparece uma isoforma básica, também dominante nos segmentos inferiores e intermédios de estacas, assim como em raízes de plantas jovens.

A multiplicação de sobreiros adultos afigura-se viável, recorrendo à criação de parques de clones, obtidos por enxertia, como fonte de material a ser reproduzido massalmente por estacaria.

PALAVRAS-CHAVE: *Quercus suber* L., Propagação vegetativa, Estacaria, Enxertia de Gomo, Clones, Peroxidasas

ABSTRACT

The aim was to study the vegetative propagation techniques in the cork oak breeding program. Bud grafting and cuttings were used to multiply and mass propagate selected cork oak trees.

Forty-six plus trees were reproduced to cork oak clone banks. September was identified as better season for grafting comparing to June/July.

Rooting season and the temperature of the rooting substrate were demonstrated to be important factors in juvenile cuttings response. The highest rate ability was achieved in August with a rooting substrate temperature of 28°C (57,0%). The best rooting rate was obtained by maintaining cuttings in rooting media for four months. The application of IBA influenced rooting ability both in cuttings from seedlings and those from the clonal bank. Nevertheless, juvenile material needed a lower IBA concentration (0,5%) than the old material (1%). The clone and age of grafting was shown to influence the rooting ability. The decrease of rooting ability with age of grafting requires a dynamic management of the clonal bank.

Peroxidase activity and isoperoxidase patterns were studied during root formation. Three ionically- bound neutral isoperoxidases were identified and associated with either root-induction phase or the wounding process. An ionically-bound basic isoperoxidase appeared at more advanced stages of development. This peroxidase was also predominant in extracts of basal segments of cuttings and roots from seedlings.

The vegetative propagation of adult selected cork oak trees seems to be an adequate technique, establishing a prior clonal bank, by means of grating, and then mass propagating by cuttings this material.

KEY WORDS: *Quercus suber* L., Vegetative propagation, Cuttings, Bud grafting, Clones, Peroxidases

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iv
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E CONVENÇÕES.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - O sobreiro na floresta portuguesa.....	1
1.2 - Breve historial sobre o melhoramento genético do sobreiro em Portugal.....	4
1.3 - A propagação vegetativa nas espécies lenhosas.....	7
1.3.1 - A maturação e o rejuvenescimento.....	11
1.3.2 - Factores que afectam o enraizamento de estacas.....	12
1.3.3 - As peroxidases no processo de formação de raízes.....	15
1.4 - A propagação vegetativa no sobreiro.....	18
1.5 - Objectivos.....	21
II - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 - Origem do material vegetal.....	22
2.2 - Metodologias Aplicadas.....	26
2.2.1 - Técnica de enxertia.....	26
2.2.2 - Técnica de estacaria.....	28
2.2.2.1 - Condições gerais dos ensaios.....	28
2.2.2.2 - Recolha e preparação das estacas.....	30
2.2.2.3 - Estudos com material juvenil.....	30
2.2.2.3.1 - Substratos de enraizamento.....	31
2.2.2.3.2 - Ensombramento.....	32
2.2.2.3.3 - Hormona de enraizamento (IBA).....	32
2.2.2.4 - Estudos com material do parque de clones.....	33
2.2.2.4.1 - Mês de colheita das estacas.....	33
2.2.2.4.2 - Duração do enraizamento.....	33
2.2.2.4.3 - Concentração de IBA aplicado.....	34
2.2.2.4.4 - Enxertia.....	34
2.2.2.4.5 - Intensidade de poda.....	35
2.2.2.4.6 - Clone.....	35
2.2.2.5 - Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	36
2.2.3 - Estudo das peroxidases.....	37
2.2.3.1 - Obtenção das peroxidases correspondente às fracções solúvel e ionicamente ligadas.....	37
2.2.3.2 - Remoção de compostos fenólicos dos extractos.....	38

2.2.3.3 - Medição da actividade peroxidásica.....	38
2.2.3.4 - Focagem isoeléctrica e revelação da actividade peroxidásica.....	38
2.2.3.5 - Padrão peroxidásico durante os processos de cicatrização e de formação de raízes em estacas.....	39
III - RESULTADOS.....	40
3.1 - Multiplicação vegetativa por enxertia.....	40
3.2 - Multiplicação vegetativa por estacaria.....	41
3.2.1 - Ensaio com material juvenil.....	41
3.2.1.1 - Substratos de enraizamento.....	41
3.2.1.2 - Ensombramento.....	42
3.2.1.3 - Hormona de enraizamento (IBA).....	43
3.2.1.3.1 - Métodos de aplicação.....	43
3.2.1.3.2 - Concentrações estudadas.....	44
3.2.1.4 - Análise geral do comportamento das estacas.....	45
3.2.2 - Ensaio com material retirado do parque de clones.....	48
3.2.2.1 - Ano de 1992.....	48
3.2.2.1.1 - Mês de colheita das estacas.....	49
3.2.2.1.2 - Duração do enraizamento.....	50
3.2.2.1.3 - Enxertia e mês de colheita de estacas.....	52
3.2.2.1.4 - Concentração de IBA e mês de colheita de estacas.....	55
3.2.2.1.5 - Clone.....	57
3.2.2.1.6 - Análise geral do comportamento das estacas.....	59
3.2.2.2 - Ano de 1993.....	64
3.2.2.2.1 - Ano de enxertia dos rametos.....	65
3.2.2.2.2 - Mês de colheita de estacas e clone.....	66
3.2.2.2.3 - Intensidade de poda, mês de colheita de estacas e clone.....	70
3.2.2.2.4 - Concentração de IBA aplicada, mês de colheita de estacas e clone.....	74
3.2.2.2.5 - Análise geral do comportamento dos clones.....	79
3.3 - Estudo das peroxidases.....	83
3.3.1 - Análise das peroxidases durante o processo de formação de raízes em estacas.....	84
3.3.2 - Análise das peroxidases durante o processo de cicatrização.....	86
3.3.3 - Avaliação da existência de confórmoros.....	88
IV - DISCUSSÃO.....	90
4.1 - Tecido caloso e formação de raízes.....	90
4.2 - Efeitos ambientais durante o enraizamento.....	91
4.3 - Efeito do IBA.....	93
4.4 - Duração do enraizamento.....	95
4.5 - Intervenção na planta-mãe.....	96
4.6 - As peroxidases como marcadores do enraizamento.....	98

V - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	100
Referências bibliográficas.....	102
Anexo I.....	114
Anexo II.....	118
Anexo III.....	121
Anexo IV.....	124
Anexo V.....	130
Anexo VI.....	137
Anexo VII.....	144

I - INTRODUÇÃO

1.1 - O sobreiro na floresta portuguesa

A distribuição mundial do sobreiro está concentrada na zona mediterrânica de influência atlântica, nomeadamente em Portugal, Espanha, Tunísia, Marrocos, Argélia, Itália e França. A seguir ao pinheiro bravo, o sobreiro é a espécie florestal mais importante em Portugal, ocupando actualmente 723 400 ha, o que corresponde a 21,9% da área florestal nacional e a 25,8% da superfície mundial de sobreiro (MENDES, 1997). As maiores e melhores manchas de sobreiro, no país, situam-se nas bacias terciárias do Tejo e do Sado, de Ponte de Sor a Grândola (Fig. 1.1). Grande parte desta zona era ocupada, no passado, por matagais pouco habitados que constituíam terrenos de caça e fonte de matéria prima para carvão. Com a campanha do trigo de 1928-38, muitos destes terrenos foram arroteados e convertidos à cultura cerealífera. No entanto, com o abandono desta campanha o sobreiro retomou o seu lugar, consolidando-se o fomento subericola (RODRIGUES, 1989).

Foi no final do século XIX que, com a revolução industrial, se desenvolveu a indústria vidreira e com ela a fabricação de rolhas de cortiça. Até então, a cortiça apenas era usada no fabrico de bóias, vedantes e extractos tanantes, embora em muito pequena escala. Foi a necessidade de se fabricarem rolhas que levou a uma intensificação da utilização da cortiça (CABRAL, 1989).

O quantitativo total estimado de cortiça produzida, no novénio 88/96, foi de 153 250 toneladas (MENDES, 1997). Este valor corresponde sensivelmente a cerca de 51% da produção mundial, seguindo-se a Espanha com 26% da produção. É de referir que a importância da Península Ibérica nesta matéria se deve não apenas ao quantitativo, mas também à qualidade da cortiça que produz, que é indiscutivelmente a mais apropriada para o fabrico de rolhas, sector que representa o maior peso na economia industrial subericola (BORGES e CUNHA, 1985).

A cortiça constitui, em termos do valor de uso directo da floresta, o terceiro produto mais importante, a seguir aos toros para serração e à rolaria para pasta de papel. Em 1993 o sub-sector corticeiro gerou um Valor Acrescentado Bruto de 16% do total do sector florestal e representou 10,4% do total do emprego do sector. Por outro lado, no ano de 1994, a cortiça natural e as obras de cortiça foram a segunda componente mais importante das nossas exportações florestais, representando 27,3% do valor total exportado (MENDES, 1997).

Desde o novénio 70/78 que o quantitativo de cortiça amadia e secundeira tem vindo a decrescer, não chegando o total a cobrir o consumo da indústria corticeira nacional. Tornou-se necessário, desde então, o recurso à importação de cortiças pertencentes às primeiras classes de qualidade, com o intuito de satisfazer a indústria rolheira (ANÓNIMO, 1986). No ano de 1995 atingiu-se o valor mínimo na produção total de cortiça (135 000 t) e, embora em 1996 se tenha registado um aumento no quantitativo global (165 000 t), o crescimento correspondeu a cortiças de calibres delgados. Esta diminuição na produção pode ser justificada tanto por uma redução efectiva da produção, motivada pela elevada mortalidade observada após o período de seca registado nos anos 80, como pela ausência de registos estatísticos sobre comercialização, durante o período pós revolução de Abril de 74. Nessa época, as alterações nas actividades produtivas do montado contribuíram também para uma certa degradação da sua componente florestal (MENDES, 1997). Na realidade, a exploração intensiva dos montados, através da ocupação do sob-coberto pela cultura cerealífera, atentou não só contra a vitalidade da árvore, prejudicando a qualidade da cortiça produzida, como também contra a própria regeneração natural, conduzindo a uma caducidade precoce dos montados.

É, pois, bem clara a necessidade de aumentar a produtividade do montado de sobreiro, não só em termos de quantidade, como também de qualidade da cortiça. A actualização das técnicas suberícolas, expansão da área da espécie e melhoramento genético são as três vias apontadas por VALDECANTOS (1992) para a concretização destes objectivos. O apoio de diferentes programas de Fomento Florestal, tais como o Plano de Acção Florestal (PAF), os Regulamentos 797/85 e 2080/92 e o Plano Desenvolvimento Florestal (PDF) contribuiu fortemente para o aumento e beneficiação (aproveitamento da regeneração natural) das áreas de montado. Nos últimos dez anos, a implementação destes programas traduziu-se na arborização de mais de 80 000 ha e na beneficiação de mais de 140 000 ha de montados de sobreiro. Os resultados (provisórios) do inventário florestal apontam para um acréscimo efectivo de 57 000 ha na área do sobreiro (LOURO, 1998).

A implementação dos programas de arborização requer a obtenção de semente com adequado potencial genético, como forma de garantir produtos com características superiores. Daí que vários autores tenham chamado a atenção para a necessidade de investir no melhoramento genético do sobreiro, já que a importância económica desta espécie assim o justifica (NATIVIDADE, 1939b; ROLDÃO, 1986; GOMES, 1989; ALPUIM e ROLDÃO, 1993; RIBEIRO, 1994; VARELA e ERIKSSON, 1995 e ALMEIDA *et al.*, 1997).

1.2 - Breve historial sobre o melhoramento genético do sobreiro em Portugal

Um programa de melhoramento genético para uma espécie florestal consiste no desenvolvimento de um conjunto de acções que visam analisar a variabilidade existente, para as características de interesse, avaliar a sua causa e intensidade, juntar a componente genética dessa variabilidade em indivíduos superiores e, finalmente, produzi-los em massa, procurando obter o máximo de ganho, mantendo elevada a base genética (ZOBEL e TALVERT, 1984). Para a definição da estratégia de melhoramento genético para qualquer espécie florestal é essencial o conhecimento sobre a sua estrutura genética, especialmente sobre o modo de transmissão à descendência das diferentes características com interesse económico.

A cortiça, sendo de facto o produto de maior importância económica do sobreiro, desde cedo constituiu um forte incentivo para o estabelecimento de um programa de melhoramento florestal para a espécie. Em 1934, Natividade coloca a questão da importância de melhorar a qualidade da cortiça e alerta para a morosidade na obtenção dos resultados. Na verdade, o lento crescimento, a tardia frutificação, a dificuldade de armazenamento dos frutos, o espaço exigido para o estabelecimento de testes genéticos e o longo período necessário para avaliação da qualidade da cortiça dificultam a implementação de um programa de melhoramento para o sobreiro, cujo objectivo será de criar populações mais adaptadas às condições edafo-climáticas e/ou que produzam mais e melhor cortiça (ROLDÃO, 1986; ALMEIDA *et al.*, 1997).

Os povoamentos de sobreiro portugueses são de origem natural ou de regeneração natural, por semente, de anteriores povoamentos ou resultantes da disseminação de landes em outros terrenos (NATIVIDADE, 1950). O sobreiro é uma espécie monóica e alogâmica, altamente heterozigótica, em que as plantas de origem seminal apresentam uma elevada variabilidade, exteriorizada principalmente a nível do tecido suberoso, mas também em vigor e arborescência das árvores, produtividade, forma e dimensão dos frutos.

Como ponto de partida para a melhoria da cortiça, NATIVIDADE (1934) considerou necessário averiguar as causas da elevada variabilidade de qualidade, determinar quais os caracteres que a desvalorizam e como a afectam comercialmente. Estudos comparativos desenvolvidos em sobreirais, a Norte e a Sul do Tejo, mostraram que o elevado polimorfismo da cortiça se deve essencialmente ao património genético das árvores. A influência das condições do meio manifesta-se apenas a nível da intensidade do crescimento da cortiça, através de um aumento na espessura das camadas anuais. Consoante a intensidade do crescimento é alta ou baixa, assim este

material evidencia ou mascara os defeitos constituintes (NATIVIDADE, 1939a). Daí que o recurso aos desbastes selectivos, efectuados durante muito tempo nos montados do Sul do Tejo, orientados no sentido da eliminação sistemática das árvores produtoras de cortiça de má qualidade, tenha conduzido a um gradual melhoramento genético de qualidade da cortiça. Na época em que estes desbastes foram praticados era perfeitamente justificada a redução da quantidade de cortiça, em favor de uma melhoria na qualidade. Nesse período, o fabrico de rolhas constituía a única aplicação da cortiça e exigia matéria prima de qualidade superior. Contudo, essa prática de desbastes ao reduzir, por vezes, tão fortemente a densidade de vegetação, chegou a constituir um perigo para o equilíbrio biológico do povoamento (NATIVIDADE, 1954).

O crescimento da indústria de aglomerados veio modificar o panorama da indústria suberícola mundial e com ele a perspectiva do melhoramento genético para o sobreiro. O aumento do consumo de cortiças até aí pouco valorizadas, como a cortiça virgem e as de baixa qualidade, reduziu o interesse pela melhoria da qualidade dos montados. Para o seguimento dos trabalhos de melhoramento nesta espécie, havia então que acrescentar um novo objectivo, em função dos interesses do ramo industrial dos aglomerados. Desta forma, pretendia-se não só obter árvores que formassem cortiça com o mínimo de porosidade assim como o mínimo de outros defeitos constituintes, que satisfizessem a indústria rolheira, mas também que produzissem o máximo de matéria prima, no mais curto intervalo de tempo. Na realidade, em face de objectivos tão distintos, a solução seria enveredar pela especialização dos povoamentos.

O desenvolvimento de programas de melhoramento para as diferentes espécies de *Quercus*, iniciados noutros países, levantou, contudo, outras questões mais abrangentes para o sobreiro, nomeadamente relacionadas com a alternância dos hábitos de frutificação, com as características da madeira e a resistência a pragas e doenças. O recurso à selecção de indivíduos superiores, a hibridação, no sentido de reunir os caracteres favoráveis e a sua multiplicação com recurso às técnicas de multiplicação vegetativa constituíram as metodologias para atingir os objectivos estabelecidos (NATIVIDADE, 1954; PALMA, 1976). Neste âmbito, enquadram-se os trabalhos sobre genética dos híbridos *Quercus suber* X *ilex* e *Quercus cerris* X *suber* desenvolvidos por NATIVIDADE (1937) e SANTOS (1944), a pesquisa de correlações fenotípicas e genotípicas por MACHADO (1938), os estudos de multiplicação vegetativa por NATIVIDADE (1948, 1950) e CORREIA (1955, 1959, 1961 e 1981) e de talhadia por CORREIA (1965) realizados na Estação de Experimentação Florestal do Sobreiro, em

Alcobaça. Com a extinção desta Estação, reduziram-se os investimentos para a continuação dos trabalhos de investigação do sobreiro.

Consciente de que o melhoramento genético desta espécie constitui, de facto, um empreendimento de várias gerações, Albino de Carvalho iniciou em 1982, um estudo que visava dois objectivos importantes: inventariar as potencialidades do montado de sobreiro, com vista à definição das grandes zonas de qualidade da cortiça e identificar árvores produtoras de cortiça de qualidade superior, na perspectiva de constituírem o suporte de um programa de melhoramento. Estes indivíduos seriam posteriormente multiplicados, com recurso à propagação vegetativa, de forma a garantir as suas potenciais características qualitativas. Da observação efectuada pelas 140 parcelas, o autor reforça a ideia defendida por NATIVIDADE (1939b), já atrás referida, de que o património genético é o principal responsável pela qualidade. Com efeito, verifica-se que a variação da qualidade da cortiça se manifesta não só entre povoamentos, mas também entre indivíduos de um mesmo habitat e com cortiças de idade e crescimentos anuais equivalentes (CARVALHO, 1989). A eleição de 230 árvores candidatas a "plus" deveu-se fundamentalmente à qualidade superior da cortiça produzida, mas também foram considerados outros parâmetros, designadamente a morfologia e a altura do tronco, o número de pernadas, o aspecto das costas da prancha, a cor do entrecasco e o fio da cortiça. A apreciação da qualidade da cortiça, efectuada segundo o critério de pontuação, ponderado, estabelecido por CARVALHO (1991), procura reduzir a subjectividade da classificação qualitativa. Este critério baseia-se num modelo teórico de cortiça amadia, mas tem sempre em consideração o valor relativo dessa cortiça na parcela de origem da árvore. Esse modelo determina que o ventre da cortiça seja plano e uniforme, as lentículas circulares, pequenas e uniformemente distribuídas e com baixa densidade, sem incrustações e sem inclusões, com canais lenticulares direitos, finos e pouco numerosos, sem espasmos, com camadas de criação pouco definidas, de largura uniforme e mais ou menos lisas, e ainda sem alterações cromáticas, nem anomalias constitutivas, de cor clara e costa de fraco relevo tanto em depressão como em elevação, de fio de cortiça direito, e densidade tão próxima quanto possível da do tecido suberoso puro (0,18-0,22) (Anexo I). A pontuação atribuída a cada amostra de cortiça é dada em função da quantificação e intensidade de algumas imperfeições da estrutura suberosa, que a penalizam em termos de qualidade. Desta forma, quanto maior a pontuação de uma determinada amostra de cortiça, menor é a sua qualidade. Segundo CARVALHO (comunicação pessoal) poder-se-ão considerar como candidatas a árvores "plus", as produtoras de cortiça que apresentem pontuação inferior a 180.

Com base na selecção de árvores produtoras de cortiça superior, efectuada por Albino de Carvalho, ALPUIM e ROLDÃO (1993) apresentaram uma estratégia de melhoramento para o sobreiro que utiliza tanto a via seminal como a vegetativa na avaliação dos parâmetros genéticos. Os autores propõem também a aplicação das técnicas de enxertia, como forma de propagação para o viveiro das árvores adultas seleccionadas, e a estacaria, como o processo de multiplicação em massa desse material. VARELA e ERIKSSON (1995), na apreciação deste programa, salientam a necessidade de investir esforços no desenvolvimento de técnicas de macropropagação vegetativa, como forma de reproduzir e multiplicar as plantas fenotipicamente superiores. Sugerem, no entanto, que a via para o conhecimento do controlo genético da qualidade da cortiça, seria mais fiável se se procedesse ao respectivo estudo a partir de numa amostra de descendentes de progenitores escolhidos numa população de regeneração natural, em lugar de descendentes de árvores fenotipicamente superiores.

Qualquer que seja a opção da estratégia a aplicar para o sobreiro é essencial desenvolver estudos que, a seu tempo, contribuirão para aumentar a eficiência de um programa de melhoramento. Nesta perspectiva se enquadram diversos trabalhos que têm vindo a ser realizados no sobreiro: delimitação de regiões de proveniência (VARELA, 1997); estabelecimento de ensaios de proveniências e de descendências (ALMEIDA *et al.*, 1997; ANÓNIMO, 1997); análise de marcadores genéticos, bioquímicos e moleculares indicadores da estrutura genética (NÓBREGA, 1996; ALMEIDA *et al.*, 1997); biologia floral (VARELA e VALDIVIESSO, 1996), multiplicação vegetativa por estacaria (ROLDÃO, 1990, 1992; RIBEIRO, 1994; ROLDÃO e SOUILLART, 1994; MATA *et al.*, 1996; ROLDÃO *et al.*, 1996); culturas *in vitro* (ROMANO e LOUÇÃO, 1992; ROMANO, 1994; NORONHA *et al.*, 1996; PEIXE *et al.*, 1996; ROMANO *et al.*, 1996).

1.3 - A propagação vegetativa nas espécies lenhosas

A multiplicação vegetativa baseia-se na capacidade apresentada pelas plantas de reconstituírem indivíduos geneticamente idênticos a partir de um órgão, de um tecido ou de uma célula. Isto é possível pelo facto de cada célula conter em si a informação genética necessária para reproduzir a planta no seu todo. Uma população de plantas de idêntico genótipo geradas a partir de um único indivíduo (orteto) constitui o clone e cada descendente vegetativo denomina-se rameto (HARTMANN *et al.*, 1997).

Os vários métodos de propagação vegetativa conhecidos são normalmente agrupados em macropropagação e micropropagação. A primeira inclui as técnicas clássicas de estacaria, enxertia, mergulhia, rebentação de toija e de raiz, que utilizam

partes de plantas (folhas, ramos ou raízes) na regeneração de plantas inteiras (Tabela 1.1). A micropropagação compreende os sistemas de regeneração *in vitro*, por multiplicação de gomos ou rebentos axilares, por organogénese e por embriogénese somática. Nestes dois últimos há a formação *de novo* de meristemas, que conduzirão ao desenvolvimento de órgãos (caules ou raízes) ou de embriões.

Tabela 1.1- Formas de macropropagação vegetativa, sua definição e modalidades existentes

Formas de propagação vegetativa	Definição	Modalidades
Mergulhia	Consiste em provocar a formação de raízes adventícias em ramos ainda ligados à planta-mãe para posteriormente serem destacados.	- Simples - Múltipla - Em serpentina
Estacaria	Consiste em provocar o enraizamento de partes destacadas (raízes, ramos ou folhas) da planta-mãe.	- Estacaria de ramos (herbáceos ou lenhosos) - Estacaria de folhas - Estacaria de raízes
Enxertia	Consiste em unir uma parte de planta (garfo) noutra que constitui o seu suporte (porta-enxertos ou cavalo) e que fornece os alimentos necessários ao seu crescimento.	- Enxertia de ramos não destacados: de encosto em placa de encosto em arco - Enxertia de ramos destacados: de fenda de incrustação de coroa à inglesa de encosto - Enxertia de gomo: em escudo em flauta
Rebentação basal		- Toiça - de raízes

A selecção do método de multiplicação a aplicar em cada espécie depende dos objectivos pretendidos e das dificuldades encontradas na reprodução vegetativa. O desenvolvimento de um programa de propagação vegetativa de uma espécie deve considerar a hipótese de utilizar conjuntamente os diferentes sistemas de multiplicação, podendo deste modo beneficiar das vantagens inerentes a cada método.

A propagação vegetativa tem vindo a assumir um papel cada vez mais importante no campo florestal, concretizado pela aplicação de material clonal na plantação de várias espécies. Das várias metodologias de propagação vegetativa, a estacaria tem sido a técnica mais utilizada para a produção de plantas destinadas à florestação (ZOBEL e TALVERT, 1984). Nos Estados Unidos têm vindo a ser

desenvolvidos programas operacionais para *Pseudotsuga menziesii*, *Chamaecypares nootkatensis*, *Picea glauca* e *Picea marina* (EDSON *et al.*, 1996). No Brasil, a década de 1990 é caracterizada por uma forte concentração de esforços no sentido de desenvolver técnicas de propagação clonal para os eucaliptos (FERREIRA e SANTOS, 1997). Apoiando-se em programas de melhoramento, estas técnicas são hoje utilizadas em escala operacional por algumas empresas florestais no Brasil e na África do Sul (DENISON e KIETZKA, 1993; FERREIRA e SANTOS, 1997). A reduzida produção de sementes em várias espécies tropicais e subtropicais de *Pinus*, levou ao desenvolvimento de uma metodologia de multiplicação vegetativa, utilizada comercialmente por algumas empresas florestais chilenas (BALOCCHI, 1996).

O interesse do desenvolvimento da propagação vegetativa deve-se aos benefícios que lhes estão associados não só em termos de programas operacionais de florestação, mas também como ferramenta na investigação. Tem sido largamente utilizada no melhoramento, tanto na conservação de genótipos em parques de clones, como no estabelecimento de pomares produtores de sementes, reunindo num mesmo local indivíduos que na natureza nunca se cruzariam. Esta forma de multiplicação possibilita, por outro lado, a análise genética do material vegetal, a avaliação da interacção genótipo-ambiente e o estudo de possíveis correlações genéticas. Em espécies cujo material vegetativo apresente elevada capacidade de enraizamento, esta via de propagação é sugerida como alternativa para a reprodução rápida de indivíduos geneticamente superiores, na medida em que permite a redução temporal entre a selecção e a produção comercial. A sua aplicação é especialmente aconselhada em programas de melhoramento de características em que se espera baixa heritabilidade no sentido restrito. É através da multiplicação vegetativa que se torna possível captar e explorar a componente não aditiva da variância genética (ZOBEL e TALVERT, 1984). Num teste clonal a redução das componentes da variância ambiental e da interacção genótipo-ambiente é conseguida devido à utilização de cópias do mesmo clone. Esta redução é tanto maior quanto mais elevado for o número de cópias de um clone representado em cada local e entre locais. (TIMMIS *et al.*, 1987). Daí que a selecção dos indivíduos, realizada com base nestes testes, permita a obtenção de ganhos genéticos mais elevados.

A propagação vegetativa tem, contudo fortes limitações, em consequência de dificuldades de multiplicação das árvores adultas, de uma redução da base genética e dos custos de produção deste tipo de material. A idade da planta-mãe constitui, de facto, o aspecto problemático mais preponderante para a implementação de programas operacionais de florestação com material vegetativo. A sua interferência verifica-se não

só a nível da capacidade de enraizamento, como também do posterior crescimento dos propágulos, condicionando a utilização subsequente de clones certificados. Desta forma, há que desenvolver metodologias para manter a juvenilidade durante o tempo necessário para retirar a informação dos testes clonais. A poda severa da planta-mãe, as enxertias consecutivas em porta-enxertos juvenis, o recurso a culturas *in vitro* sequenciais, a aplicação de reguladores de crescimento (nomeadamente GA₃ nas angiospérmicas e BAP nas coníferas), têm sido algumas das técnicas utilizadas neste sentido (HACKETT, 1985; ESHED *et al.*, 1996). A colheita de material da zona inferior da copa ou o uso de rebentação de toíça nas espécies que possuam esta capacidade constituem também uma forma de reproduzir material adulto seleccionado. A aplicação conjunta destas técnicas tem-se mostrado bastante eficiente na propagação de árvores adultas. FRANCLLET, *et al.* (1987) referem que, para a *Sequoia sempervirens*, a micropropagação de material retirado da rebentação de toíça, para posterior enxertia com vista à produção de plantas-mães, permitiu a comercialização de mais de 200 clones.

A ideia de realizar plantações clonais em grandes áreas florestais causa alguma preocupação, devida ao afinilamento da base genética. Na realidade, um número reduzido de clones pode ter consequências imprevisíveis em termos de vulnerabilidade a pragas, doenças ou quaisquer modificações ambientais. São exemplos destas situações, os ataques, no choupo, do fungo *Marsonina brunea* em Itália e da ferrugem *Melampsora spp.*, na Austrália (STELZER e GOLDFARB, 1997). Nesta base, têm sido propostos vários modelos de plantação de clones, com vista a minimizar esse risco e simultaneamente manter elevado o ganho genético que este tipo de material pode facultar. O número de clones a usar na plantação, a proporção entre eles e o seu arranjo espacial no terreno são alguns dos parâmetros incluídos nesses modelos. Da parte de alguns autores houve uma tentativa de definir um número mínimo de clones. LIBBY (1981, citado em ZOBEL e TALVERT, 1984) recomendou como regra geral, a utilização de 7 a 30 clones, enquanto que MUHS (1982, citado em ZOBEL, 1992), relativamente a algumas espécies europeias, referiu a necessidade de utilizar algumas centenas. Este valor está, de facto, condicionado à espécie em causa, à sua variabilidade, à intensificação da exploração florestal e, finalmente, à vulnerabilidade dos clones em questão (ZOBEL e TALVERT, 1984).

Os custos de produção de plantas pela via vegetativa são normalmente mais elevados que os das plantas de origem seminal, devido aos custos inerentes ao processo de enraizamento e desenvolvimento das próprias plantas. A comparação destes valores deve ser realizada tendo em conta os ganhos finais. Na realidade, a

propagação vegetativa só se justifica quando acompanhada de um programa de melhoramento (STELZER e GOLDFARB, 1997). Em Portugal, para o eucalipto, os ganhos obtidos em volume, densidade e rendimento em pasta justificam o investimento no seu melhoramento genético mesmo encarecendo, para cerca do triplo, os custos na produção de plantas melhoradas. As empresas privadas, que exploram esta espécie, gerem, neste momento, um património de cerca de 150 000 ha, plantando anualmente 15 000 ha, dos quais metade provêm de estacaria (BORRALHO, comunicação pessoal).

1.3.1 - A maturação e o rejuvenescimento

As plantas jovens caracterizam-se normalmente por uma elevada capacidade de produzir raízes adventícias, grande crescimento vegetativo, bem como ausência de estruturas reprodutivas. O aparecimento destas estruturas, em condições naturais e não induzidas, marca o início da fase adulta. Observa-se, então, uma redução na capacidade de enraizamento, bem como a diminuição na taxa do crescimento vegetativo, atingindo-se a maturação. Nas espécies lenhosas, o mesmo indivíduo pode apresentar simultaneamente as diferentes fases de desenvolvimento, uma vez que o processo de maturação ocorre em diferentes velocidades consoante o órgão. Por exemplo, os meristemas dormentes ao entrarem mais tarde em maturação que os meristemas activos acabam por conferir às partes basal e interior da copa, um maior grau de juvenilidade quando comparados com a parte superior e periférica. Desta forma, as estacas retiradas de lançamentos próximos da base possuem maior capacidade de enraizamento relativamente às retiradas da parte superior da copa (HACKETT, 1985). Por outro lado, as plantas provenientes de estacas retiradas de árvores adultas apresentam vigor e forma de crescimento inferiores às de origem seminal ou de estacas provenientes de plantas jovens. Estas observações confirmam que as características juvenis se mantêm preservadas na base das plantas, em meristemas ontogenicamente jovens, enquanto a maturação ocorre na parte periférica, em tecidos cronologicamente mais jovens, embora mais velhos do ponto de vista ontogénico (HACKETT, 1985; POETHIG, 1990; LAWSON e POETHIG, 1995 e HARTMANN *et al.*, 1997). Se teoricamente, através da propagação vegetativa, seria possível perpetuar os indivíduos com características favoráveis, mesmo de constituição heterozigótica, na prática cada meristema formado numa determinada fase específica do desenvolvimento retém e vai reproduzir esse estado fisiológico. Desta forma, os propágulos vegetativos removidos de diferentes partes da mesma planta, originam rametos que podem apresentar uma variação na sua expressão fenotípica. Esta variação é normalmente denominada variabilidade intraclonal.

Numa tentativa de compreender o processo de maturação, GREENWOOD e HUTCHISON (1993), realizaram trabalhos em *Pinus taeda*, que parecem indicar a importância da componente genética na mudança da fase jovem para adulta. Em ensaios de descendência de polinização livre e controlada, SCHMIDTLING (1981) estudou a variação genética da capacidade reprodutiva e obteve valores elevados para a heritabilidade em sentido restrito. O autor sugere que, perante a elevada variabilidade observada, algumas características estejam sob a acção de vários genes de efeitos predominantemente aditivos. Ensaios de enxertia de material adulto, utilizando porta-enxertos jovens e estudos de precocidade na floração, mostraram que estas características podem ser classificadas como quantitativas. Embora nestes casos se tenha verificado um aumento do vigor vegetativo, o nível de maturação da planta resultante mantinha-se semelhante ao da planta dadora (POETHIG, 1990). Estudos genéticos com mutantes de *Arabidopsis* mostram que a regulação do processo de maturação é complexa e pode ser modelada por vários sistemas génicos paralelos, que interactivam entre si apenas com alguns genes reguladores comuns (LAWSON e POETHIG, 1995). Os modelos de regulação génica são, no entanto, mais especulativos que preditivos.

1.3.2 - Factores que afectam o enraizamento de estacas

A formação de raízes adventícias numa estaca está dependente da capacidade de determinadas células se desdiferenciarem e formarem uma nova zona meristemática. O desenvolvimento de um novo sistema radicular ocorre, normalmente, na proximidade do tecido vascular, em células parenquimatosas do floema, atravessando as raízes as descontinuidades do anel de esclerênquima, ou anel de fibras perivasculares (ESAU, 1973). É frequente desenvolver-se, na parte basal da estaca, uma massa irregular de células parenquimatosas, em vários estádios de lenhificação, que se designa por *callus* ou tecido caloso. Nalgumas espécies, as raízes podem emergir deste tecido, o qual não é, no entanto, necessário para a sua formação (HARTMANN *et al.*, 1997). Estes autores consideram que o aparecimento simultâneo de raízes e de *callus* indica a dependência de ambas as formações de condições internas e ambientais semelhantes.

A capacidade de formação de raízes adventícias varia com a espécie e está condicionada a vários factores relacionados com a planta-mãe, a manipulação e tratamento das estacas após o corte e com as condições ambientais durante o enraizamento. A intervenção sob a planta-mãe, de forma a providenciar material vegetativo de elevada capacidade de enraizamento, implica o estabelecimento de

condições para manter o nível de juvenilidade e, simultaneamente, de um estado fisiológico favorável. A qualidade das estacas é, de facto, um aspecto fundamental para o posterior desenvolvimento da planta. A sua colheita deve, pois, ser realizada em plantas saudáveis e o tempo que envolve a colocação no substrato de enraizamento e a formação dos primórdios radiculares deve ser o mais reduzido possível. Durante o enraizamento, é necessário providenciar, por um lado, uma atmosfera que minimize as perdas por transpiração, por outro, uma temperatura e luminosidade que favoreçam a actividade metabólica, de forma a proporcionar a manutenção das estacas e a formação dos primórdios radiculares.

O comportamento das diferentes espécies face ao enraizamento varia com a época do ano de colheita das estacas. O efeito deste factor pode estar relacionado não só com as condições ambientais a que as plantas dadoras se encontrem sujeitas, como também com variações endógenas. Assim, níveis de radiação luminosa, fotoperíodo, temperatura do ar, potencial genético, pré-condicionamento ambiental, balanços hormonais, reservas em hidratos de carbono, são alguns aspectos que podem interferir no enraizamento das estacas. Para as espécies *Salix planifolia* e *Populus balsamifera*, os primeiros meses de Primavera (Maio e Junho), antes ou imediatamente após a quebra de dormência foram as épocas que induziram maiores percentagens de enraizamento (HOULE e BABEUX, 1993). Segundo ROBERTS e FUCHIGAMI (1973), estacas de resinosas enraizam melhor quando colhidas nos fins do Outono ou no Inverno. Nas folhosas não caducifolias, nas quais o sobreiro se inclui, HARTMANN *et al.* (1997) dão como indicação que os maiores sucessos poderão ser obtidos colhendo estacas de lançamentos do ano, após se ter completado o seu crescimento. Para estes autores, nesta fase verifica-se uma acumulação de hidratos de carbono que pode favorecer o desenvolvimento dos primórdios radiculares. Por outro lado, as perdas de água por transpiração das folhas resultantes do crescimento são também, nesta fase de desenvolvimento mais reduzidas, o que contribui para manter mais estável o nível hídrico da estaca, até que se dê a reposição de um novo sistema radicular (RAUTER, 1982, citado em STANKOVA e PANETSOS, 1997).

ZACZEK *et al.* (1997) referem alguns autores que indicam que uma redução na luminosidade nas plantas-mães, antes da colheita de estacas, pode aumentar a formação de raízes. O estiolamento, ou seja a estimulação de novos lançamentos em condições de baixa luminosidade e o escurecimento da zona do rebento correspondente à futura base da estaca, durante algum tempo antes do seu corte, são exemplos de tratamentos aplicados às plantas-mães que podem influenciar o enraizamento e provocar modificação a nível anatómico (MAYNARD e BASSUK, 1996).

No *Quercus suber* L., o escurecimento de plantas-mães jovens não influenciou a quantidade e qualidade do sistema radicular, verificando-se, no entanto, alterações a nível da continuidade do anel de fibras perivasculares (RIBEIRO, 1994). Em algumas espécies de difícil enraizamento, a continuidade deste anel foi apontada como uma das causas de insucesso. No entanto, HARTMANN *et al.* (1997) referem que, mesmo nestas espécies, as condições ambientais durante o enraizamento e a aplicação de IBA na base das estacas levam a uma expansão dos tecidos do córtex que acabam por provocar uma ruptura na estrutura contínua do anel, sem, contudo, se formarem os primórdios radiculares. Para estes autores, o enraizamento parece estar mais relacionado com o potencial genético e com as condições fisiológicas das plantas para formar os primórdios, do que com possíveis barreiras mecânicas.

Vários autores consideram que o efeito do clone tem, de facto, um papel importante para a estacaria. Na realidade, em estacas de *Cupressus sempervirens* com quatro anos de idade, o genótipo constituiu a maior fonte de variação na formação de raízes, sobrepondo-se aos tratamentos auxínicos e à duração do período de enraizamento (STANKOVA e PANETSOS, 1997). Também em *Populus balsamifera* e em *Salix planifolia* o potencial de enraizamento mostrou-se bastante variável entre os vários clones (HOULE e BABEUX, 1993). Num estudo de estacaria de *Eucalyptus globulus*, que incluiu um elevado número de clones e de famílias provenientes de polinização controlada, LEMOS *et al.* (1997) mostraram que a capacidade de enraizamento está sobre um forte controlo genético. Para esta característica, os autores obtiveram um elevado valor para a heritabilidade no sentido restrito, indicando a possibilidade de multiplicar, em larga escala, clones resultantes de progenitores com boa capacidade de enraizamento. No entanto, o efeito do clone inclui não só a componente genotípica, mas também uma componente ambiental transmitida pela planta dadora. Esta componente ambiental, específica de cada clone, constitui o que vários autores denominam efeito clonal ou efeito C (WILCOX e FARMER, 1968; FOSTER *et al.*, 1984; FARMER *et al.*, 1992). Este efeito consiste na combinação de duas acções, uma devida à estaca individual e que inclui a sua dimensão e a posição inicial na planta-mãe e uma outra correspondente ao orteto, que abrange não só a idade, como também o pré-condicionamento ambiental. A idade fisiológica ou o estado de maturação da planta dadora representa o factor que mais contribui para, juntamente com o genético, afectar a variabilidade clonal (BURDON *et al.*, 1992).

A influência que a aplicação de IBA exerce no enraizamento de estacas tem sido alvo de numerosas referências bibliográficas. O tratamento das estacas com auxinas está, normalmente associado a quatro vantagens, amplamente reconhecidas (BLAZICH,

1988): acréscimo na percentagem de enraizamento; maior rapidez na iniciação dos primórdios radiculares; aumento do número de raízes por estaca e qualidade das mesmas; uniformização do enraizamento. A resposta positiva deste tratamento não é, porém, universal, encontrando-se dependente de variados factores relacionados, não só, com a própria aplicação da hormona (concentração, forma e duração da aplicação, intervalo entre a colheita das estacas e aplicação da hormona, etc.), como também com o enraizamento em geral (a espécie, a época do ano de colheita de estacas, o emsombreamento durante o enraizamento, etc.) (DAVIES, 1984; POUPARD *et al.*, 1994; AL-SAQRI e ALDERSON, 1996; STANKOVA e PANETSOS, 1997; ZACZEK *et al.*, 1997). Dos vários factores que influenciam o enraizamento e interactuam com o tratamento auxínico, destacam-se os efeitos do ferimento efectuado na base das estacas e da temperatura do substrato durante o enraizamento. A realização de um ferimento na base da estaca mostra-se como uma técnica vantajosa para o enraizamento, pois parece estimular a divisão celular e a indução de primórdios radiculares. A interacção positiva deste tratamento com a aplicação de IBA parece ser devida a uma maior exposição das células e dos tecidos à hormona (BLAZICH, 1988; HARTMANN *et al.*, 1997). Já no que respeita à temperatura do substrato, HARTMANN *et al.* (1997) e LOACH (1988) defendem que a existência de um diferencial positivo entre a temperatura da base da estaca e a da parte aérea pode ser favorável à iniciação dos primórdios radiculares, por promover a translocação dos assimilados para essa região, em detrimento da zona dos gomos foliares.

1.3.3 - As peroxidases no processo de formação de raízes

O conhecimento das modificações bioquímicas que ocorrem na zona de formação das raízes e nos primórdios radiculares contribui para esclarecer o processo de formação das raízes adventícias. A existência de semelhanças nas alterações anatómicas observadas durante o enraizamento de diferentes espécies sugere que as transformações metabólicas que lhes estão associadas sejam também análogas (GASPAR e COUMANS, 1987).

Vários estudos de enraizamento em culturas *in vitro* mostraram que a formação de raízes adventícias ocorre em duas fases: indução (período que antecede a divisão celular) e iniciação dos primórdios radiculares. Esta última fase apresenta cinco estádios interdependentes: A) primeiras divisões transversais das células; B) primeiras divisões longitudinais; C1) divisões contínuas sem aumento do volume celular; C2) expansão celular; D) emergência radicular (IMASEKI, 1985; GASPAR e HOLINGER, 1988; MONCOUSIN, 1991; GASPAR *et al.*, 1992). A transição entre as duas fases de

desenvolvimento envolve alterações metabólicas ao nível das peroxidases, do etileno, do IAA endógeno e de compostos fenólicos (MONCOUSIN, 1988).

O início do processo rizogénico pode ser desencadeado pelo efeito da ferida de corte da estaca e poderá ser amplificado pela aplicação da auxina exógena (MONCOUSIN, 1991). Aparentemente, a superfície da ferida ou as células adjacentes emitem um sinal que se transmite através de várias camadas de células, induzindo as quiescentes a tornarem-se activas (IMASEKI, 1985). A formação de raízes adventícias parece resultar de um conjunto de reacções complexas, nas quais o IAA e o etileno apresentam um papel importante como reguladores endógenos. Imediatamente após a ferida verifica-se uma produção de etileno, identificada como sendo o primeiro acontecimento bioquímico no processo de rizogénese (MONCOUSIN *et al.*, 1989; HAUSMAN, 1993 *in* RIPETTI *et al.*, 1994). A produção de etileno parece ser provocada pela activação da ACC-síntase (EC. 4.4.1.14), via IAA endógeno, ou pela acção das peroxidases ligadas às membranas celulares. Concentrações baixas de etileno induzem, por sua vez, a actividade da PAL (EC. 4.3.1.5), conduzindo à acumulação de ácido clorogénico e, conseqüentemente, a um enriquecimento em compostos fenólicos (MONCOUSIN, 1991). Por outro lado, MATO e VIEITEZ (1986) constataram que o IBA exógeno promove o transporte basípeto de compostos fenólicos, contribuindo também para o aumento da concentração destes compostos na base das estacas.

No decurso da formação de raízes constata-se que a actividade peroxidásica e o respectivo padrão vão apresentando alterações progressivas e sistemáticas. Assim, algumas horas após o corte da estaca, a actividade peroxidásica atinge um valor mínimo. Esta diminuição parece estar relacionada com o efeito inibidor que os compostos fenólicos desempenham nas peroxidases, contribuindo assim para evitar a oxidação das auxinas. Desta forma, a este mínimo de actividade peroxidásica corresponde um máximo na concentração de IAA livre, o que em termos de fases ontogénicas da formação de raízes adventícias equivale ao fim da fase de indução e ao início da fase de iniciação dos primórdios. Posteriormente, enquanto o nível de IAA livre baixa gradualmente, a actividade peroxidásica eleva-se até um valor máximo (GASPAR *et al.*, 1992). Segundo MATO *et al.* (1988) e BHATTACHARYA, (1988), o máximo de actividade peroxidásica está associada a uma elevada actividade da IAA-oxidase. A emergência das raízes ocorre após a actividade peroxidásica total da estaca ter atingido o máximo. A análise do padrão das isoperoxidasas mostrou, nos diferentes estudos, que a actividade e o número das isoperoxidasas ácidas aumentam continuamente durante o processo de enraizamento, enquanto que as isoperoxidasas básicas acompanham a actividade peroxidásica total (GASPAR *et al.*, 1992).

GASPAR *et al.*(1991) apresentaram um modelo explicativo da acção das peroxidases, após o ferimento e durante a formação das raízes adventícias. Segundo estes autores, o efeito da ferida consiste numa redistribuição dos potenciais electroquímicos da membrana, que leva à produção de radicais livres, responsáveis pela peroxidação dos lípidos e, portanto, pela degradação das lipoproteínas da membrana. Estas alterações conduzem a uma modificação das ligações das peroxidases básicas às membranas, da sua conformação e, conseqüentemente, à sua activação. Por outro lado, podem também ocorrer alterações do estado iónico e dos fluxos do plasmalema, dando origem à passagem de solutos, nomeadamente de dadores de electrões para as peroxidases (fenóis, ácido ascórbico, IAA). As peroxidases básicas deverão oxidar os dadores de electrões, entre eles o IAA e o ACC. As alterações do metabolismo da auxina e do etileno conduzem à síntese de peroxidases ácidas e à modificação da parede. As peroxidases ácidas e básicas agirão então como agentes desintoxicantes dos peróxidos, formados numa série de reacções.

A variação típica das peroxidases, observada ao longo das fases de indução e de iniciação de raízes adventícias, levou vários autores a proporem o seu uso como um marcador bioquímico com múltiplas vertentes. São exemplo, a escolha de indutores de enraizamento, a selecção do material a multiplicar pela via vegetativa, bem como um critério de escolha do meio de cultura na fase de indução e alongamento radicular, em cultura de tecidos. De um modo geral, os tratamentos químicos ou físicos que, aplicados durante a fase da indução, aumentem e antecipem o pico de actividade peroxidásica ou, durante a fase de iniciação, acentuem o decréscimo de actividade, conduzem às percentagens de enraizamento mais elevadas (MONCOUSIN e GASPAR, 1983; GASPAR *et al.*, 1992).

RIPETTI *et al.* (1994), GONÇALVES *et al.* (1998) constataram a necessidade de aplicação de auxina exógena, durante a fase indutiva, como forma de promover a formação de raízes adventícias em culturas *in vitro* de nogueira e castanheiro. A aplicação de IBA provoca mudanças na actividade peroxidásica, através da modelação da actividade da IAA-oxidase, por indução de inibidores enzimáticos (MATO e VIEITEZ, 1986). Por outro lado, MATO *et al.* (1988) referem que o IBA constitui uma auxina a ser utilizada durante a fase de iniciação, quando a relação peroxidase/IAA-oxidase baixa, porque não sendo oxidado *in vivo* pelas peroxidases é, nesta fase, metabolizado a IAA.

PACHECO *et al.* (1994), num estudo comparativo realizado em eucalipto, demonstraram que existe uma relação clara entre a actividade peroxidásica, o conteúdo em compostos fenólicos e o enraizamento das microestacas. Os resultados mostraram que, para esta espécie, a aplicação de flavonóides durante a fase de

iniciação favoreceu a formação de raízes. O máximo da actividade peroxidásica foi acompanhado de uma redução abrupta no conteúdo de rutina, o que indica que este composto, na presença da auxina, actua como substrato preferido. No entanto, já a aplicação desta substância na fase de indução apresentou uma acção inibidora do enraizamento. Estes resultados estão de acordo com os estudos referidos por GASPAR *et al.* (1992) que indicam que as substâncias que modificam as propriedades rizogénicas das auxinas têm efeitos contrários, consoante as fases em que são aplicadas. Deste modo, a decisão relativamente à composição dos diferentes meios de cultura a utilizar passa pela identificação da fase do processo de rizogénese, a partir da medição da actividade peroxidásica total.

No sentido de seleccionar o tipo de material vegetal que venha a apresentar maior capacidade de enraizamento, MONCOUSIN (1988) sugere que parece ser de preferir o material que apresente a actividade peroxidásica mais elevada, o menor conteúdo em compostos difenólicos e menor produção de etileno. Assim, para cada espécie deve, pois, ser realizado um estudo pormenorizado de relacionamento entre estes factores e o momento de corte das estacas, com vista à determinação da ocasião mais oportuna para a sua reprodução vegetativa.

1.4 - A propagação vegetativa no sobreiro

As plantas do género *Quercus* apresentam, de um modo geral, dificuldades em serem multiplicadas pela via vegetativa (ESHED *et al.*, 1996; HARTMANN *et al.*, 1997; ZACZEK e STEINER, 1997). Têm sido várias as técnicas de propagação experimentadas para o sobreiro, com o objectivo de desenvolver uma metodologia que torne praticável a multiplicação em massa de indivíduos de qualidade superior. NATIVIDADE (1950), após um estudo exaustivo dos diferentes métodos de multiplicação vegetativa para esta espécie, considerou que a propagação por rebentos de toíça estiolados no troço basilar por amontoa constituía o método mais eficaz para multiplicar extensivamente esta espécie. Segundo este autor, o atarraque, na Primavera, de ramos de um ano, entre 10-15 centímetros da base, era a condição indispensável para o seu enraizamento. Esta prática elevou as percentagens de enraizamento de 5% para 60-80%. Na primavera seguinte, as plantas assim obtidas eram transplantadas para o viveiro e, a fim de melhor desenvolverem o sistema radicular, aí permaneciam durante dois a três anos antes de serem transferidas para o local definitivo. As plantas destinadas a pés-mães manter-se-iam em viveiro e seriam novamente atarracadas, de modo a produzirem material vegetativo em quantidade. A concretização desta metodologia duraria de três a cinco anos, sendo necessário o corte da árvore

seleccionada o que, como NATIVIDADE (1948) referiu, constituiria o grande inconveniente deste método.

A enxertia no sobreiro é referida como uma técnica de fácil aplicação, mas apontam-se-lhe alguns inconvenientes. NATIVIDADE (1950), em face dos resultados obtidos nas fruteiras, referiu-a como uma solução incompleta e de recurso apenas transitório, dado que o efeito normalmente observado de precocidade na floração e frutificação das plantas enxertadas acabaria por resultar num encurtamento na longevidade. Por outro lado, relativamente à enxertia de fenda é frequente manifestar-se, alguns anos mais tarde, a rejeição cavalo/garfo, observando-se, por vezes, uma certa fragilidade na área correspondente à união do enxerto e a consequente quebra por acção de qualquer agente exterior. De forma a ultrapassar estes inconvenientes, CORREIA (1981) desenvolveu a técnica de enxertia homoplástica de gomo destacado e de formação pronta e dormente, executada em plantas jovens (um ano) de origem seminal. Por outro lado, MARQUES e REIS (1987) experimentaram com sucesso a enxertia de coroa homo e heteroplástica em azinheira, utilizando porta-enxertos de quatro/cinco anos e garfos do próprio ano.

Com vista à experimentação e à análise criteriosa do comportamento de plantas enxertadas pela técnica homoplástica de gomo, CORREIA (1981) estabeleceu um pequeno povoamento monoclonal de sobreiro, próximo do viveiro do Vimeiro, em Alcobaça. A idade dos rametos está compreendida entre 24-25 anos, não se tendo observado até à data floração. Isto sugere que o padrão de desenvolvimento dessas plantas seja semelhante ao das de origem seminal. Assim, a enxertia de gomo parece ser uma técnica interessante com vista ao rejuvenescimento de árvores adultas para a sua posterior multiplicação por estaca. É, no entanto uma técnica dispendiosa e de difícil execução. (ROLDÃO *et al.*, 1992; VALDECANTOS, 1992). Com efeito, os resultados obtidos por ROLDÃO e SOUILLART (1994), ROMANO (1994) e PEIXE *et al.*, (1996) indicaram que, quer a enxertia de gomo, quer a propagação *in vitro* a partir de gomos terminais e axilares de material adulto ou enxertado, podem ser utilizadas para induzir o rejuvenescimento nesta espécie. Através da enxertia de gomo foram instalados três parques de clones, na Mata Nacional do Escaroupim, no Monte de Fava - Ermidas-Sado e em Montemor-o-Novo (PLANSEL), constituídos por cópias vegetativas das árvores adultas seleccionadas por Albino de Carvalho, relativamente à qualidade da cortiça. Estes parques estão vocacionados não só para a conservação de genótipos interessantes, como também para o fornecimento de propágulos vegetativos. É de referir que o parque de clones de Montemor-o-Novo foi fonte de material para estudos

de estacaria (ROLDÃO e SOUILLART, 1994) e de culturas *in vitro* (PEIXE, comunicação pessoal).

A propagação por estacaria, utilizando material lenhoso e semi-lenhoso, foi extensivamente ensaiada por NATIVIDADE (1948), mas com resultados sempre negativos. A evolução das tecnologias de controlo ambiental em estufa, utilizadas durante o processo de enraizamento de estacas e, provavelmente, a prática de aplicação de concentrações mais elevadas de hormonas de enraizamento, justificam os resultados obtidos posteriormente, por alguns investigadores, tanto a partir de plantas jovens (ROLDÃO, 1990; ROLDÃO *et al.*, 1992; ROMANO *et al.*, 1992; RIBEIRO, 1994; e MATA *et al.*, 1996) como de plantas enxertadas (ROLDÃO e SOUILLART, 1994). Na realidade, esta técnica é de todas as formas de propagação assexuada a que se apresenta com maiores potencialidades para uma aplicação mais generalizada, não só por ser a mais económica, como também por não apresentar os inconvenientes de incompatibilidade e interacção com os porta-enxertos (NATIVIDADE 1950; BARNESCHI, 1977 e TORIBIO *et al.*, 1992).

Os trabalhos mais recentes de micropropagação do sobreiro têm apresentado algum sucesso a partir de gomos apicais de plantas jovens (MANZANERA, 1990; MANZANERA e PARDOS, 1990 e GONÇALVES e RAINHO, 1992), de árvores adultas (ROMANO e MARTINS-LOUÇÃO, 1992; ROMANO *et al.*, 1992; ROMANO, 1994) e de plantas enxertadas (PEIXE *et al.*, 1996). As taxas de multiplicação obtidas por PEIXE *et al.* (1996) a partir de enxertos com dois anos aproximaram-se grandemente das referidas para o material juvenil.

1.5 - Objectivos

A propagação vegetativa, sendo uma forma de fornecer material de qualidade genética superior, assume especial importância para o sobreiro dada a incerteza da produção anual de semente, assim como a dificuldade da sua conservação e armazenamento da mesma. Sendo uma espécie de difícil propagação vegetativa, este facto é agravado com a idade das plantas que se pretendem multiplicar. Uma das formas de ultrapassar esta dificuldade consiste na aplicação de técnicas que induzam o rejuvenescimento, de que a enxertia é um exemplo.

Procurou-se contribuir para o estudo da viabilidade de multiplicar sobreiros adultos pela via vegetativa, de forma a incluir estas metodologias numa estratégia de melhoramento genético para a espécie. Assim, este trabalho foi orientado com vista a atingir os seguintes objectivos:

-
- Avaliar a possibilidade de aplicação da enxertia homoplástica de gomo como técnica de rejuvenescimento de sobreiros adultos, de forma a proporcionar a produção em massa, por estacaria, de árvores seleccionadas pela qualidade da cortiça.
 - Estudar alguns factores que influenciam a formação de raízes, tanto em estacas de plantas jovens como de enxertadas, procurando determinar quais os mais condicionantes do enraizamento.
 - Analisar a possibilidade de utilização das peroxidases como marcador bioquímico do processo de formação de raízes na estacaria do sobreiro.

II - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Origem do material vegetal

O material vegetal utilizado nestes estudos teve a seguinte origem:

A - Plantas jovens (idade inferior a dois anos) resultantes de sementeira de bolotas colhidas em árvores não identificadas

O material vegetal, utilizado nos ensaios de enraizamento nº1 a 5/89, 1 e 2/90, 3/92 e 6/93, foi colhido em sobreiros com cerca de um ano de idade, existentes na Quinta de S. Jorge (PLANSEL, Montemor-o-Novo). As plantas desenvolveram-se em sacos de plástico de 35x18 cm, colocados em abrigos cobertos com uma rede de ensombramento dupla com redução da luminosidade de 75%. As plantas foram regadas diariamente e receberam adubação mensal de 2 g/planta de Nitrolusal (20,5 N).

Para o estudo das peroxidases em diferentes constituintes da planta, parte do material utilizado, nomeadamente raízes e caules, foi obtido em sobreiros produzidos por via da estacaria. Estas estacas provenientes de plantas jovens mantiveram-se em contentores de enraizamento durante cinco meses. O restante material foi obtido a partir de bolotas germinadas, em tabuleiros com areia de rio esterilizada, numa estufa a 26°C e sujeitas a iluminação contínua (intensidade luminosa de 175 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$). As plantas permaneceram durante um mês e meio nestas condições, tendo sido regadas diariamente com água da torneira.

B - Árvores adultas, localizadas em parcelas marcadas na área de distribuição da espécie, seleccionadas pelo Engº Albino de Carvalho em função da qualidade da cortiça produzida. Na Tabela 2.1 encontram-se a localização e caracterização das árvores das parcelas escolhidas como candidatas a árvores "plus", nas quais se procedeu à colheita de garfos para enxertia. Na caracterização das árvores é referida a pontuação da qualidade da cortiça, a circunferência à altura do peito (CAP), a altura total e a altura de fuste até à inserção das primeiras pernadas.

Tabela 2.1 - Localização e caracterização das árvores seleccionadas

Parcela n°	Localização		Ident. árvore	CAP* (m)	Altura Total (m)	Altura fuste (m)	Pontuação de cortiça**
	(Lugar-Freguesia-Concelho)						
5/6A	V. Porco-Chouto-Chamusca	5/6A-4	1,82	9	1,70	97	
		5/6A-7	1,92	9	2,90	173	
		5/6A-17	1,23	10	1,90	120	
		5/6A-20	1,35	9	2,20	109	
5/7A	Gorjão-Chouto-Chamusca	5/7A-11	0,96	7	1,70	97	
		5/7A-13	1,03	8	2,10	163	
5/8	H. de Marvila-Ponte de Sôr	5/8-20	1,91	11	1,75	175	
5/9	Herd. da Ervideira-Ponte de Sôr	5/9-7	1,52	10	1,80	122	
		5/9-8	1,38	10	1,80	142	
		5/9-9	1,40	10	2,80	223	
6/7	B. Alho-Montargil-Ponte de Sôr	6/7-19	1,40	9	2,00	151	
		6/7-20	1,40	8	1,70	164	
6/8	V. Vilão-Montargil-Ponte de Sôr	6/8-5	1,28	6	1,80	234	
		6/8-6	1,13	7	1,60	122	
		6/8-7	1,35	8	1,70	146	
		6/8-14	1,40	8	1,60	149	
6/9	M. Novo-Galveias-Ponte de Sôr	6/9-5	1,21	9	1,70	182	
		6/9-6	1,48	11	1,70	170	
		6/9-10	1,30	11	2,30	172	
		EFN-4	2,21	12	1,80	120	
7/7	V. Queimada-Montargil-Ponte de Sôr	7/7-11	1,62	8	1,90	261	
		7/7-15	1,42	8	3,50	186	
7/8A	V. da Vaca-Montargil-Ponte de Sôr	7/8A-2	0,98	6	2,10	144	
		7/8A-3	1,15	7	1,30	182	
		7/8A-10	1,32	8	2,40	156	
		7/8A-20	1,11	9	2,50	119	
8/6	Sesmarias Manas-Couço-Coruche	8/6-4	1,31	10	2,70	110	
		8/6-6	1,11	8	2,00	100	
		8/6-y	-	-	-	138	
		8/6-19	0,96	10	3,00	105	
		8/6-20	1,70	12	2,20	225	
8/7	Furadouro-Mora	8/7-3	2,00	12	1,90	170	
		8/7-6	1,46	10	4,60	203	
8/8	Sesmarias-Mora	8/8-3	1,50	8	2,30	188	
8/11	H. Monção- C. Branca-Sousel	8/11-7	1,20	7	3,05	105	
9/6	Verdugos Meio-S.Mato-Coruche	9/6-5	1,42	8	2,50	151	
		9/6-14	1,67	7	1,80	173	
		9/6-18	1,21	10	2,20	157	
9/7	Asseisseira-Couço-Coruche	9/7-9	0,94	6	2,00	112	
		9/7-16	0,93	9	4,00	107	
10/10	Ilha Fria-Vimeiro-Arraiolos	10/10-4	2,10	8	1,40	185	
		10/10-9	2,01	10	1,90	126	
11/7	Q. Cortiço- M.-o-Novo	11/7-7	1,95	8	1,60	140	
-	Herdade do Chamusco	EFN-D	1,07	5,50	2,05	83	
-		EFN-I	1,22	7,50	1,95	131	
-		EFN-L	1,10	7,50	2,00	110	

*CAP- Circunferência à altura do peito (1,20 m)

**- De acordo com o descrito no parágrafo (Introdução)

Usando a metodologia de classificação das cortiças referida no parágrafo 1.2 e no Anexo I, CARVALHO (1991) efectuou um trabalho de amostragem, que consistiu numa inventariação de qualidade da cortiça de sobreiros, realizada em parcelas marcadas sistematicamente, na carta de distribuição da espécie, à escala 1:500 000, utilizando uma rede de 10 km de malha. Em cada parcela de dimensão variável, contendo no mínimo 20 sobreiros adultos e produtores de cortiça amadia (DAP \geq 90 cm), todas as árvores foram inventariadas e classificadas em função da qualidade da cortiça produzida. Esta inventariação permitiu a classificação de algumas árvores como produtoras de cortiça de qualidade, as quais poderão vir a ser consideradas candidatas a árvores "plus".

Por cortesia do Eng^o Albino de Carvalho, entre 1989 e 1994, algumas das parcelas foram visitadas, as árvores de menor pontuação identificadas e apreciadas para uma possível reprodução para o viveiro pela via vegetativa.

C - Parque de clones estabelecido no decurso deste trabalho na Quinta de S. Jorge (PLANSEL, Montemor-o-Novo), a partir de árvores seleccionadas pelo Eng^o Albino de Carvalho.

Nos ensaios de enraizamento n^o 1 e 2/92 e 1 a 5/93 utilizaram-se estacas recolhidas no Parque de Clones de Sobreiro da PLANSEL (PCS-PLANSEL). Este é constituído por pés-mães de diferentes clones, estabelecidos ao longo deste trabalho através da técnica de enxertia homoplástica de gomo, em porta-enxertos de um ano de idade (ver 2.1). Em Julho de 1990, as primeiras cópias vegetativas (rametos de primeira ordem) de nove clones diferentes, num total de 32 rametos, foram plantadas em local definitivo (viveiros da PLANSEL) constituindo assim, a primeira fase do parque clonal (Fase I). O estabelecimento da segunda fase (Fase II) ocorreu em Março de 1992 e compôs-se de nove clones num total de 108 rametos, tendo sido a enxertia realizada em Julho e Setembro de 1991. Em Março de 1993, com a plantação de mais 15 clones, num total de 67 rametos, concluiu-se a terceira fase do parque clonal (Fase III). Na Tabela 2.2 encontram-se listados os clones e número de rametos por clone existentes nas três fases.

Desde Abril a Outubro, e durante o período que decorreu o programa de estacaria, os pés-mães foram regados e receberam adubação quinzenal (Nutrifol, NPK 17-6-17), através de um sistema de rega gota-a-gota, numa proporção de 1,5 g/planta.

Tabela 2.2 - Lista dos clones de sobreiro e número de rametos existentes nas três fases do Parque clonal de sobreiro de Montemor-o-Novo

Fase I - Ano de 1990		Fase II - Ano de 1992		Fase III - Ano de 1993	
Clones	N.º rametos	Clones	N.º rametos	Clones	N.º rametos
6/7-20	1	7/8A-10	12	5/6A-4	6
7/8A-10	5	7/8A-20	20	5/7A-11	3
7/8A-20	8	8/6-4	9	6/7-19	6
8/6-4	3	8/6-6	23	6/8-6	3
8/6-6	1	8/6-y	11	7/8A-2	1
8/6-19	6	8/7-3	3	7/8A-10	6
8/6-y	3	9/6-14	12	7/8A-20	11
8/7-3	2	10/10-4	10	8/6-4	4
8/7-6	3	10/10-9	8	8/6-6	4
				8/6-y	7
				8/6-19	2
				8/11-7	2
				9/6-14	6
				10/10-4	4
				11/7-7	2

Na Tabela 2.3 apresenta-se a lista dos clones utilizados nos diferentes ensaios realizados durante 1992 e 1993, bem como a sua localização no parque de clones.

Tabela 2.3 - Lista dos clones utilizados nos diferentes ensaios de estacaria realizados em 1992 e 1993

Ensaio n.º	Clones utilizados	Localização no parque clonal
1/92; 2/92	7/8A-10; 7/8A-20; 8/6-4; 8/6-6; 8/6-19; 8/6-y; 8/7-3; 8/7-6	Fase I
1/93	7/8A-10; 7/8A-20; 8/6-4; 8/6-6; 8/6-y; 8/7-3; 9/6-14; 10/10-4; 10/10-9	
2/93	7/8A-10; 7/8A-20; 8/6-6; 8/6-y; 9/6-14	
3/93	7/8A-10; 7/8A-20; 8/6-4; 8/6-y	Fase I, II, III
4/93	7/8A-10; 7/8A-20; 8/6-4; 8/6-6; 8/6-y; 9/6-14; 10/10-4; 10/10-9	
5/93	7/8A-10; 7/8A-20; 8/6-19	

Anualmente, em Dezembro, os pés-mães foram podados de forma a não ultrapassarem 1 m de altura total. Este tipo de poda denominou-se poda suave. No ano de 1992, seleccionaram-se dois rametos de cada um dos três clones: 7/8A-10, 7/8A-20 e 8/6-19 pertencentes à Fase I aos quais se aplicou uma poda intensa ou seja, deixou-se apenas os ramos de primeira, segunda e terceira ordem.

2.2 - Metodologias Aplicadas

2.2.1 - Técnica de enxertia

A reprodução vegetativa de algumas árvores adultas, seleccionadas pelo Eng^o Albino de Carvalho, decorreu de 1989 até 1994, utilizando-se a técnica de enxertia homoplástica de gomo, desenvolvida no viveiro da Mata do Vimeiro, em Alcobaça (CORREIA, 1981) necessitando de um período mínimo de quatro anos para a sua concretização (Tabela 2.4). Segundo esta técnica, os gomos foram retirados de ramos das árvores a reproduzir e enxertados em sobreiros de cerca de um ano de idade (Fig. 2.1 e 2.2). As épocas do ano aconselhadas para a sua realização são Junho/Julho e Setembro. No ano anterior ao da enxertia foi feita a sementeira das bolotas em sacos de plástico (10x30 cm), com vista à produção dos porta-enxertos. Durante quatro anos (1989, 1992, 1993 e 1994) em duas épocas de enxertia analisadas (Junho/Julho e Setembro), o transporte dos garfos recolhidos nas árvores seleccionadas foi realizado em contentores repletos de areia de rio húmida, com o objectivo de evitar, tanto quanto possível, perdas no teor de água. Na época de crescimento do ano seguinte ao da enxertia foi avaliada a percentagem de pegamentos. Nas plantas cujo gomo enxertado se encontrava entumescido foi-lhes cortada a parte aérea correspondente ao porta-enxertos, a cerca de dois centímetros do ponto de união (Fig. 2.3) com o objectivo de induzir o desenvolvimento do rebento proveniente do garfo. A plantação no viveiro dos enxertos bem sucedidos foi realizada na época de crescimento do ano seguinte.

Dadas as dificuldades de obtenção de ramos, nas árvores a multiplicar, de dimensões semelhantes às dos porta-enxertos, como também no próprio destacamento dos gomos, foi iniciado no ano anterior ao da enxertia um programa de limpeza nas copas, como forma de induzir a rebentação de lançamentos mais vigorosos.

Tabela 2.4 – Plano das acções a desenvolver e calendarização a praticar para o estabelecimento de um programa de multiplicação vegetativa por enxertia de sobreiros adultos seleccionados.

Ano	Época do ano	Acções
1	Novembro	Sementeira dos porta-enxertos
	Dezembro- Março	Poda das árvores seleccionadas
2	Junho/Julho e Setembro	Colheita de garfos
		Enxertia de gomo
3	Abril/Maio e Setembro	Avaliação dos pegamentos
	Outubro	Plantação dos enxertos em parque clonal
4	Maio- Outubro	Colheita de estacas nas plantas enxertadas

2.2.2 - Técnica de estacaria

2.2.2.1 - Condições gerais dos ensaios

Os ensaios de enraizamento realizados no âmbito deste trabalho decorreram em estufas existentes nos viveiros da PLANSEL, em Montemor-o-Novo. Os dois primeiros ensaios (nº1 e 2/89) foram estabelecidos numa câmara de enraizamento em alvenaria com iluminação lateral, equipada com um sistema automático de regulação de temperatura e humidade relativa do ar, bancadas aquecidas e sistema de rega tipo "mist". Os restantes ensaios (nº3 a 5/89, 1 e 2/90, 1 a 3/92, 1 a 6/93) foram instalados numa estufa de estrutura de aço galvanizado, com cobertura de policarbonato, equipada com um sistema de arrefecimento tipo "cooling", rega por nebulização, bancada aquecida e sistema de ensombramento a 80%. Este sistema de ensombramento, accionado sempre que a intensidade luminosa fosse superior a $20,3 \text{ wm}^{-2}$ ou inferior a $0,986 \text{ wm}^{-2}$, funcionou de dia com o objectivo de baixar a temperatura e de noite como écran térmico, para evitar a inversão da temperatura. Sempre que a temperatura do ar atingiu $25\text{-}26^\circ\text{C}$, o arrefecimento foi activado. O funcionamento conjunto destes três sistemas (ensombramento, rega e arrefecimento) tinha como fim manter a temperatura do ar entre $20\text{-}25^\circ\text{C}$ e a humidade relativa do ar entre 80-100%, limites considerados como apropriados para o enraizamento de estacas.

Durante o período de enraizamento, as estacas foram dispostas em bancada aquecida (Fig. 2.4). Inicialmente, nos ensaios nº1 e 2/89, a temperatura da bancada foi de 25°C e mais tarde, em face de resultados nos ensaios nº3 e 4/89, foi alterada para 28°C . Neste período realizaram-se medições da temperatura e humidade relativa do ar dentro da estufa assim como da temperatura do substrato, três vezes por dia (9, 14 e 18 horas).

Ao fim de um, dois, três, quatro e cinco meses, consoante as condições pré-definidas para os diferentes ensaios, examinaram-se todas as estacas e avaliaram-se as percentagens de estacas com raiz (**CR**), que produziram *callus* (**CC**), sem resposta (**SR**) ou mortas (**MO**). Consideraram-se como enraizadas todas as estacas que apresentaram um ou mais primórdios radiculares com valor mínimo de cinco milímetros de comprimento (Fig. 2.5 e 2.6).

2.2.2.2 - Recolha e preparação das estacas

Nos ensaios de enraizamento utilizaram-se estacas terminais correspondentes a crescimentos do ano, semi-herbáceas, de seis a sete centímetros, identificadas por clone. A colheita deste material foi realizada de manhã, entre as 8 e as 10 horas, escolhendo-se raminhos semi-lenhosos com alguma firmeza.

Posteriormente, as estacas foram mergulhadas em solução de fungicida "Benlate", numa concentração de 1g l^{-1} , durante cinco minutos. Na zona inferior do caule, livre de folhas, e após a realização de um corte de 1 cm, foi aplicada a hormona de enraizamento, ácido indolbutírico (IBA) sob o forma de pó comercial "Rhizopon AA" ou de solução concentrada (cinco segundos) (ver 2.2.2.3.3). Após estes tratamentos, as estacas foram colocadas verticalmente no substrato. Nos ensaios nº1 a 5/89 e 1 e 2/90, as estacas foram plantadas directamente no substrato espalhado na bancada. Para facilitar a transplantação das plantas já enraizadas, nos ensaios seguintes, 1 a 3/92 e 1 a 6/93, optou-se pela utilização de contentores de plástico, tipo cuvetes de 28 cavidades, de 190 cm^3 volume unitário.

Durante o período de enraizamento e dadas as condições ambientais serem propícias ao desenvolvimento de fungos, procedeu-se semanalmente à pulverização com Benlate (1g l^{-1}).

2.2.2.3 - Estudos com material juvenil

Em 1989 e 1990, entre Maio e Novembro, estabeleceram-se ensaios com o objectivo de analisar o efeito de alguns factores no processo de enraizamento: o substrato, o ensombramento, a concentração da auxina na base das estacas e o método da sua aplicação. Como fonte de material vegetativo utilizaram-se sistematicamente sobreiros jovens, por se tratar de material que à partida, apresenta maior facilidade de enraizamento.

HARTMANN *et al.* (1997) consideram ser benéfico para a iniciação de primórdios radiculares que a temperatura do substrato se mantenha um pouco superior à temperatura ambiente. Outros autores indicam que a temperatura do substrato não deve ultrapassar os $23\text{-}24^\circ\text{C}$ de forma a prevenir o aparecimento de doenças tão frequentes nestas condições ambientais. Durante os meses de Verão, especialmente Julho e Agosto, foi difícil manter a temperatura no interior da estufa inferior a $25\text{-}26^\circ\text{C}$. Com o objectivo de analisar o efeito no enraizamento de uma temperatura do substrato superior a 25°C , optou-se por estabelecer ensaios comparativos em duas bancadas aquecidas às temperaturas de 25 e 28°C .

2.2.2.3.1 - Substratos de enraizamento

Em Junho de 1989 estabeleceu-se o ensaio n°2/89, onde se analisaram quatro substratos em seis diferentes combinações: perlite, turfa, turfa e perlite (1:1) e (2:1), areia fina, turfa e leca (1:1). Este decorreu numa bancada de enraizamento com aquecimento a 25°C. Posteriormente, em Agosto, na estufa de policarbonato, instalou-se o ensaio n°4/89, no qual se analisaram as seguintes misturas de substratos: turfa, turfa e perlite (2:1) e turfa e leca (1:1). As estacas foram colocadas em bancadas sujeitas a diferentes temperaturas de fundo: 25 e 28°C. Em Outubro efectuou-se um novo ensaio (n°5/89), igualmente instalado nas condições atrás descritas. Às três misturas testadas em Agosto foi acrescentado um quarto substrato: a perlite.

Em todos os ensaios aplicou-se na base das estacas "Rhizopon AA" numa concentração de 1%. As estacas mantiveram-se em bancada de enraizamento durante um período de três meses.

Na Tabela 2.5 resumem-se as condições em que decorreram os ensaios de substratos.

Tabela 2.5 - Ensaio de substratos realizados e condições gerais estabelecidas

Ensaio n°	Data do ensaio	Substratos de enraizamento	IBA	Temp. do substrato (°C)		Duração do ensaio
Câmara de enraizamento com iluminação lateral						
2/89	Junho	Perlite	Pó comercial 1%	25		3 meses
		Turfa				
		Turfa e perlite (1:1)				
		Areia fina				
		Turfa e perlite (2:1)				
		Turfa e leca (1:1)				
Estufa com cobertura de policarbonato						
4/89	Agosto	Turfa	Pó comercial 1%	25	28	3 meses
		Turfa e perlite (2:1)				
		Turfa e leca (1:1)				
5/89	Outubro	Turfa	Pó comercial 1%	25	28	3 meses
		Turfa e perlite (2:1)				
		Turfa e leca (1:1)				
		Perlite				

2.2.2.3.2 - Ensombramento

Em Maio de 1989, analisou-se o efeito do ensombramento das estacas no processo de enraizamento (ensaio n°1/89). Para tal, metade da área destinada ao ensaio foi coberta com uma rede dupla de ensombramento correspondente a uma redução de luminosidade de cerca de 75%. Utilizou-se como substrato de enraizamento a mistura de turfa e perlite na proporção de 1:1, colocado numa bancada com temperatura de fundo de 25°C. Como hormona de enraizamento aplicou-se IBA sob a forma de pó comercial, numa concentração de 1%. As estacas permaneceram em bancada durante um período de três meses.

2.2.2.3.3 - Hormona de enraizamento (IBA)

No ensaio n°3/89, realizado em Agosto, estudaram-se conjuntamente dois factores que podem afectar o enraizamento: o método de aplicação de IBA e a temperatura de substrato. Analisaram-se dois métodos de aplicação de IBA numa concentração de 1%: a)- Pó comercial "Rhizopon AA" e b)- Solução concentrada aplicada durante cinco segundos (Tabela 2.6). Após a aplicação da auxina, um conjunto de estacas foi colocado no substrato de enraizamento, turfa e perlite (1:1), a uma temperatura de 25°C e um segundo conjunto a 28°C.

Tabela 2.6 - Ensaio de avaliação dos efeitos da concentração de IBA e dos métodos de aplicação, na capacidade de enraizamento de estacas retiradas de diferentes fontes de material vegetal

Ensaio n°	Data do ensaio	IBA (%)	Método de aplicação do IBA	Substratos de enraiz.	Temp. substrato (°C)		Duração do ensaio (meses)
3/89	Agosto	1	Pó comercial Sol. concentrada	Turfa, perlite (1:1)	25	28	3
1/90	Abril	0,5	Sol. concentrada	Turfa, perlite (1:1)	28		3
		1					
		2					
		4					
	Novembro	0,5	Sol. concentrada	Turfa, perlite (1:1)	28		3
		1					
		2					
		4					
		8					

No ensaio n°1/90 estudou-se o efeito no enraizamento da concentração de IBA aplicado na base das estacas, colhidas em duas épocas, Abril e Novembro de 1990. Para tal, analisaram-se cinco modalidades: 0,5; 1; 2; 4 e 8% de IBA em solução concentrada. As estacas foram posteriormente colocadas em bancada aquecida a 28°C,

utilizando-se como substrato uma mistura de turfa e perlite na proporção de 1:1. As estacas mantiveram-se três meses em bancada de enraizamento.

2.2.2.4 - Estudos com material do parque de clones

2.2.2.4.1 - Mês de colheita das estacas

O efeito do mês de colheita das estacas no enraizamento foi analisado em 1992 e 1993 (ensaios n°1/92 e 1/93). No primeiro ano os estudos iniciaram-se em Maio e no ano seguinte em Junho, decorrendo mensalmente até Outubro. Em todos os ensaios aplicou-se 1% de IBA sob a forma de pó comercial. As estacas, identificadas por clone, foram colocadas numa mistura de turfa e perlite na proporção de 1:1, mantendo-se em bancada aquecida a 28°C, respectivamente, três e quatro meses nos ensaios n°1/92 e 1/93 (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 - Condições dos ensaio de enraizamento sobre o efeito da época de colheita das estacas recolhidas no parque de clones

Ensaio n.º	Mês de colheita	IBA (%)	Duração do ensaio (meses)	Meio de enraiz.	Clones
1/92	Maio	Pó comercial 1%	3	Turfa, perlite (1:1)	6/7-20; 7/8A-10; 7/8A-20; 8/6-4; 8/6-6; 8/6-19; 8/6-y; 8/7-3; 9/6-14
	Junho				
	Julho				
	Agosto				
	Setembro				
	Outubro				
1/93	Junho	Pó comercial 1%	4	Turfa, perlite (1:1)	7/8A-10; 7/8A-20; 8/6-4; 8/6-6; 8/6-y; 8/7-3; 9/6-14; 10/10-4; 10/10-9
	Julho				
	Agosto				
	Setembro				
	Outubro				

2.2.2.4.2 - Duração do enraizamento

Denominou-se duração do enraizamento ao tempo de permanência das estacas em bancada até à avaliação do enraizamento. De forma a estudar a resposta das estacas relativamente à duração do ensaio (ensaio n°1/92) estabeleceram-se estudos mensais, de Maio a Outubro de 1992, onde se analisaram cinco períodos de permanência diferentes: um, dois, três, quatro e cinco meses. As estacas, identificadas por clones, foram colocadas num substrato de enraizamento de turfa e perlite, na proporção de 1:1, aquecido a 28°C.

2.2.2.4.3 - Concentração de IBA aplicado

O efeito da concentração de IBA foi analisado, durante 1992 e 1993, em três meses de colheita: Junho, Agosto e Outubro (ensaios nº2/92 e 2/93). Analisaram-se sistematicamente cinco concentrações de IBA: 0; 0,5; 1; 2 e 4% aplicadas sob a forma de pó comercial. No ensaio nº2/92 realizado em 1992, as estacas, identificadas por clone, foram retiradas da Fase I do parque clonal, enquanto que no ensaio nº2/93 colheram-se estacas em cinco dos clones pertencentes à Fase II: 7/8A-10, 7/8A-20, 8/6-6, 8/6-y e 9/6-14. Na Tabela 2.8 apresentam-se as condições gerais em que decorreram os ensaios.

Tabela 2.8 - Condições gerais de estabelecimento dos ensaios de avaliação dos efeitos da concentração de IBA na capacidade de enraizamento de estacas

Ensaio nº	Mês de colheita	IBA (%)	Meio de enraiz.	Temp. do substrato	Duração do ensaio (meses)	Origem do material
2/92	Junho Agosto Outubro	0 0,5 1 2 4	Turfa, perlite (1:1)	28°C	3	6/7-20; 7/8A-10; 7/8A-20; 8/6-4; 8/6-6; 8/6-19; 8/6-y; 10/10-4; 10/10-9
2/93	Junho Agosto Outubro	0 0,5 1 2 4	Turfa, perlite (1:1)	28°C	4	7/8A-10, 7/8A-20, 8/6-6, 8/6-y; 9/6-14

2.2.2.4.4 - Enxertia

Com o objectivo de analisar o efeito da enxertia na capacidade de enraizamento de estacas compararam-se, no ano de 1992, as respostas de estacas retiradas de sobreiros jovens com sobreiros enxertados e pertencentes à Fase I do parque de clones. O estudo foi realizado em quatro meses de colheita de estacas: Julho, Agosto, Setembro e Outubro. Este estudo incluiu o ensaio nº1/92 e parte dos resultados do ensaio nº3/92.

No ano de 1993, comparou-se o efeito do ano de enxertia na capacidade de enraizamento. Nos ensaios realizados neste ano as estacas, recolhidas nas duas fases do parque de clones (I e II), foram identificadas relativamente ao ano de enxertia da planta-mãe, definindo-se quatro modalidades diferentes: plantas-mães enxertadas em 1989, em 1990 e em 1991 e plantas-mães jovens (modalidade introduzida como termo comparativo), consistindo nos ensaios nº1, 3, 4, 5 e 6/93 e parte do ensaio 2/93.

2.2.2.4.5 - Intensidade de poda

De forma a estudar o efeito no enraizamento das estacas de dois níveis de intensidade de poda dos pés-mães, seleccionaram-se dois rametos de cada um de três clones pertencentes à Fase I do parque clonal: 7/8A-10, 7/8A-20 e 8/6-19. Em Dezembro de 1992, aplicou-se num dos rametos de cada clone uma poda intensa, deixando apenas os ramos de primeira, segunda e terceira ordem; no outro rameto, aplicou-se um corte suave, de forma a que a planta-mãe não ultrapassasse um metro de altura. O ensaio para análise deste factor (ensaio nº5/93) foi realizado no ano seguinte (1993) em três meses de colheita de estacas: Junho, Agosto e Outubro.

2.2.2.4.6 - Clone

O efeito do clone na capacidade de enraizamento foi estudado durante 1992 e 1993, conjuntamente com os diferentes factores analisados: mês de colheita de estacas, duração do enraizamento, concentração de IBA, efeito do ano e da técnica de enxertia e intensidade de poda aplicada aos pés-mães.

Nos ensaios que decorreram em 1992 (ensaios nº1 e 2/92), todas as estacas provenientes de material enxertado foram identificadas por clone. Já em 1993 (ensaios 1 a 5/93), para além da identificação por clone foi ainda fixada a localização de cada rameto utilizado nos vários ensaios.

Na tabela 2.9 encontram-se listados os clones estudados nos vários ensaios realizados.

Tabela 2.9 - Listagem de clones estudados ao longo dos ensaios realizados em 1992 e 1993 e respectivo ano de enxertia

Clones	Ano de enxertia	Ensaio em que foram usados	
		1992	1993
6/7-20	1989	1; 2; 3	-
7/8A-10	1989; 1991		1; 2; 3; 4; 5
7/8A-20	1989; 1990; 1991		
8/6-4	1989; 1991		1; 3; 4
8/6-6			1; 2; 4
8/6-y	1989; 1990; 1991		1; 2; 3; 4
8/6-19	1989		5
8/7-3	1989; 1990		1
9/6-14	1991		1; 2; 4
10/10-4	1991		-
10/10-9		-	

2.2.2.5 - Delineamento experimental e análise estatística dos dados

No estabelecimento dos ensaios de enraizamento de estacas para comparação do efeito dos diferentes factores utilizou-se um delineamento experimental de casualização completa, com restrições. Cada ensaio comportou no mínimo três

repetições constituídas por unidades experimentais de 28 estacas. Nos ensaios que decorreram durante 1989 e 1990, a unidade experimental consistiu em 40 estacas.

Na análise dos resultados dos ensaios relativos aos efeitos dos vários factores estudados, que apresentavam mais de duas modalidades, aplicou-se, de um modo geral, a Análise de Variância (ANOVA), modelo de efeitos fixos, a um, dois ou três factores, consoante o caso em estudo. Procedeu-se à transformação dos dados, de forma a garantir os pressupostos de normalidade e de igualdade de variâncias necessários para a aplicação da ANOVA. Em virtude dos valores da variável dependente, Y , serem percentagens, a transformação utilizada foi $Y' = \arcsen \sqrt{Y}$, em que $0 \leq Y \leq 100$. Previamente, calcularam-se as médias e respectivos desvios padrões considerando que os dados originais seguem uma distribuição binomial. A interpretação dos resultados foi realizada após se ter procedido à transformação inversa (PEARCE, 1978). Sempre que os resultados do teste de Fisher indicaram a rejeição da hipótese nula, procedeu-se à comparação múltipla das médias, utilizando para tal o teste da Menor Diferença Significativa a um nível de significância, α , de 0,05 (LSD_{0,05}) (FISHER e YATES, 1971).

Na comparação dos pegamentos das enxertias obtidas nas duas épocas estudadas (Junho/Julho e Setembro) ao longo dos quatro anos aplicou-se uma ANOVA modelo hierárquico.

Para a análise do efeito do clone, efectuada no ano de 1992, aplicou-se a ANOVA de Medições Repetidas. A estimação dos valores omissos foi realizada de acordo com os métodos descritos por STEEL e TORRIE (1980).

No estudo do efeito da colocação de ensombramento aplicou-se o teste bilateral de comparação de médias, depois de se ter analisado a hipótese de igualdade das duas variâncias (SOKAL, 1981).

A comparação dos resultados, obtidos nos dois métodos de aplicação da hormona de enraizamento, efectuou-se através do teste não paramétrico de Wilcoxon às amostras emparelhadas, devido à falta de normalidade da amostra, mesmo após transformação dos dados (SIEGEL e CASTELLAN, 1988).

O estudo das diversas variáveis de resposta (**CR**, **CC**, **SR** e **MO**) obtidas quer nas estacas retiradas de material juvenil quer de material enxertado foi obtida através de uma Análise de Componentes Principais (ACP). O objectivo consistiu em averiguar as tendências mais marcantes de resposta dos diferentes tipos de materiais vegetais analisados aos vários factores em estudo. Para tal, os resultados foram organizados por diferentes níveis de tratamento (n.t.) isto é, considerou-se cada modalidade em cada factor como sendo um nível de tratamento.

Para os resultados globais obtidos nos anos de 1992 e 1993, procedeu-se aos agrupamento dos vários n.t. com base na similaridade das suas respostas para as diferentes variáveis em estudo, através da análise de classificação hierárquica, aplicando como medida de semelhança entre os indivíduos e subgrupos os métodos da distância euclidiana e do vizinho mais próximo.

Os cálculos foram realizados usando os programas de análise de dados GENSTAT 5 versão 3.2 para Windows e STATVIEW versão 4.01 para Macintosh.

2.2.3 - Estudo das peroxidases

2.2.3.1 - Obtenção das peroxidases correspondente às fracções solúvel e ionicamente ligadas

De um modo geral, a metodologia seguida para extracção das peroxidases nas raízes e caules foi descrita por JACKSON e RICARDO (1992). Os tecidos, congelados rapidamente em azoto líquido foram homogeneizados com um triturador, numa câmara a 4°C, usando um volume de cerca de 2 mlg⁻¹ de peso fresco de uma solução tampão Tris-HCl 50mM contendo 25mM de ácido ascórbico (pH 3,4).

O homogenato foi centrifugado a 6 500 *g* para obtenção das proteínas correspondentes às fracções solúvel (sobrenadante) e ionicamente ligadas às paredes celulares (precipitado). A fracção solúvel foi clarificada através de centrifugação a 20 000 *g*, durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 50 000 *g*. Com vista à obtenção da fracção correspondente às proteínas ligadas às paredes celulares, o precipitado foi ressuspensão em 1% (m/v) de Triton X-100 (na solução tampão) e centrifugado a 6 500 *g*, durante 10 minutos a 4°C, seguido de três lavagens na solução tampão inicialmente utilizada. As proteínas ligadas às paredes celulares foram extraídas ressuspensando o material vegetal numa solução de KCl 1M durante 20 minutos numa câmara a 4°C, sob agitação (GOLDBERG, 1980; BARCELÓ *et al.*, 1987). Após centrifugação a 6 500 *g*, recolheu-se o sobrenadante. Ambas as fracções foram posteriormente concentradas em Diaflow ou em Centricon-10 (limite de exclusão para proteínas com massa molecular de 10 000 Da) consoante o volume total obtido, usando respectivamente, as técnicas de ultrafiltração por pressão ou por centrifugação. O extracto da fracção proteica ligada às paredes celulares foi sujeito a uma dessalinização adicionando-se solução tampão à amostra concentrada, tantas vezes quantas as necessárias para diminuir a quantidade de sal presente.

2.2.3.2 - Remoção de compostos fenólicos dos extractos

A ligação às peroxidases dos compostos fenólicos, libertados durante o processo de extracção, pode provocar perdas de actividade enzimática e induzir à formação de artefactos. De forma a evitar esse tipo de ligações testaram-se algumas das técnicas de extracção de enzimas descritas por LOOMIS (1974), WENDEL e WEEDEN (1989) e JOERSBO *et al.* (1989), nomeadamente o controlo do pH da solução tampão, a adição de antioxidantes e de agentes redutores como sejam ácido ascórbico, mercaptoetanol e Na₂SO₃, assim como polímeros adsorventes (PVP insolúvel).

Após a extracção das proteínas ionicamente ligadas e de forma a investigar a existência de possíveis conformeros, as amostras foram sujeitas às técnicas de desnaturação irreversível pelo calor e de descongelação/congelação em solução salina (MADER, 1980). Na primeira as amostras são sujeitas a uma temperatura de 70°C, durante determinados intervalos de tempo e logo após colocadas a 0°C, de forma a provocar a sua renaturação. A selecção do intervalo de tempo a sujeitar as amostras a 70°C depende da percentagem de desnaturação irreversível (entre 35-50%), calculada em função da actividade peroxidásica inicial.

2.2.3.3 - Medição da actividade peroxidásica

Depois da extracção das proteínas solúveis e das ionicamente ligadas às paredes celulares realizou-se a medição da actividade das peroxidases, seguindo a metodologia descrita por JACKSON e RICARDO (1994). A actividade foi determinada por espectrofotometria, seguindo as alterações na absorvência da amostra a 470 nm, numa solução 0,1 M de acetato de sódio (pH 5), guaiacol 1mM e H₂O₂ 1mM, após se adicionar a amostra (1-10 µl). Uma unidade de actividade peroxidásica foi definida como o equivalente a uma mudança de 0,1 unidades de absorvência por minuto. Como controlo, utilizou-se a solução nas concentrações acima descritas, num volume final de 1 ml, sem a presença da amostra.

2.2.3.4 - Focagem isoeléctrica e revelação da actividade peroxidásica

As focagens isoeléctricas não equilibradas (NEIEF) foram realizadas num aparelho de electroforese (Multiphor II Electrophoresis System LKB 2117) equipado com sistema de arrefecimento. Usaram-se géis de poliacrilamida (5% T, 3% C) com 0,5 mm de espessura, contendo 5% de anfólitos (Ampholine pH 3,5-10, PHARMACIA). A polimerização do gel foi iniciada adicionando 50 ml de persulfato de amónio (PSA) a 10% e 7 ml de TEMED por cada 15 ml de solução de polímeros. As amostras foram aplicadas em papéis de filtro de dimensões de 1 cm x 0,5 cm colocados sob o gel junto ao cátodo ou ao ânodo consoante os ensaios realizados. As focagem isoeléctricas

decorreram a 4°C, sob uma potência constante de 0,25 w.cm⁻¹, durante um intervalo tempo variável (1 a 1,2 horas).

A revelação dos zimogramas foi efectuada mergulhando o gel numa solução de 0,1 M de acetato de sódio (pH 5) contendo 2,5 mM de guaiacol e 1 mM de H₂O₂.

2.2.3.5 - Padrão peroxidásico durante os processos de cicatrização e de formação de raízes em estacas

Para o estudo das peroxidases durante o processo de cicatrização, retiraram-se 60 estacas correspondentes a crescimentos terminais de sobreiros de dois meses de idade e constituíram-se três lotes de 20 estacas cada. Num primeiro lote cortaram-se cerca de dois centímetros das bases das estacas, que se congelaram imediatamente em azoto líquido. As restantes 40 estacas foram dispostas num tabuleiro com turfa, colocado numa câmara de crescimento a 25°C. Ao fim de 12 e 72 horas retiraram-se do substrato lotes de 20 estacas e repetiu-se a operação de corte e congelamento.

No estudo efectuado durante o processo de formação de raízes utilizaram-se no total 192 estacas retiradas de plantas com quatro meses de idade, mantidas numa estufa com cobertura de polietileno, nas condições de enraizamento descritas no parágrafo 2.2.1. Como substrato usou-se turfa e perlite numa proporção 1:1. Não se aplicou hormona de enraizamento na base das estacas. Antes da sua colocação no substrato, ao fim de um, cinco e sete dias retiraram-se 28 estacas e repetiu-se a metodologia do corte e congelamento acima descrito. Ao vigésimo dia, dado já existirem estacas com primórdios radiculares, estabeleceram-se para as restantes estacas três classes de material: classe I - estacas com caules entumescidos; classe II - estacas com raízes visíveis, mas de comprimento inferior a dois centímetros; classe III - estacas com raízes de comprimento superior a dois centímetros.

Em ambos os ensaios, a extracção das peroxidases foi realizada usando como solução tampão de Tris HCl (pH 7,2) 50 mM contendo 25 mM de ácido ascórbico.

III - RESULTADOS

3.1 - Multiplicação vegetativa por enxertia

A percentagem de pegamentos da enxertia homoplástica de gomo foi analisada ao longo de quatro anos: 1989, 1992, 1993 e 1994 em duas épocas normalmente aconselhadas para a sua realização: Junho/Julho e Setembro (CORREIA, 1981). Os resultados destes estudos encontram-se na Fig. 3.1 e no Anexo II.

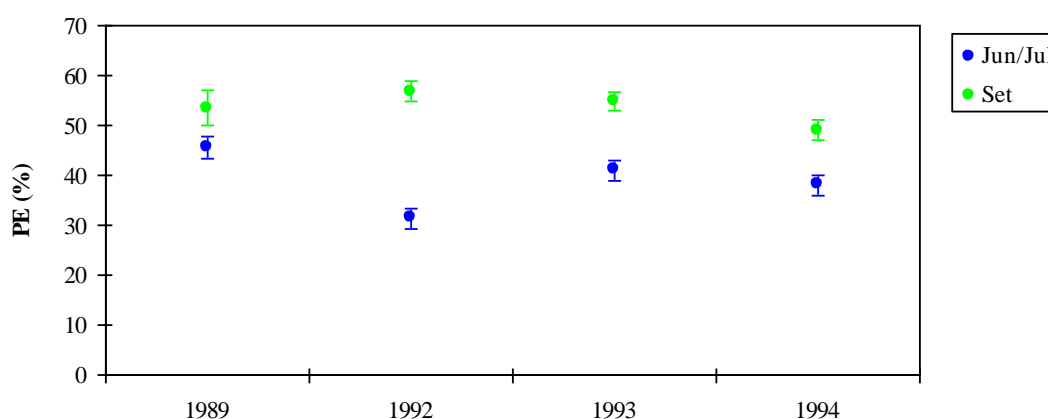


Figura 3.1 - Percentagens médias de pegamentos (PE) e respectivos desvios padrões obtidos nas enxertias de gomo realizadas nas duas épocas aconselhadas (Junho/Julho e Setembro) ao longo dos quatro anos estudados

Na Tabela 3.1 apresentam-se os resultados da análise estatística realizada através de uma ANOVA modelo hierárquico para os factores: ano e época de enxertia.

Tabela 3.1- ANOVA modelo hierárquico para a variável transformada percentagem de pegamentos da enxertia de gomo (PEt) relativamente ao ano e época de enxertia

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
Ano de enxertia	3	167,02	55,67	0,11 n.s.
Época (ano enxertia)	4	2066,72	516,68	33,70 ***
Resíduo	88	1349,16	15,33	

(1)- Níveis de significância para a variável de Fisher: **n. s.**- não significativo ($p > 0,05$); *******- altamente significativo ($p \leq 0,001$)

Nas condições ensaiadas, não se verificaram diferenças significativas entre os diferentes anos de enxertia estudados. No entanto, relativamente ao factor época de enxertia constataram-se diferenças altamente significativas. A observação da Fig. 3.1 mostra claramente que a enxertia realizada na época de Setembro conduziu a uma

taxa de sucesso (valor médio de $53,57 \pm 1,09\%$) superior à atingida em Junho/Julho (valor médio de $39,57\% \pm 0,92$).

Ao longo destes quatro anos propagaram-se um total de 46 sobreiros adultos seleccionados, os quais foram distribuídos pelos parques de clones de sobreiro existentes (Mata Nacional do Escaroupim, PLANSEL - Montemor-o-Novo e Monte de Fava - Ermidas do Sado).

3.2 - Multiplicação vegetativa por estacaria

3.2.1 - Ensaios com material juvenil

3.2.1.1 - Substratos de enraizamento

Como substratos de enraizamento estudaram-se a perlite, a turfa, a areia e a leca, durante os meses de Junho, Agosto e Outubro de 1989 (ensaios nº2/89, 4/89 e 5/89; Anexo III), apresentando-se os resultados médios e os respectivos desvios padrões na Fig. 3.2. A análise estatística dos resultados destes ensaios foi realizada através de uma ANOVA a um factor (Tabela 3.2).

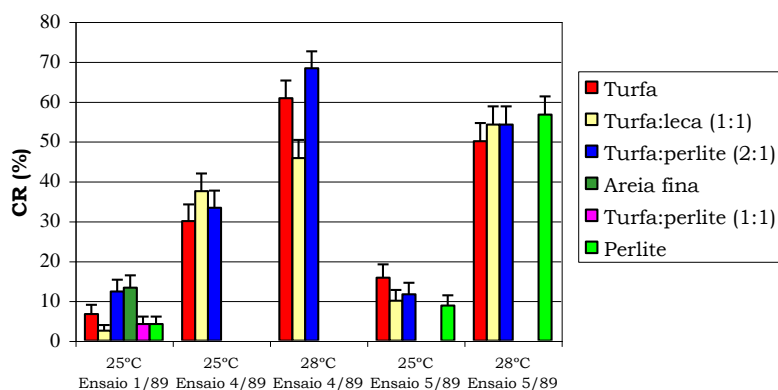


Figura 3.2 - Percentagens médias de enraizamento (CR) e respectivos desvios padrões para os diferentes substratos testados, obtidos nos ensaios 2/89, 4/89 e 5/89, estabelecidos em Junho, Agosto e Outubro para diferentes temperaturas do substrato

Para as condições em que decorreram os vários ensaios não se verificaram diferenças significativas entre as modalidades de substratos testadas. No entanto, como se observa na Fig. 3.2, as percentagens médias de enraizamentos obtidas na bancada com aquecimento a 28°C foram sistematicamente superiores às da bancada a 25°C. Por outro lado, os valores médios de enraizamento no ensaio realizado em Agosto foram mais elevados que os de Outubro.

Tabela 3.2 - ANOVA a um factor para a variável transformada percentagem de estacas com raiz relativamente aos substratos utilizados nos ensaios estabelecidos em Junho, Agosto e Outubro para diferentes temperaturas de bancada

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
Ensaio nº2/89				
Junho 25°C				
Substratos	5	557,13	111,43	2,91 n.s.
Resíduo	12	459,83	38,32	
Ensaio nº4/89				
Agosto 25°C				
Substratos	2	30,01	15,01	0,57 n.s.
Resíduo	6	157,16	26,19	
Agosto 28°C				
Substratos	2	275,57	137,78	3,44 n.s.
Resíduo	6	240,29	40,05	
Ensaio nº5/89				
Outubro 25°C				
Substratos	3	192,22	64,07	0,88 n.s.
Resíduo	12	876,09	73,01	
Outubro 28°C				
Substratos	3	76,35	25,45	0,29 n.s.
Resíduo	12	1056,05	88,00	

(1)- Níveis de significância para a variável de Fisher: **n.s.**- não significativo ($p > 0,05$)

3.2.1.2 - Ensombramento

Em Maio de 1989, estudou-se o efeito da colocação de uma rede de ensombramento durante o período de enraizamento. Os resultados referentes a este ensaio encontram-se no Anexo III, sendo a percentagem média obtida para as estacas sujeitas a ensombramento de apenas $5,44 \pm 1,79\%$ enquanto que, sem ensombramento se obteve o valor médio de $16,46 \pm 2,93\%$. Para a análise estatística aplicou-se o teste de comparação de médias. A rejeição da hipótese nula, relativamente à igualdade das médias, indica que, para as condições em que decorreram os ensaios, a colocação de ensombramento durante a formação de raízes não foi favorável ao processo de enraizamento (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Testes de hipóteses para a igualdade de variâncias e para comparação de médias relativamente ao estudo do efeito do ensombramento na variável transformada percentagem de estacas com raiz (CRT)

Hipótese nula (H_0)	Hipótese alternativa (H_1)	Região crítica	Teste estatístico (1)
Igualdade de variâncias $s_1^2=22,05$ $s_2^2=15,50$	$s_1^2 \neq s_2^2$	$F < f_{0,975}(2,2)$ e $F > f_{0,025}(2,2)$	f calc.= 1,42 n.s.
Comparação de médias $\bar{y}_1=13,49$ $\bar{y}_2=23,94$	$\bar{y}_1 \neq \bar{y}_2$	$T < -t_{0,025}$ e $T > t_{0,025}$	t calc.= 2,95*

(1)- Níveis de significância: **n.s.**- não significativo ($p>0,05$); *- significativo ($p\leq 0,05$)

3.2.1.3 - Hormona de enraizamento (IBA)

3.2.1.3.1 - Métodos de aplicação

Analisaram-se dois métodos de aplicação de IBA na base das estacas: pó comercial "Rhizopon" e solução concentrada aplicada durante cinco segundos (ensaio nº3/89). Os resultados deste ensaio apresentam-se na Tabela 3.4 e no Anexo III.

Na análise estatística destes resultados foi usado o teste de Wilcoxon às amostras emparelhadas. Os resultados deste teste indicam não haver evidência para a rejeição da hipótese nula, H_0 , isto é, para as condições em que decorreu o ensaio, os dois métodos testados de aplicação da hormona de enraizamento conduzem a resultados idênticos.

Tabela 3.4 - Teste de Wilcoxon aplicado aos resultados de enraizamento (CR) observados no ensaio nº3/89 em que se comparam os dois diferentes métodos de aplicação da auxina em estacas sujeitas a duas temperaturas de substrato pré-estabelecidas, 25°C e 28°C

Temperatura do substrato (°C)	CR		$d_i = X_i - Y_i$	Ordenação T	
	IBA Pó	IBA Líquido			
25	25,0	47,5	-22,5	-4	
	50,0	15,0	35,0	5	
	27,5	22,5	5,0	2	
28	45,0	55,0	-10,0	-3	
	55,0	57,5	-2,5	-1	
	52,5	52,5	0	--	
				N=5	T+=7 n.s.

N- nº de pares com $d_i \neq 0$; T+- Soma das posições das diferenças d_i positivas

Tal como se observou nos ensaios de comparação de substratos, também neste se verificou que os valores de **CR** mais elevados corresponderam às estacas colocadas na bancada com temperatura de 28°C.

3.2.1.3.2 - Concentrações estudadas

O efeito de diferentes concentrações de IBA (0,5; 1; 2; 4 e 8%) no enraizamento foi testado em duas épocas de colheita de estacas: Abril e Novembro de 1990, nos ensaios n°1 e 2/90 (Anexo III). Na Tabela 3.5 apresentam-se os valores médios e respectivos desvios padrões das percentagens de estacas com raiz obtidos para as cinco concentrações de IBA estudadas.

Tabela 3.5 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para diferentes aplicações de IBA, em dois meses de colheita de estacas, relativamente a variável percentagem de estacas com raiz (CR).

Mês de colheita de estacas	Concentração de IBA (%)	CR (%)
Abril	0,5	20,00 ($\pm 3,65$)
	1	10,83 ($\pm 2,84$)
	2	15,83 ($\pm 3,33$)
	4	5,83 ($\pm 2,14$)
	8	5,00 ($\pm 1,99$)
Novembro	0,5	20,00 ($\pm 4,47$)
	1	16,25 ($\pm 4,12$)
	2	12,50 ($\pm 3,70$)
	4	6,25 ($\pm 2,71$)
	8	21,25 ($\pm 4,57$)

A aplicação de uma ANOVA a dois factores indicou a existência de diferenças significativas entre os diferentes tratamentos relativamente ao factor concentração de IBA, não se verificando diferenças significativas para o mês de colheita das estacas, nem para a interacção entre os dois factores (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Anova a dois factores para a variável transformada da percentagem de estacas com raiz (CRT) relativamente à concentração de IBA aplicada na base da estaca e ao mês de colheita de estacas

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
Concentração de IBA	4	408,04	102,01	3,93*
Mês de colheita de estacas	1	53,03	53,03	0,17 n.s.
IBA x mês de colheita	4	247,76	61,94	2,39 n.s.
Resíduo	15	389,61	25,97	

(1)- Níveis de significância para a variável de Fisher: **n.s.**- não significativo ($p > 0,05$);
*- significativo ($p \leq 0,05$)

Como se pode observar na Tabela 3.7, o valor mais elevado de enraizamento (19,3%), obtido no modelo aplicado, foi alcançado para uma concentração de IBA de 0,5%.

Tabela 3.7 - Valores médios (retransformados) obtidos relativamente às diferentes aplicações de IBA para a variável percentagem de estacas com raiz (CR). Os valores representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD0,05)

Concentração de IBA (%)	CR (%)
0,5	19,3 a
1	13,4 bc
2	14,2 ab
4	5,7 c
8	10,1 bc

3.2.1.4 - Análise geral do comportamento das estacas

A apreciação dos resultados obtidos nos diferentes ensaios com material juvenil permitiu constatar a existência de uma variabilidade no comportamento das estacas relativamente aos factores estudados. No sentido de procurar compreender esse comportamento, analisaram-se os resultados dos ensaios n°3, 4 e 5/89 em termos de percentagem de estacas com raiz (**CR**) com *callus* (**CC**), sem resposta (**SR**), e mortas (**MO**), aplicando uma Análise de Componentes Principais (ACP).

Tabela 3.8 - Valores percentuais médios para as variáveis resposta das estacas obtidos nos diferentes ensaios realizados com material juvenil

Mês de colheita de estacas	Temp. subst. °C	Mét. de aplicação de IBA	Subst.	CR (%)	CC (%)	SR (%)	MO (%)
Agosto	25°C	pó	Turfa	31,25	16,25	51,25	1,25
		pó	T:P	31,25	17,92	48,33	3,75
		liq	2T:P	33,33	18,33	45,00	2,50
		pó	T:L	37,50	20,00	36,67	5,83
Agosto	28°C	pó	Turfa	60,83	14,17	22,50	2,50
		liq	T:P	52,92	16,67	29,58	0,83
		pó	2T:P	68,33	17,50	12,50	1,67
		pó	T:L	45,83	24,17	25,00	4,00
Outubro	25°C	pó	Perlite	2,50	73,80	17,50	6,20
		pó	Turfa	8,33	52,50	36,66	2,50
		pó	2T:P	9,38	45,00	34,38	10,00
		pó	T:L	8,12	38,12	44,38	9,38
Outubro	28°C	pó	Perlite	50,00	26,75	21,88	1,25
		pó	Turfa	43,12	29,38	24,38	3,12
		pó	2T:P	43,75	33,75	18,75	4,39
		pó	T:L	50,62	32,50	14,38	2,50

Na Tabela 3.8 apresentam-se, para cada nível de tratamento, os valores percentuais médios para as quatro variáveis de resposta das estacas obtidas nos diferentes ensaios.

A matriz de correlações (Tabela 3.9) entre as variáveis de resposta das estacas às condições dos ensaios permite apreciar o grau de intensidade da relação entre as

variáveis. A análise desta matriz indica que a variável **CR** está altamente correlacionada ($P \leq 0,001$) de uma forma negativa com a variável **CC** e também negativamente correlacionada ($P \leq 0,01$) com **MO**. Isto significa que a um aumento no número de estacas enraizadas corresponde uma diminuição do número de estacas com *callus* e também de estacas mortas, embora a relação entre **CR** e esta última variável não seja tão intensa. Por outro lado, verifica-se que quando aumenta a percentagem de estacas com *callus* aumenta também o número de estacas mortas, dado as variáveis **CC** e **MO** estarem directamente correlacionadas. Deste modo, os resultados indicam que condições que eventualmente favoreçam o enraizamento contrariam a formação de *callus* e baixam a mortalidade das estacas.

Tabela 3.9 - Matriz de correlação entre as variáveis de resposta das estacas obtidas para os diferentes níveis de tratamentos

Variável	CR	CC	SR	MO
CR	1,000			
CC	-0,750***	1,000		
SR	-0,475n.s.	-0,214n.s.	1,000	
MO	-0,668**	0,506*	0,180n.s.	1,000

n=16; gl=n-2: $P_{0,005}$ $P_{0,05}=0,2568$ $P_{0,01}=0,3378$ $P_{0,001}=0,4135$

Na Tabela 3.10, encontram-se registados os valores próprios de cada eixo da análise de componentes principais, assim como a percentagem da variabilidade explicada por cada um. O primeiro dos eixos representa a maior fonte de variação entre os indivíduos, contribuindo para explicar cerca de 58,6% da variabilidade total. O segundo eixo, por sua vez, representa 29,8% da variação existente. Devida à existência de uma relação linear entre as variáveis iniciais (a sua soma é 100%), o quarto eixo apresenta-se com um valor próprio nulo. Como se pode observar, os dois primeiros eixos explicam, no conjunto, 88,4% da variabilidade. Deste modo, o plano de projecção formado pelas duas componentes principais permite uma análise dos resultados com algum rigor.

Tabela 3.10 - Valores próprios das diferentes componentes e percentagem da variação total explicada

Eixo	Valores próprios	Variabilidade explicada (%)	Percentagem acumulada (%)
1	2,346	58,646	58,647
2	1,192	29,797	88,443
3	0,462	11,547	99,990

4	0,000	0,01	100,000
---	-------	------	---------

As contribuições de cada uma das variáveis iniciais para a formação das duas componentes principais consideradas encontram-se na Tabela 3.11. O sinal e a dimensão de cada coeficiente dá uma indicação do peso que cada variável representa nos dois índices de variabilidade ou seja, nos dois eixos principais. Assim, o primeiro eixo traduz essencialmente uma oposição entre a variável **CR** com **MO** e **CC**, podendo-se dizer que este primeiro eixo separa os tratamentos que induzem raízes dos que provocam *callus* ou estacas mortas. A variável que mais contribui para a formação do segundo eixo é a percentagem de estacas sem resposta, **SR**. Pode ainda considerar-se que esta variável se encontra em oposição a **CC**.

Tabela 3.11 - Contribuição das variáveis iniciais para a formação dos dois primeiros eixos principais

Variável	Coeficientes das componentes principais	
	Eixo 1	Eixo 2
CR	-0,6304	-0,1341
CC	0,5193	-0,4917
SR	0,2120	0,8601
MO	0,5366	-0,0214

A Fig. 3.3 representa graficamente no plano principal as variáveis iniciais e os diferentes níveis de tratamento. Os indivíduos que na nuvem de pontos se encontram mais à esquerda apresentam percentagens de enraizamento mais elevadas. Correspondem aos tratamentos cujas estacas foram sujeitas a uma temperatura de substrato de 28°C. Em oposição, agrupam-se os níveis de tratamento que conduzem a percentagens de formação de *callus* e de estacas mortas mais elevadas. Estas duas respostas surgem relacionadas tanto com a temperatura do substrato de 25°C, como com o mês de Outubro para colheita de estacas. O nível de tratamento correspondente ao mês de Agosto para colheita de estacas com temperatura de fundo de 25°C está associado à variável **SR**.

Como se pode constatar, a temperatura de substrato tem um efeito determinante para a resposta das estacas. Este efeito é demonstrado pela variação contida no primeiro eixo, denominado como o eixo de variação da temperatura do substrato. O enraizamento surge como resposta positiva das estacas a uma temperatura do substrato mais elevada (28°C) em oposição às outras possíveis respostas, formação de *callus*, sem resposta ou mesmo mortas, para uma temperatura mais baixa (25°C).

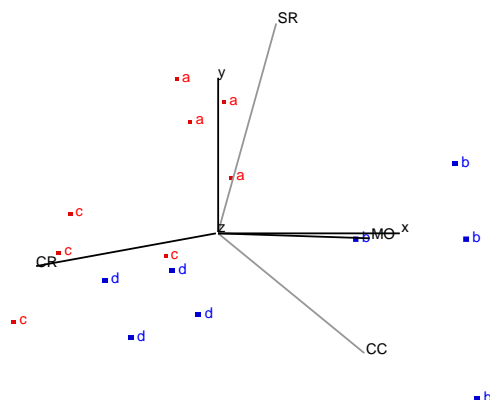


Figura 3.3 - Representação gráfica do plano principal dos níveis de tratamentos (mês de colheita de estacas e temperatura de substrato) e das variáveis iniciais (**CR**- % estacas com raiz; **CC**- % estacas com *callus*; **SR**- % estacas sem resposta; **MO**- % estacas mortas); a- Agosto, 25°C; b- Outubro 25°C; c- Agosto, 28°C; d- Outubro, 28°C

O segundo eixo descreve a variação de resposta das estacas para os dois meses de colheita: Agosto e Outubro. O primeiro mês é caracterizado pela oposição entre as estacas que formam raízes e as estacas que não apresentam qualquer resposta, enquanto que, para Outubro, a formação de *callus* e o número de mortes são as respostas que se contrapõem ao enraizamento.

3.2.2 - Ensaios com material retirado do parque de clones

3.2.2.1 - Ano de 1992

Os resultados dos ensaios realizados durante 1989 e 1990 mostraram a viabilidade da multiplicação de sobreiros jovens pela via da estacaria. Dos factores estudados, a temperatura aplicada no substrato durante o processo de enraizamento e o mês de colheita das estacas manifestaram-se como as fontes mais importantes de variação na resposta das estacas.

Em 1992 prosseguiram os estudos com vista a avaliar a possibilidade de multiplicação por estacaria de sobreiros pertencentes ao parque de clones previamente enxertados. Estabeleceu-se vários ensaios com o objectivo de continuar a analisar o efeito do mês de colheita na resposta das estacas e ainda estudar os efeitos da duração do enraizamento, concentração de IBA, enxertia e clone.

Em face dos resultados anteriormente obtidos (1989 e 1990) usou-se, em todos os ensaios, uma temperatura de substrato de 28°C.

3.2.2.1.1 - Mês de colheita das estacas

Mensalmente, desde Maio a Outubro, foram estabelecidos ensaios com o objectivo de analisar o efeito do mês de colheita na resposta das estacas. Na Tabela

3.12 encontram-se os valores médios mensais para cada uma das variáveis **CR**, **CC**, **SR** e **MO**.

Tabela 3.12 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos nos diferentes meses de colheita de estacas, para as percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO)

Mês de colheita de estacas	CR (%)	CC (%)	SR (%)	MO (%)
Maio	10,95 (± 1,52)	20,24 (± 1,96)	49,76 (± 2,44)	19,05 (± 1,92)
Junho	5,65 (± 0,89)	21,28 (± 1,58)	56,10 (± 1,91)	16,97 (± 1,45)
Julho	11,18 (± 1,07)	24,54 (± 1,46)	49,77 (± 1,70)	14,52 (± 1,20)
Agosto	19,20 (± 0,93)	30,64 (± 1,09)	43,58 (± 1,17)	6,58 (± 0,59)
Setembro	8,79 (± 0,76)	12,57 (± 0,89)	58,82 (± 1,32)	19,68 (± 1,06)
Outubro	9,03 (± 0,76)	16,46 (± 0,98)	51,64 (± 1,32)	22,57 (± 1,11)

Os resultados da ANOVA a um factor mostraram a existência de diferenças altamente significativas ($p \leq 0,001$) para todas as variáveis transformadas **CRt**, **CCt**, **SRt** e **MOt** (Tabela 3.13).

Tabela 3.13 - ANOVA a um factor para o efeito do mês de colheita das estacas nas variáveis transformadas das percentagens de estacas com raiz (CRt), com *callus* (CCt) sem resposta (SRt) e mortas (MOt)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
CRt				
Mês de colheita	5	5686,96	1137,39	15,35 ***
Resíduo	229	16964,73	74,08	
CCt				
Mês de colheita	5	6604,05	1320,81	15,03 ***
Resíduo	229	20129,23	87,90	
SRt				
Mês de colheita	5	2650,85	530,17	4,18 ***
Resíduo	229	28777,88	126,78	
MOt				
Mês de colheita	5	7842,83	1568,57	7,23 ***
Resíduo	229	49243,51	216,93	

(1)- Níveis de significância para a variável de Fisher: ***- altamente significativo ($p \leq 0,001$)

O teste de comparação de médias aplicado ao factor mês de colheita das estacas indicou Agosto como o mês que induziu a maior quantidade de estacas com raízes e com *callus*, menor mortalidade e menor percentagem de estacas sem resposta. Em contrapartida, o mês de Setembro correspondeu à época de colheita em que se obteve o número mais elevado de estacas mortas e de estacas sem resposta em

oposição a uma produção de raízes e de *callus* mais baixa (Tabela 3.14; variáveis retransformadas).

Tabela 3.14 - Efeito da época de colheita das estacas nas percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD 0,05)

Mês de colheita de estacas	CR(%)	CC(%)	SR(%)	MO(%)
Maio	9,30 b	17,54 bc	49,82 abc	13,59 ab
Junho	3,53 d	19,21 bc	56,55 ab	11,98 b
Julho	8,87 bc	23,05 b	49,56 bc	9,01 b
Agosto	18,41 a	26,61 a	43,35 c	3,27 c
Setembro	6,30 cd	10,65 d	59,32 a	17,69 a
Outubro	7,12 bc	14,01 cd	51,96 ab	16,52 ab

3.2.2.1.2 - Duração do enraizamento

Analisou-se o efeito de cinco períodos (de um a cinco meses) de permanência em bancada de enraizamento na resposta das estacas (Anexo IV). Na Tabela 3.15 apresentam-se os valores médios e respectivos desvios padrões para as percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO) obtidas ao fim de um, dois, três, quatro e cinco meses de permanência em bancada de enraizamento.

Tabela 3.15 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as diferentes durações do ensaio nas percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO)

Duração do ensaio	CR(%)	CC(%)	SR(%)	MO(%)
Um mês	4,85 (\pm 1,08)	22,19 (\pm 2,10)	70,92 (\pm 2,29)	2,04 (\pm 0,71)
Dois meses	11,95 (\pm 1,20)	24,45 (\pm 1,59)	47,53 (\pm 1,85)	16,07 (\pm 1,36)
Três meses	11,48 (\pm 0,50)	23,23 (\pm 0,66)	52,11 (\pm 0,79)	13,05 (\pm 0,53)
Quatro meses	18,89 (\pm 1,33)	18,09 (\pm 1,31)	47,62 (\pm 1,72)	14,52 (\pm 1,22)
Cinco meses	7,71 (\pm 1,16)	6,77 (\pm 1,09)	38,35 (\pm 2,11)	47,18 (\pm 2,16)

Os resultados da ANOVA a um factor indicam a existência de diferenças altamente significativas ($p \leq 0,001$) em todas as variáveis de resposta transformadas

CRt, **CCt**, **SRT** e **MOT** relativamente à duração do enraizamento (Tabela 3.16).

Tabela 3.16 - ANOVA a um factor para as variáveis transformadas percentagem de estacas com raiz (CRt), com *callus* (CCt), sem resposta (SRT) e mortas (MOT) relativamente à duração do ensaio

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
CRt				

Duração	4	2379,58	594,89	6,75 ***
Resíduo	230	20272,12	88,14	
CCt				
Duração	4	4063,90	1015,97	10,31 ***
Resíduo	230	22669,39	98,56	
SRt				
Duração	4	3585,14	898,28	7,34 ***
Resíduo	230	27843,59	122,12	
MOT				
Duração	4	15788,87	3947,22	21,79 ***
Resíduo	230	41297,47	181,13	

(1)- Níveis de significância para a variável de Fisher: ***- altamente significativo (p≤0,001)

Relativamente à variável **CR**, constatou-se que a permanência das estacas em bancada de enraizamento por quatro meses conduziu aos valores mais elevados (16,45%) e significativamente diferentes das restantes modalidades (Tabela 3.17). As percentagens mais baixas de enraizamento foram obtidas nas estacas que se mantiveram durante um e cinco meses em bancada. O baixo valor alcançado ao fim de um mês de ensaio pode ser explicado pelo desigual desenvolvimento dos primórdios radiculares nas diferentes estacas. Por outro lado, a manutenção das estacas em bancada por um período superior a quatro meses parece ser prejudicial para a sua sobrevivência, verificando-se que o acréscimo de um mês aumentou o número de estacas mortas (**MO**).

Tabela 3.17 - Efeito da duração do ensaio nas percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para um nível de significância de 5% (Fisher LSD_{0,05})

Duração do ensaio	CR(%)	CC(%)	SR(%)	MO(%)
Um mês	2,61 c	21,35 a	71,80 a	2,61 c
Dois meses	10,33 b	22,50 a	47,35 bc	11,93 b
Três meses	9,23 b	21,20 a	52,35 b	8,72 b
Quatro meses	16,45 a	16,20 a	47,50 bc	11,47 b
Cinco meses	6,48 bc	4,70 b	36,62 c	47,33 a

Já no que respeita à variável **CC** não se verificaram diferenças significativas entre um, dois, três e quatro meses na bancada. No entanto, cinco meses após o estabelecimento do ensaio este valor torna-se significativamente inferior, possivelmente devido ao aumento da mortalidade. Estes resultados indicam ainda que, ao fim de um mês de estabelecido o ensaio, se encontra definido o número de estacas que formam *callus*.

3.2.2.1.3 - Enxertia e mês de colheita de estacas

Compararam-se as respostas de estacas, provenientes de sobreiros jovens e de enxertados, em quatro épocas de colheita: Julho, Agosto, Setembro e Outubro. Os resultados (parte dos ensaios nº1 e 2 e ensaio nº3/92) encontram-se no Anexo IV. Na Tabela 3.18 apresentam-se os valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para **CR**, **CC**, **SR** e **MO** relativamente aos dois factores estudados: enxertia e mês de colheita das estacas.

Tabela 3.18 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO), relativamente ao efeito da enxertia e do mês de colheita de estacas

Mês de colheita de estacas	Plantas-mães jovens				Plantas-mães enxertadas			
	CR(%)	CC(%)	SR(%)	MO(%)	CR(%)	CC(%)	SR(%)	MO(%)
Julho	14,88 (± 1,94)	15,18 (± 1,76)	43,75 (± 2,71)	26,19 (± 2,40)	8,83 (± 1,23)	30,45 (± 1,99)	53,57 (± 2,16)	7,14 (± 1,11)
Agosto	19,34 (± 2,15)	16,96 (± 2,05)	42,26 (± 2,64)	21,43 (± 2,24)	19,16 (± 1,03)	33,79 (± 1,23)	43,89 (± 1,30)	3,16 (± 0,46)
Setembro	15,18 (± 1,96)	12,20 (± 1,79)	52,68 (± 2,72)	19,94 (± 2,18)	6,77 (± 0,77)	12,69 (± 1,02)	60,81 (± 1,50)	19,60 (± 1,22)
Outubro	8,44 (± 1,58)	9,42 (± 1,66)	40,71 (± 2,80)	40,71 (± 2,80)	9,20 (± 0,86)	18,39 (± 1,16)	54,37 (± 1,49)	18,04 (± 1,15)

Os resultados da ANOVA a um factor (Tabela 3.19) indicam, para o efeito da enxertia diferenças altamente significativas ($p \leq 0,001$) nas variáveis transformadas **CCt**, **SRt** e **MOt** e muito significativas ($p \leq 0,01$) para **CRt**. Relativamente ao mês de colheita das estacas constituem-se diferenças altamente significativas para **CRt**, **CCt** e **MOt** e apenas significativas ($p \leq 0,05$) para **SRt**. Em relação à interacção entre os dois factores, apenas para a variável **SRt** os resultados indicaram não existir evidência para a rejeição da hipótese de igualdade de tratamentos (H_0).

Tabela 3.19 - ANOVA a dois factores para as variáveis transformadas, percentagens de estacas com raiz (CRt), com *callus* (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (MOt), relativamente ao efeito da enxertia e do mês de colheita de estacas

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
CRt				
Enxertia	1	541,47	541,47	7,86 **
Mês de colheita	3	2223,76	741,26	10,78 ***
Enxertia * Mês de colheita	3	659,98	219,99	3,20 *

Residuo	188	12925,85	68,76	
CCt				
Enxertia	1	2105,88	2105,88	30,04 ***
Mês de colheita	3	3119,23	1039,74	14,83 ***
Enxertia * Mês de colheita	3	825,50	275,17	3,92 **
Residuo	188	13179,13	70,10	
SRt				
Enxertia	1	906,35	906,35	7,30 ***
Mês de colheita	3	1325,57	441,86	3,56 *
Enxertia * Mês de colheita	3	289,55	96,52	0,78 n.s.
Residuo	188	23102,22	124,20	
Mot				
Enxertia	1	5439,86	5439,86	31,10 ***
Mês de colheita	3	3369,63	1123,21	6,42 ***
Enxertia * Mês de colheita	3	1817,72	605,91	3,46 *
Residuo	188	32533,63	174,91	

(1) - Níveis de significância para a variável de Fisher: **n.s.**- não significativo ($p > 0,05$); *- significativo ($p \leq 0,05$); **- muito significativo ($p \leq 0,01$); ***- altamente significativo ($p \leq 0,001$)

O teste de comparação de média de Fisher $LSD_{0,05}$ aplicado ao efeito da enxertia indicou que as estacas retiradas de plantas jovens produziram mais raízes e menos *callus*, mas também tiveram maior mortalidade (Tabela 3.20).

Tabela 3.20 - Efeito da enxertia nas percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para um nível de significância de 5% (Fisher $LSD_{0,05}$)

Idade da planta-mãe	CR(%)	CC(%)	SR(%)	MO(%)
Planta jovem	12,98 a	12,48 b	44,65 b	22,66 b
Planta enxertada	9,57 b	21,81 a	52,48 a	7,42 a

Na Tabela 3.21 apresenta-se o teste de comparação de médias de Fisher $LSD_{0,05}$ aplicado ao mês de colheita de estacas. Tal como se tinha verificado anteriormente (3.2.2.1.1) Agosto correspondeu ao mês com a percentagem mais elevada de estacas com raiz e menor percentagem de estacas com *callus*, sem resposta e mortas.

Tabela 3.21 - Efeito do mês de colheita de estacas nas percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para um nível de significância de 5% (Fisher $LSD_{0,05}$)

Mês de colheita de estacas	CR(%)	CC(%)	SR(%)	MO(%)
Julho	11,78 b	24,54 b	49,77 b	14,52 b
Agosto	19,20 a	30,64 a	43,58 b	6,59 c
Setembro	8,79 b	12,57 c	58,82 a	19,68 a
Outubro	9,03 b	16,46 c	51,64 a	22,57 a

O padrão de resposta observado para o efeito da enxertia na capacidade de enraizamento é, no entanto, influenciado pelo mês de colheita de estacas. Assim, em Agosto houve uma influência positiva no enraizamento das estacas retiradas das plantas enxertadas e em Setembro observou-se uma diminuição bastante significativa na sua produção de *callus*. Provavelmente, esta diminuição está relacionada com o aumento observado na mortalidade das estacas observada neste mês (Fig. 3.4).

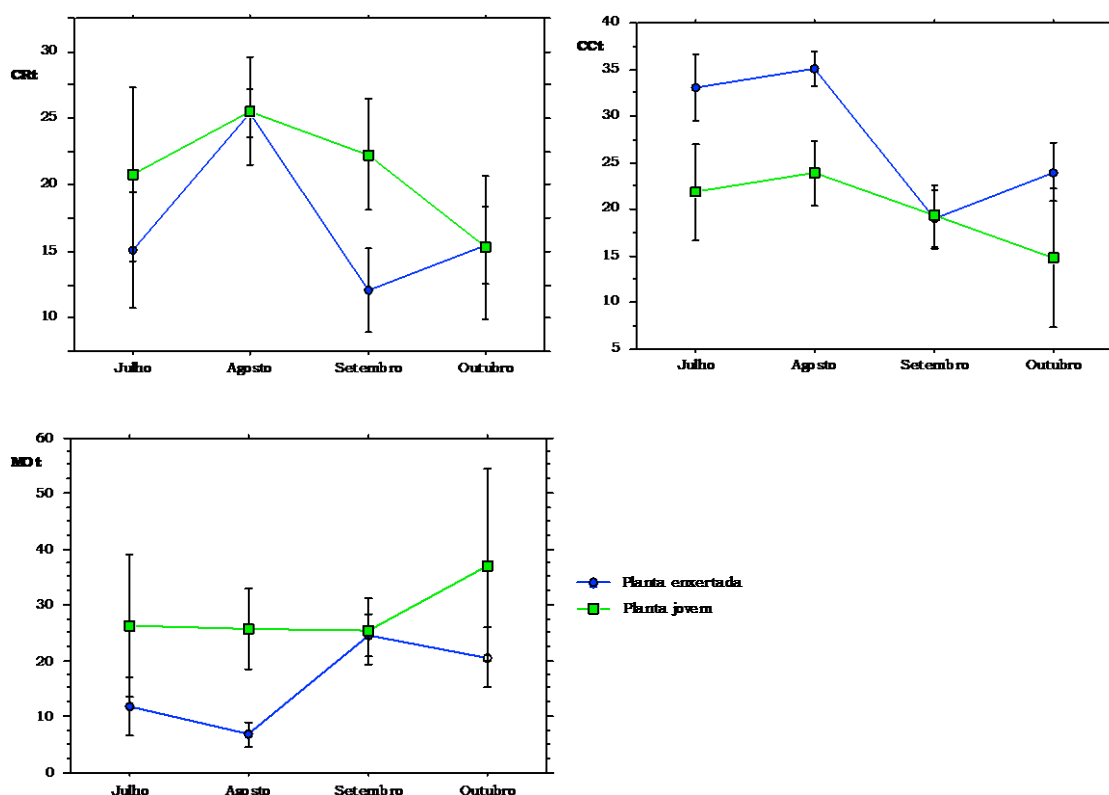


Figura 3.4 - Efeito da interacção dos factores mês de colheita das estacas e idade da planta-mãe nas variáveis transformadas CRT, CCt e MOt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%

3.2.2.1.4 - Concentração de IBA e mês de colheita de estacas

Analisou-se o efeito, no enraizamento da aplicação de cinco concentrações de IBA: 0; 0,5; 1; 2 e 4% em três épocas de colheita de estacas: Junho, Agosto e Outubro (ensaio nº2/92). Os resultados encontram-se no Anexo IV. Na Tabela 3.22 apresenta-se as percentagens médias de enraizamento e os respectivos desvios padrões obtidos para as diferentes modalidades estudadas.

Tabela 3.22 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO), relativamente aos efeitos da concentração de IBA e do mês de colheita das estacas

IBA (%)	Junho				Agosto				Outubro			
	CR	CC	SR	MO	CR	CC	SR	MO	CR	CC	SR	MO
0	4,76 (±2,32)	16,67 (±4,07)	63,10 (±5,26)	15,48 (±3,95)	9,82 (±2,81)	26,78 (±4,18)	63,40 (±4,55)	0,00 (±0,00)	2,68 (±1,53)	7,14 (±2,43)	87,50 (±3,12)	2,68 (±1,53)
0,5	9,52 (±3,20)	28,57 (±4,93)	52,38 (±5,45)	9,52 (±3,20)	17,86 (±3,62)	45,54 (±4,71)	34,82 (±4,50)	1,79 (±1,25)	6,25 (±2,29)	13,39 (±3,22)	73,22 (±4,18)	7,14 (±2,43)
1	10,72 (±2,39)	21,43 (±3,17)	50,60 (±3,86)	17,26 (±2,92)	20,31 (±1,90)	32,14 (±2,21)	43,30 (±2,34)	4,24 (±0,95)	12,50 (±1,56)	20,09 (±1,89)	42,86 (±2,34)	24,55 (±2,03)
2	7,14 (±2,80)	15,48 (±3,95)	60,71 (±5,33)	16,67 (±4,07)	20,54 (±2,70)	38,84 (±3,26)	38,90 (±3,26)	2,24 (±0,99)	5,36 (±2,13)	37,50 (±4,57)	52,68 (±4,72)	4,47 (±1,95)
4	0,00 (±0,00)	13,09 (±3,68)	40,47 (±5,36)	46,43 (±5,44)	14,28 (±3,31)	33,04 (±4,44)	48,22 (±4,72)	4,47 (±1,95)	8,03 (±2,57)	25,00 (±4,09)	62,50 (±4,57)	4,47 (±1,95)

A ANOVA a dois factores aplicada aos resultados (Tabela 3.23) indica existirem diferenças altamente significativas ($p \leq 0,001$) para a concentração de IBA relativamente a **CRt** e **SRt** e para o mês de colheita das estacas em todas as variáveis estudadas. No primeiro factor, observaram-se diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para **CCt**. A interacção dos dois factores surge altamente significativa para **CCt** e significativa para **SRt**. Não existe evidência para rejeitar a hipótese nula (H_0) no efeito da concentração de IBA sobre **Mot**, nem no efeito da interacção concentração de IBA* mês de colheita das estacas sobre **CRt** e **Mot**.

Tabela 3.23 - ANOVA a dois factores para as variáveis transformadas, percentagens de estacas com raiz (CRt), com *callus* (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (MOT), relativamente aos efeitos da concentração de IBA e do mês de colheita de estacas

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
CRt				
Concentração de IBA	4	1197,75	299,44	6,02 ***
Mês de colheita	2	1859,43	929,72	18,69 ***
IBA* Mês de colheita	8	580,13	72,52	1,46 n.s.
Resíduo	71	3532,16	49,75	
CCt				
Concentração de IBA	4	733,59	183,40	3,26 *
Mês de colheita	2	1969,26	984,63	17,52 ***

IBA* Mês de colheita	8	1283,38	160,42	2,85 ***
Resíduo	71	3990,57	56,20	
SRt				
Concentração de IBA	4	2389,08	597,27	6,00 ***
Mês de colheita	2	1716,72	858,36	8,62 ***
IBA* Mês de colheita	8	2021,60	252,70	2,54 *
Resíduo	71	7071,73	99,60	
MOT				
Concentração de IBA	4	1200,70	300,18	1,80 n. s.
Mês de colheita	2	3388,77	1694,39	10,16 ***
IBA* Mês de colheita	8	1937,43	242,18	1,45 n. s.
Resíduo	71	11845,00	166,83	

(1)- Níveis de significância para a variável de Fisher: **n.s.**- não significativo ($p > 0,05$); *- significativo ($p \leq 0,05$); ***- altamente significativo ($p \leq 0,001$)

O teste de comparação das médias (Fisher $LSD_{0,05}$) para a concentração de IBA aplicada nas variáveis que se apresentaram significativas (**CRt**, **Cct** e **SRt**) indicou que a percentagem de enraizamento mais elevada corresponde a aplicação de IBA numa concentração de 1%, embora este valor não fosse significativamente diferente dos obtidos com as aplicações de 2% e 0,5% (Tabela 3.24). Já no que respeita à produção de *callus* observou-se que a maior quantidade de estacas com estas formações foi obtida para uma concentração de 2%. A não aplicação de auxina na base das estacas conduziu às mais baixas percentagens de estacas enraizadas, com *callus* e mortas e simultaneamente, às mais elevadas percentagens de estacas sem resposta.

Tabela 3.24 - Efeito da concentração de IBA nas percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher $LSD_{0,05}$)

Concentração de IBA aplicada (%)	CR (%)	CC (%)	SR (%)	MO (%)
0	3,93 c	14,60 c	74,91 a	1,73 b
0,5	9,72 a	27,78 ab	53,80 b	4,34 ab
1	14,01 ab	24,14 b	43,67 b	8,66 a
2	12,66 a	32,02 a	46,55 b	3,12 ab
4	4,77 bc	22,00 bc	51,30 b	10,42 a

O efeito da interação entre o mês de colheita e a concentração de IBA, relativamente à percentagem de estacas com *callus* e sem resposta, pode ser observado

na Fig. 3.5. A aplicação de IBA em concentrações superiores a 1% provocou, no mês de Outubro, um aumento da resposta das estacas, o qual se traduziu num aumento do número de estacas que produziram *callus*.

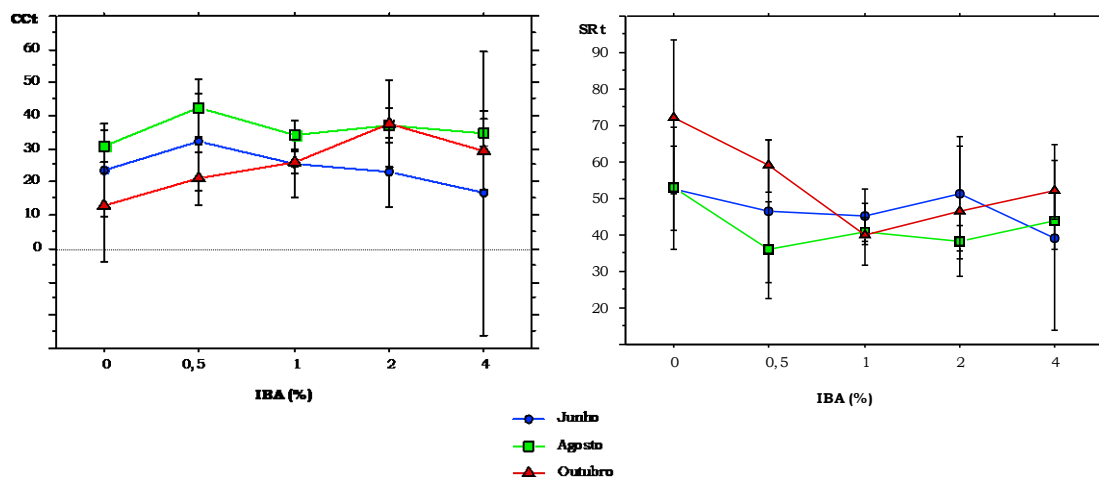


Figura 3.5 - Efeito da interacção da concentração de IBA com o mês de colheita das estacas para as variáveis transformadas CCT e SRt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%

3.2.2.1.5 - Clone

A percentagem de enraizamento para cada um dos clones foi avaliada em função do mês de colheita das estacas, da duração do ensaio e da concentração de IBA. Na Tabela 3.25 indicam-se as percentagens de estacas com raiz (CR) obtidas para os oito clones, em cada nível de tratamento.

Tabela 3.25 - Percentagem de estacas com raiz (CR), para cada clone em diferentes níveis de tratamento.

Mês de colheita	Duração (meses)	IBA (%)	Percentagem de estacas enraizadas para cada clone							
			7/8A-10	7/8A-20	8/6-4	8/6-6	8/6-19	8/6-y	8/7-3	8/7-6
Julho	3	1	0,0	6,5	16,6	-	11,5	14,3	0,0	66,7
Agosto	2	1	0,0	25,0	21,0	0,0	9,5	0,0	50,0	11,1
Agosto	2	2	12,5	28,6	33,3	12,5	4,5	0,0	25,0	10,0
Agosto	3	0	6,9	-	33,3	11,1	-	4,2	9,4	-
Agosto	3	0,5	0,0	35,3	25,0	0,0	8,3	11,1	-	12,8
Agosto	3	1	-	13,3	28,6	4,8	9,1	-	-	23,5
Agosto	3	2	9,1	16,7	33,3	14,3	25,0	33,3	16,7	8,3
Agosto	3	2	14,1	31,6	20,0	6,2	33,3	25,0	-	20,0
Agosto	3	4	9,7	19,0	15,0	-	-	6,7	-	16,7
Agosto	4	1	0,0	23,1	35,0	0,0	10,0	20,0	-	20,0
Agosto	4	2	20,0	62,5	54,2	18,8	0,0	25,0	37,5	32,1
Setembro	3	1	15,4	6,2	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7
Setembro	3	1	0,0	18,2	16,7	9,1	6,6	0,0	7,7	8,3

Setembro	4	1	16,7	26,3	30,0	0,0	22,2	50,0	7,7	23,1
Setembro	5	1	22,2	25,0	16,7	-	0,0	37,5	14,3	0,0
Outubro	3	1	0,0	17,2	0,0	28,6	14,3	9,0	3,8	9,7
Outubro	4	1	33,3	13,3	-	-	23,1	15,8	8,3	9,7
Outubro	5	1	-	9,5	-	-	8,3	12,5	0,0	2,9

O efeito do clone na capacidade de enraizamento é altamente significativo ($p \leq 0,001$), como se constata na Tabela 3.26, que apresenta os resultados da ANOVA de Medições Repetidas.

Tabela 3.26 - ANOVA de Medições Repetidas para o efeito do clone na variável transformada, percentagem de estacas com raiz (CRT)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
Entre tratamentos	18	4279,63	237,76	1,81*
Dentro dos tratamentos	133	17515,11	131,69	
Clones	7	4634,44	662,06	6,48**
Residuo	126	12880,68	102,23	
Total	151	21794,74		

(1) - Níveis de significância para a variável de Fisher: *- significativo ($p \leq 0,05$); **- muito significativo ($p \leq 0,01$)

Comparados os valores médios de enraizamento obtidos para cada clone (Tabela 3.27), pelo método de comparações múltiplas $LSD_{0,05}$, pode observar-se que os clones 8/6-4 e 7/8A-20 se destacam pela maior capacidade de enraizamento. Por sua vez, os clones 8/6-6 e 7/8A-10 são os que apresentam as percentagens médias mais baixas de estacas com raízes.

Tabela 3.27 - Capacidade média de enraizamento dos clones pertencentes à fase I do parque de clones. Os valores (retransformados) apresentados com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si para um nível de significância de 5% (Fisher $LSD_{0,05}$)

Clones	CR (%)
8/6-4	22,00 a
7/8A-20	21,19 ab
8/7-6	15,35 bc
8/6-y	12,39 c
8/7-3	10,89 cd
8/6-19	9,70 cd
7/8A-10	5,96 de
8/6-6	3,73 e

3.2.2.1.6 - Análise geral do comportamento das estacas

Com vista a analisar conjuntamente a variabilidade de comportamento das estacas encontrada nos ensaios realizados no ano de 1992 recorreu-se a uma ACP.

Na Tabela 3.28 apresentam-se, para cada nível de tratamento, os valores médios obtidos para as variáveis: percentagem de estacas com raiz (**CR**), percentagem de estacas com *callus* (**CC**), percentagem de estacas sem raiz (**SR**) e percentagem de estacas com mortas (**MO**).

Tabela 3.28 - Valores médios das variáveis de resposta das estacas para os diferentes tratamentos analisados

Tratamento	Ensaio nº	Idade	Duração	Mês de Colheita	IBA	CR	CC	SE	MO
1	2	Rejuv	3	Junho	0	4,76	16,66	63,09	15,47
2	"	"	"	"	0,5	9,52	28,57	52,38	9,52
3	"	"	"	"	1	7,14	20,23	44,04	28,57
4	"	"	"	"	2	7,14	15,47	60,71	16,67
5	"	"	"	"	4	0	13,09	40,47	46,43
6	"	"	"	Agosto	0	9,82	26,78	63,39	0
7	"	"	"	"	0,5	17,86	45,43	34,82	1,78
8	"	"	"	"	1	16,96	46,42	32,14	4,46
9	"	"	"	"	2	21,43	37,49	39,27	1,80
10	"	"	"	"	4	14,28	33,03	48,21	4,46
11	"	"	"	Outubro	0	2,68	7,14	87,50	2,68
12	"	"	"	"	0,5	6,25	13,39	73,21	7,14
13	"	"	"	"	1	3,57	22,32	71,42	2,68
14	"	"	"	"	2	5,36	37,49	52,68	4,47
15	"	"	"	"	4	8,03	24,99	62,50	4,47
16	3	"	"	Maio	1	12,49	24,40	37,50	25,59
17	"	"	"	Julho	"	6,12	27,55	59,18	7,14
18	"	"	"	Setembro	"	6,12	26,53	57,14	10,20
19	4	"	"	Agosto	"	23,66	26,34	47,76	2,23
20	"	"	"	Setembro	"	4,01	5,80	71,42	18,75
21	"	"	"	Outubro	"	16,96	16,51	20,09	46,43
22	1	"	1	Maio	"	4,76	19,05	76,19	0
23	"	"	2	"	"	10,71	9,52	67,85	11,90
24	"	"	3	"	"	14,28	23,81	29,76	32,14
25	"	"	1	Junho	"	0	16,67	83,33	0
26	"	"	2	"	"	2,38	36,90	47,62	13,09
27	"	"	3	"	"	14,28	22,62	57,14	5,95

Tabela 3.28 – (Continuação)

Tratamento	Ensaio nº	Idade	Duração	Mês de Colheita	IBA	CR	CC	SE	MO
28	"	"	1	Julho	"	5,36	36,60	58,03	0
29	"	"	2	"	"	12,49	36,60	43,74	7,14
30	1	Rejuv	3	Julho	1	13,39	23,21	49,10	14,28
31	"	"	2	Agosto	"	13,39	29,46	55,35	1,78
32	"	"	3	"	"	16,96	29,46	45,53	8,03
33	"	"	4	"	"	18,75	27,68	47,32	6,25
34	"	"	3	Setembro	"	6,25	13,39	73,21	7,14
35	"	"	4	"	"	21,43	13,39	57,14	8,03
36	"	"	5	"	"	14,28	13,09	38,09	34,52
37	"	"	3	Outubro	"	12,5	25	59,82	2,68
38	"	"	4	"	"	13,39	14,28	50	22,32
39	"	"	5	"	"	6,25	6,25	46,42	41,07
40	5	jovem	1	Julho	"	8,03	14,28	70,53	7,14
41	"	"	2	"	"	10,71	5,36	31,25	52,67
42	"	"	3	"	"	25,89	25,89	29,46	18,74
43	"	"	2	Agosto	"	12,5	16,07	50,89	20,53
44	"	"	3	"	"	16,96	12,50	37,49	33,03
45	"	"	4	"	"	28,57	22,32	38,39	10,71
46	"	"	3	Setembro	"	10,71	16,07	65,18	8,03
47	"	"	4	"	"	23,21	9,82	47,32	19,64
48	"	"	5	"	"	11,6	10,71	45,53	32,14
49	"	"	3	Outubro	"	14,28	14,28	64,28	7,14

50	"	"	4	"	"	8,92	17,86	37,50	35,71
51	6	Rejuv	3	Agosto	2	19,64	40,18	37,50	2,68
52	"	"	2	"	"	18,75	36,61	41,07	3,57
53	"	"	4	"	"	33,92	33,92	30,35	1,78
53	"	"	3	Setembro	"	9,37	18,30	57,58	14,73
55	"	"	4	"	"	1,79	8,03	67,85	22,32
56	"	"	5	"	"	4,46	4,46	42,85	48,21

A análise da matriz das correlações entre as diferentes variáveis de resposta (Tabela 3.29) mostra que **CR** está directamente correlacionada ($p \leq 0,05$) com a variável **CC** e inversamente correlacionada ($p \leq 0,001$) com **SR**. Não se verificou a existência de correlação significativa entre **CR** e **MO**. Esta última variável está inversa e altamente correlacionada tanto com **CC** como com **SR**. Os resultados indicam que a diminuição do número de estacas sem resposta é acompanhado do aumento da percentagem das estacas com raiz. A correlação inversa observada entre as variáveis **CC** e **MO** sugere que, a formação do tecido caloso contribui para a sobrevivência da estaca após o destacamento da planta-mãe.

Tabela 3.29 - Matriz de correlação entre as variáveis de resposta das estacas obtidas para os diferentes níveis de tratamentos

Variável	CR	CC	SR	MO
CR	1,000			
CC	0,3411 *	1,000		
SR	-0,6010 ***	-0,3409 *	1,000	
MO	-0,1450 n. s.	-0,5702 ***	-0,4772 ***	1,000

$n=56$; $g=n-2=5$ $P_{0,05}=0,2227$ $P_{0,01}=0,3423$ $P_{0,001}=0,4291$

Os valores próprios obtidos na ACP assim como, a proporção da variabilidade explicada por cada componente encontram-se indicados na Tabela 3.30. O primeiro e o segundo eixo explicam respectivamente 47,02 e 39,63% da variabilidade existente. Em virtude da existência de uma relação linear entre as variáveis iniciais, tal como já se tinha constatado para as estacas recolhidas nas plantas jovens, o quarto eixo é nulo. No conjunto, os dois primeiros eixos justificam 86,65% da variabilidade total, podendo ser explicado no plano de projecção formado pelas duas componentes principais (Fig. 3.6).

Tabela 3.30 - Valores próprios das diferentes componentes e percentagem da variação total explicada.

Eixo	Valores próprios	Variabilidade explicada (%)	Percentagem acumulada (%)
1	1,881	47,020	47,020
2	1,585	39,630	86,649
3	0,534	13,351	100,000
4	0,000	0,000	

As contribuições de cada uma das variáveis iniciais para a formação das componentes principais encontram-se representadas na Tabela 3.31. As variáveis mais importantes na construção da primeira componente são **CR**, **CC** e **SR**, encontrando-se as duas primeiras em oposição a **SR**. A segunda componente traduz essencialmente a oposição entre **SR** e **MO**. Assim, o primeiro eixo representa essencialmente as estacas sobreviventes, enquanto que o segundo eixo representa as estacas que não apresentaram reacção positiva ou que morreram.

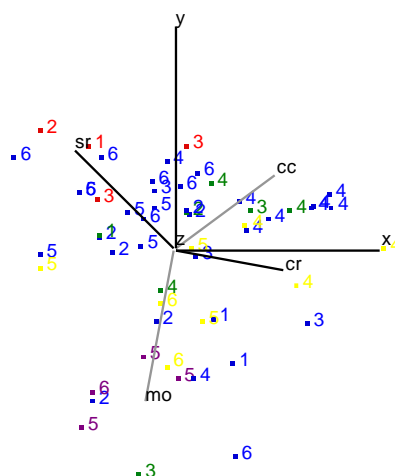


Figura 3.6 - Representação gráfica do plano principal dos níveis de tratamentos e das variáveis iniciais: **CR**- % de estacas com raiz; **CC**- % de estacas com *callus*; **SR**- % de estacas sem resposta e **MO**- % de estacas mortas. Época de colheita de estacas: 1- Maio; 2- Junho; 3- Julho; 4- Agosto; 5- Setembro; 6- Outubro; Duração do ensaio: Um mês; Dois meses; Três meses; Quatro meses; Cinco meses.

No seguimento deste estudo aplicou-se o método de classificação hierárquico com o objectivo de estabelecer grupos de tratamentos que correspondam a respostas semelhantes.

Tabela 3.31 - Contribuição das variáveis iniciais para a formação dos dois primeiros eixos principais

Variável	Coeficiente das componentes principais	
	Eixo 1	Eixo 2
CR	0,6110	-0,1068
CC	0,5534	0,3859
SR	-0,5414	0,5072
MO	-0,1655	-0,7632

A Fig. 3.7 representa o dendrograma obtido usando respectivamente como medida de semelhanças entre os indivíduos e subgrupos, os métodos da distância euclidiana e o do "vizinho mais próximo" ("complete linkage"). O corte do dendrograma situou-se entre os níveis de fusão 14,94 e 17,90. Este conduziu a uma classificação

dos níveis de tratamento em quatro classes caracterizadas pelos valores médios (\bar{X}) e respectivos desvios padrões (s) das variáveis **CR**, **CC**, **SR** e **MO**, apresentados na Tabela, 3.32.

Tabela 3.32 - Caracterização das quatro classes, obtidas pelo método de classificação hierárquica, relativamente às variáveis CR, CC, SR e MO

Classe	Níveis de tratamento	CR		CC		SR		MO	
		\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s
1	11, 12, 13, 22, 25, 34, 40	4,51	2,68	15,17	4,84	76,48	6,46	3,82	3,29
2	1, 2, 4, 6, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 23, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 38, 43, 46, 47, 49, 54, 55	11,41	5,89	21,15	8,59	57,33	7,19	10,10	6,94
3	7, 8, 9, 10, 26, 29, 42, 45, 51, 52, 53	19,29	8,45	35,93	7,24	38,42	6,44	6,38	5,56
4	3, 5, 16, 21, 24, 36, 39, 41, 44, 48, 50, 56	10,11	5,51	14,32	6,38	39,67	11,53	35,89	9,11

A classe 1 agrupa os tratamentos cujas respostas apresentam simultaneamente elevada **SR** e baixas **CR** e **MO**. Incluem-se nesta classe todos os níveis de tratamento correspondentes aos períodos de menor permanência das estacas em bancada de enraizamento (um mês) e ainda, os meses de Setembro e Outubro com uma permanência de três meses em bancada de enraizamento.

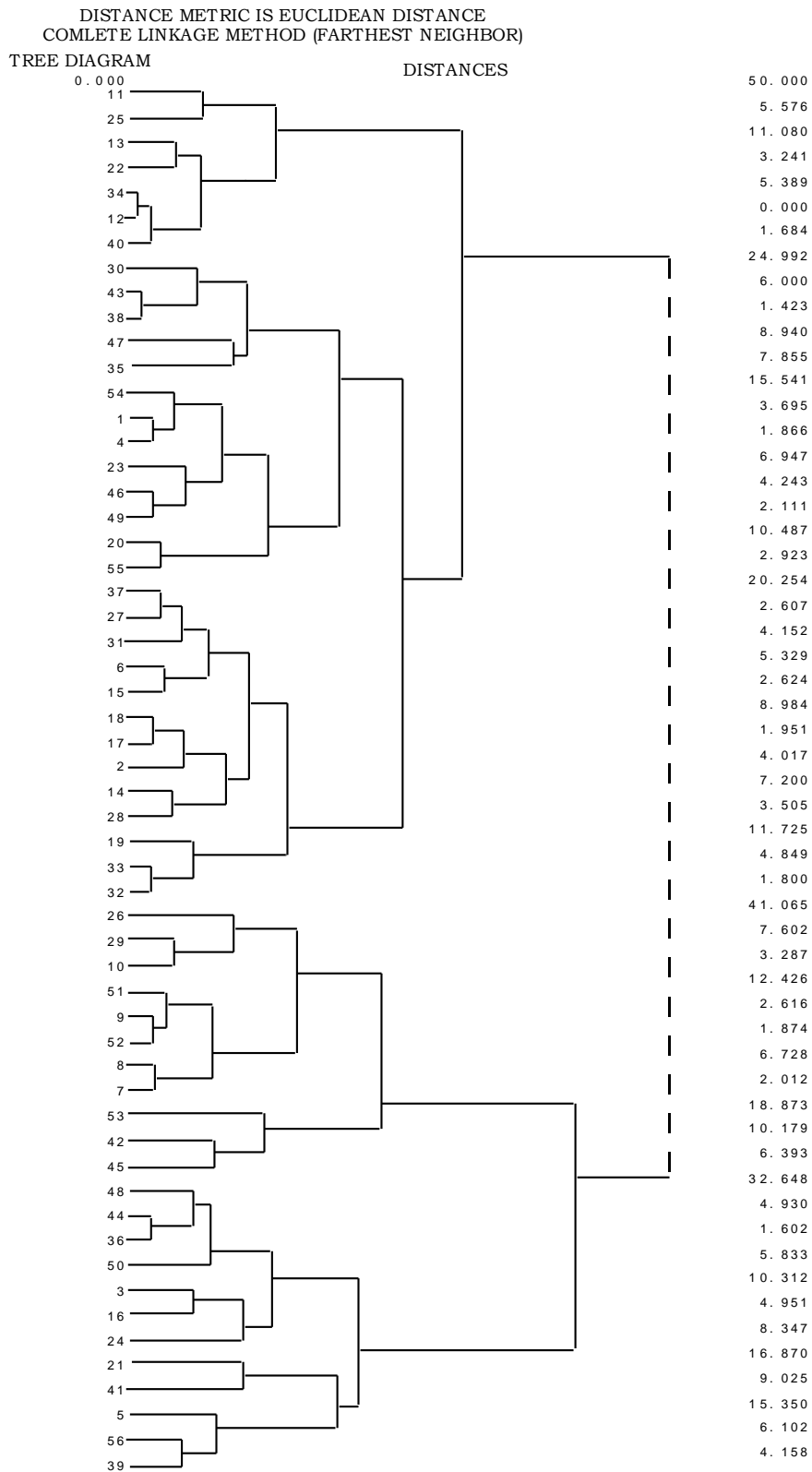


Figura 3.7 - Dendrograma dos 56 níveis de tratamentos analisados pelo método de classificação hierárquica utilizando as distâncias euclidianas e do "vizinho mais próximo"

A classe 2, considerada intermédia, reúne os tratamentos que conduziram a valores para as variáveis **CR**, **CC**, **SR** e **MO** próximos das respectivas médias globais.

A classe 3 agrega os tratamentos que contribuíram para se obter simultaneamente as maiores percentagens de enraizamento e de *callus*, mantendo reduzidas as percentagens de estacas sem resposta e mortas. Incluem-se nesta classe as modalidades Julho e Agosto cujas estacas permaneceram durante três e quatro meses na bancada de enraizamento.

Finalmente incluem-se na classe 4, os níveis de tratamento que apresentam os valores mais elevados para a variável **MO**, baixos para **CC** e **SR**, mantendo contudo, **CR** próximo dos valores médios. Assim, uma longa permanência em bancada de enraizamento (quatro e cinco meses) nos meses mais próximos do Outono parecem ser factores que contribuem para aumentar a mortalidade entre as estacas.

A análise dos dados através deste método permitiu constatar a preponderância dos factores mês de colheita das estacas e duração do ensaio para a caracterização das diferentes classes estabelecidas em função das variáveis de resposta escolhidas (**CR**, **CC**, **SR** e **MO**). Este método permitiu ainda verificar, como já atrás tinha sido referido, não existir correlação significativa ($p > 0,05$) entre as variáveis **CR** e **MO**. Valores baixos para a variável **MO** tanto aparecem associados a enraizamentos elevados (classe 3) como a baixos (classe 1).

3.2.2.2 - ANO DE 1993

Os ensaios realizados durante o ano de 1992 permitiram retirar mais informações relativamente ao processo de formação de raízes em estacas. Confirmou-se a importância da época de colheita das estacas para o seu enraizamento. A identificação dos clones no material vegetal utilizado nos ensaios permitiu constatar que o clone pode contribuir fortemente para explicar a variabilidade na resposta ao enraizamento. Verificou-se ainda que o período de permanência das estacas na bancada de enraizamento tem também um efeito marcante no processo de formação de raízes.

Estes resultados contribuíram para a reformulação dos ensaios realizados em 1993. Continuou-se a averiguar o factor mês de colheita de estacas como determinante do processo de enraizamento. Analisaram-se também as respostas das estacas aos factores: ano de enxertia das plantas-mães, clone, intensidade de poda aplicada nos rametos e concentração de IBA.

Em face dos resultados do ano anterior, decidiu-se considerar o período de quatro meses como a duração do ensaio em bancada de enraizamento.

3.2.2.2.1 - Ano de enxertia dos rametos

Compararam-se as respostas das estacas retiradas de rametos de diferentes anos de enxertia: 1989, 1990 e 1991 (ensaios nº1, 2, 3, 4 e 5/93). Como modalidade comparativa utilizaram-se estacas de plantas jovens (Anexo V). Na tabela 3.33 apresentam-se os valores médios de **CR**, **CC**, **SR** e **MO** e respectivos desvios padrões obtidos nas diferentes modalidades.

Tabela 3.33 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO) relativamente ao efeito do ano de enxertia dos rametos

Ano de enxertia da planta-mãe	CR (%)	CC (%)	SR (%)	MO (%)
jovens	18,33 (±1,64)	35,19 (±2,02)	35,37 (±2,02)	11,11 (±1,33)
1991	16,50 (±0,66)	39,87 (±0,87)	31,85 (±0,83)	11,79 (±0,58)
1990	15,54 (±2,06)	37,50 (±2,76)	27,46 (±2,54)	19,51 (±2,26)
1989	7,18 (±0,54)	35,54 (±0,99)	32,53 (±0,97)	24,75 (±0,90)

Com o objectivo de analisar o efeito do ano de enxertia na resposta das estacas aplicou-se uma ANOVA a um factor às variáveis **CRt**, **CCt**, **SRt** e **Mot**.

Tabela 3.34 - ANOVA a um factor para as variáveis transformadas, percentagens de estacas com raiz (CRt), com *callus* (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (Mot), relativamente ao efeito do ano de enxertia dos rametos

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
CRt				
Ano de Enxertia	3	5063,26	1687,76	12,09 ***
Resíduo	222	30996,12	139,62	
CCt				
Ano de Enxertia	3	621,05	207,02	0,96 n.s.
Resíduo	222	47802,81	215,33	
SRt				
Ano de Enxertia	3	471,28	157,09	0,85 n.s.
Resíduo	222	40880,54	184,15	
Mot				
Ano de Enxertia	3	6054,28	2018,10	9,33***
Resíduo	222	48016,21	216,29	

(1)- Níveis de significância para a variável de Fisher: **n.s.**- não significativo ($p > 0,05$); *******- altamente significativo ($p \leq 0,001$)

Como se pode observar na Tabela 3.34, os resultados indicam a existência de diferenças altamente significativas entre as diferentes modalidades para as variáveis **CRt** e **Mot**. Relativamente às variáveis **CCt** e **SRt** não existe evidência para a rejeição

da hipótese nula (H_0). Assim, nas condições testadas, o ano de enxertia do rameto influenciou apenas a capacidade de enraizamento e a mortalidade das estacas.

A aplicação do teste de significância de Fisher $LSD_{0,05}$ às variáveis **CRt** e **Mot** permitiu observar a oposição entre as modalidades ano de enxertia de 1989 e de 1991. Para as estacas retiradas de rametos enxertados em 1989 obtiveram-se simultaneamente os enraizamentos mais baixos (4,42%) e a mortalidade mais elevada (20,36%), ao contrário do atingido para o material retirado dos rametos enxertados em 1991 (Tabela 3.35). Os resultados indicam uma progressiva diminuição da capacidade de enraizamento das estacas retiradas de rametos, com o aumento da idade de enxertia. Esta diminuição é acompanhada de um acréscimo na mortalidade das estacas. Os resultados alcançados para os rametos enxertados em 1991 não se apresentaram significativamente diferentes dos obtidos para as plantas jovens.

Tabela 3.35 - Efeito do ano de enxertia dos rametos nas percentagem de estacas com raiz (CR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher $LSD_{0,05}$)

Ano de enxertia	CR (%)	MO (%)
Plantas jovens	16,00 a	8,59 bc
1991	13,76 a	7,72 c
1990	10,57 ab	14,48 abc
1989	4,42 b	20,36 a

3.2.2.2.2 - Mês de colheita de estacas e clone

O factor mês de colheita foi analisado ao longo dos cinco meses: de Junho a Outubro, em oito clones: 7/8A-10, 7/8A-20, 8/6-4, 8/6-6, 8/6-y, 8/7-3, 9/6-14 e 10/10-4 (ensaio nº1/93 e parte dos ensaios nº2, 3, 4 e 5/93), encontrando-se no Anexo V os resultados deste estudo. Na Tabela 3.36 apresentam-se os valores médios e respectivos desvios padrões das variáveis de resposta das estacas (**CR**, **CC**, **SR** e **MO**), obtidos para os oito clones nos cinco meses de colheita estudados.

Tabela 3.36 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO) relativamente aos efeitos do clone e do mês de colheita de estacas

Mês de colheita	Clones	Estacas com raiz (CR)%	Estacas com <i>callus</i> (CC)%	Estacas sem raiz (SR)%	Estacas mortas (MO)%
Junho	7/8A-10	8,76 ($\pm 1,43$)	36,43 ($\pm 2,43$)	30,22 ($\pm 2,32$)	24,59 ($\pm 2,17$)

Julho	7/8A-20	9,02 ($\pm 1,45$)	51,68 ($\pm 2,52$)	22,07 ($\pm 2,09$)	17,24 ($\pm 1,91$)
	8/6-4	16,67 ($\pm 7,04$)	50,00 ($\pm 9,44$)	25,00 ($\pm 8,18$)	8,34 ($\pm 5,22$)
	8/6-6	26,67 ($\pm 3,41$)	43,33 ($\pm 3,82$)	14,17 ($\pm 2,69$)	15,84 ($\pm 2,82$)
	8/6-y	8,34 ($\pm 2,13$)	27,50 ($\pm 3,44$)	26,94 ($\pm 3,42$)	37,22 ($\pm 3,73$)
	8/7-3	25,00 ($\pm 8,18$)	8,33 ($\pm 5,22$)	41,67 ($\pm 9,32$)	25,00 ($\pm 8,18$)
	9/6-14	11,95 ($\pm 2,50$)	23,61 ($\pm 3,28$)	38,06 ($\pm 3,75$)	26,39 ($\pm 3,40$)
	10/10-4	33,33 ($\pm 8,90$)	16,67 ($\pm 7,04$)	16,67 ($\pm 7,04$)	33,33 ($\pm 8,90$)
	7/8A-10	8,33 ($\pm 5,22$)	91,67 ($\pm 5,22$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)
	7/8A-20	25,00 ($\pm 8,18$)	75,00 ($\pm 8,18$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)
	8/6-4	33,33 ($\pm 8,90$)	66,67 ($\pm 8,90$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)
Agosto	8/6-6	33,33 ($\pm 8,90$)	58,33 ($\pm 9,31$)	8,33 ($\pm 5,22$)	0,00 ($\pm 0,00$)
	8/6-y	0,00 ($\pm 0,00$)	83,33 ($\pm 7,04$)	16,67 ($\pm 7,04$)	0,00 ($\pm 0,00$)
	8/7-3	25,00 ($\pm 8,18$)	75,00 ($\pm 8,18$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)
	9/6-14	8,33 ($\pm 5,22$)	75,00 ($\pm 8,18$)	16,67 ($\pm 7,04$)	0,00 ($\pm 0,00$)
	10/10-4	33,33 ($\pm 8,90$)	16,67 ($\pm 7,04$)	50,00 ($\pm 9,45$)	0,00 ($\pm 0,00$)
	7/8A-10	6,30 ($\pm 1,22$)	16,02 ($\pm 1,85$)	40,94 ($\pm 2,48$)	36,75 ($\pm 2,44$)
	7/8A-20	11,94 ($\pm 1,58$)	29,95 ($\pm 2,23$)	40,41 ($\pm 2,39$)	17,70 ($\pm 1,86$)
	8/6-4	16,67 ($\pm 7,04$)	50,00 ($\pm 9,45$)	0,00 ($\pm 0,00$)	33,33 ($\pm 8,91$)
	8/6-6	33,10 ($\pm 3,36$)	23,23 ($\pm 3,02$)	40,72 ($\pm 3,51$)	2,96 ($\pm 1,21$)
	8/6-y	9,45 ($\pm 2,25$)	30,56 ($\pm 3,55$)	48,61 ($\pm 3,86$)	11,39 ($\pm 2,45$)
Setembro	8/7-3	66,67 ($\pm 8,90$)	16,67 ($\pm 7,04$)	8,33 ($\pm 5,22$)	8,33 ($\pm 5,22$)
	9/6-14	17,78 ($\pm 2,95$)	11,11 ($\pm 2,42$)	66,11 ($\pm 3,65$)	5,01 ($\pm 1,68$)
	10/10-4	66,67 ($\pm 8,90$)	8,33 ($\pm 5,22$)	8,33 ($\pm 5,22$)	16,67 ($\pm 7,04$)
	7/8A-10	20,59 ($\pm 3,12$)	48,56 ($\pm 3,86$)	26,09 ($\pm 3,39$)	4,77 ($\pm 1,64$)
	7/8A-20	7,59 ($\pm 2,04$)	53,18 ($\pm 3,85$)	34,28 ($\pm 3,66$)	4,96 ($\pm 1,68$)
	8/6-4	11,43 ($\pm 2,69$)	71,90 ($\pm 3,80$)	12,15 ($\pm 2,76$)	4,53 ($\pm 1,76$)
	8/6-6	27,63 ($\pm 3,45$)	58,83 ($\pm 3,80$)	12,95 ($\pm 2,59$)	0,00 ($\pm 0,00$)
	8/6-y	7,99 ($\pm 2,09$)	50,00 ($\pm 3,86$)	27,78 ($\pm 3,46$)	14,24 ($\pm 2,70$)
	8/7-3	10,42 ($\pm 4,08$)	39,58 ($\pm 6,53$)	38,54 ($\pm 6,50$)	11,46 ($\pm 4,26$)
	9/6-14	6,80 ($\pm 2,13$)	47,57 ($\pm 4,22$)	32,14 ($\pm 3,95$)	13,50 ($\pm 2,89$)
Outubro	10/10-4	17,38 ($\pm 2,92$)	53,57 ($\pm 3,85$)	22,86 ($\pm 3,24$)	6,19 ($\pm 1,86$)
	7/8A-10	11,58 ($\pm 1,51$)	33,13 ($\pm 2,22$)	33,87 ($\pm 2,24$)	21,43 ($\pm 1,94$)
	7/8A-20	12,81 ($\pm 1,58$)	36,62 ($\pm 2,28$)	35,67 ($\pm 2,26$)	14,90 ($\pm 1,68$)
	8/6-4	7,54 ($\pm 2,88$)	51,19 ($\pm 5,45$)	27,38 ($\pm 4,87$)	13,90 ($\pm 3,77$)
	8/6-6	21,11 ($\pm 3,15$)	38,33 ($\pm 3,75$)	25,28 ($\pm 3,35$)	15,28 ($\pm 2,78$)
	8/6-y	4,29 ($\pm 1,35$)	37,47 ($\pm 3,23$)	32,14 ($\pm 3,12$)	26,10 ($\pm 2,93$)
	8/7-3	0,00 ($\pm 0,00$)	33,33 ($\pm 8,91$)	41,67 ($\pm 9,32$)	25,00 ($\pm 8,18$)
	9/6-14	6,67 ($\pm 1,92$)	32,50 ($\pm 3,61$)	54,17 ($\pm 3,84$)	6,67 ($\pm 1,92$)
	10/10-4	16,67 ($\pm 7,04$)	25,00 ($\pm 8,18$)	16,67 ($\pm 7,04$)	41,67 ($\pm 9,32$)

Para a análise estatística dos dados deste ensaio aplicou-se uma ANOVA a dois factores. Os resultados desta análise apresentam-se na Tabela 3.37.

Tabela 3.37 - ANOVA a dois factores para as variáveis transformadas, percentagens de estacas com raiz (CRt) com *callus* (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (MOt), relativamente aos efeitos do mês de colheita de estacas e do clone

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
-------------------	--------------------	--------------------	------------------	-----------------

CRt				
Mês de colheita	4	2254,65	563,66	4,81 ***
Clone	7	4946,42	706,63	6,03 ***
Mês de colheita* Clone	28	4935,97	176,28	1,50 n.s.
Residuo	165	19572,07	117,20	
CCt				
Mês de colheita	4	7684,24	1921,06	13,61 ***
Clone	7	2231,23	318,75	2,26 *
Mês de colheita* Clone	28	3936,69	140,60	1,00 n.s.
Residuo	165	23578,06	141,19	
SRt				
Mês de colheita	4	2344,99	586,25	4,56 ***
Clone	7	3595,89	513,70	3,99 ***
Mês de colheita* Clone	28	5453,27	194,76	1,51 n.s.
Residuo	165	21484,76	21484,76	
MOT				
Mês de colheita	4	5533,68	1383,42	7,46 ***
Clone	7	1553,97	222,00	1,20 n.s.
Mês de colheita* Clone	28	4849,36	173,19	0,57 n.s.
Residuo	165	30981,37	30981,37	

(1)- Níveis de significância para a variável de Fisher: **n.s.**- não significativo ($p > 0,05$);
*- significativo ($p \leq 0,05$); ***- altamente significativo ($p \leq 0,001$)

Para o mês de colheita de estacas, os resultados indicam a existência de diferenças altamente significativas para as quatro variáveis. A comparação de médias para as diferentes variáveis de resposta pode ser observada na Tabela 3.38. Os valores médios mais elevados de **CR** e **CC** foram obtidos em Julho, tendo este mês apresentado baixa mortalidade. Agosto e Setembro diferenciaram-se essencialmente pela quantidade de estacas que produziram *callus*, já que em termos de formação de raízes apresentaram percentagens equivalentes. Em Outubro observaram-se valores bastante baixos de **CR** e **CC** e valores mais elevados de **SR** e **MO**. Pode assim constatar-se que este mês de colheita de estacas não se mostrou adequado à reprodução vegetativa dos clones.

Também para o clone se obtiveram diferenças altamente significativas ($p \leq 0,001$) para as duas variáveis **CRt** e **SRt** e significativas ($p \leq 0,05$) para **CCt**. Não existe evidência para considerar que este factor condiciona a variável **MOT** (Tabela 3.37). A aplicação do teste de Fisher $LSD_{0,05}$ permitiu a separação em dois conjuntos, consoante a resposta de enraizamento (Tabela 3.39). De um modo geral, observou-se que os clones com maiores enraizamentos apresentaram também elevada produção de *callus* e mortalidade baixa.

Tabela 3.38 - Efeito do mês de colheita de estacas nas percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC); sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher $LSD_{0,05}$)

Meses de colheita	CR(%)	CC(%)	SR(%)	MO(%)
Junho	9,01 bc	37,13 b	24,82 c	20,31 a
Julho	18,04 a	68,70 a	6,40 d	0,10 c
Agosto	12,90 b	20,67 c	41,06 a	13,35 a
Setembro	12,89 b	54,08 a	21,79 c	4,48 b
Outubro	7,74 c	34,08 b	33,53 b	13,58 a

Os clones 8/6-y e 7/8A-10 distinguem-se dos restantes por apresentarem os valores mais baixos de **CR**. Por sua vez, o clone 8/6-6 alcançou a capacidade média de enraizamento mais elevada do conjunto dos clones estudados. Este caracterizou-se também por alcançar uma elevada percentagem de estacas com *callus* (40,73%) e baixa percentagem de estacas sem resposta (18,74%). É de salientar que, no ano anterior, este clone foi o que apresentou a capacidade de enraizamento mais baixa (3,73%). O material vegetativo utilizado nos ensaios realizados em 1992 e 1993 correspondeu, de facto, a fases diferentes do parque de clones. Como atrás se referiu, o ano de enxertia da planta-mãe parece influenciar a resposta de enraizamento das estacas.

Tabela 3.39 - Efeito do clone nas percentagens de estacas com raiz (CR); com *callus* (CC) e sem resposta (SR). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD0,05)

Clones	CR (%)	CC(%)	SR(%)	MO(%)
7/8A-10	6,18 b	30,53 ab	33,08 b	20,27
7/8A-20	10,11 a	39,28 a	30,32 b	10,08
8/6-4	10,17 a	63,53 a	10,33 d	5,42
8/6-6	27,52 a	40,73 a	18,74 cd	4,63
8/6-y	4,85 b	36,52 ab	31,45 b	16,91
8/7-3	18,76 a	35,78 ab	23,92 bcd	11,17
9/6-14	10,88 a	28,82 b	44,10 a	6,86
10/10-4	16,05 a	33,70 ab	25,43 bc	11,38

Relativamente à interacção do mês de colheita com o clone não existe evidência para rejeitar a hipótese nula (Tabela 3.37).

3.2.2.2.3 - Intensidade de poda, mês de colheita de estacas e clone

Em Dezembro de 1992 foi realizada uma poda nos rametos da Fase I do parque de clones. Seleccionaram-se três clones 7/8A-10, 7/8A-20 e 8/6-19 e aplicaram-se, nos respectivos rametos, dois níveis de intensidade de poda: uma severa e uma suave. O ensaio comparativo para testar este factor na resposta das estacas foi realizado, no ano seguinte, em três meses de colheita: Junho, Agosto e Outubro (Anexo V- ensaio nº5/93). Os valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para cada uma das variáveis de resposta estudadas e para os factores em questão encontram-se na Tabela 3.40.

Tabela 3.40 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO) relativamente aos efeitos da intensidade de poda, do mês de colheita de estacas e do clone

Intensidade de poda	Mês de colheita de estacas	Clone	CR (%)	CC (%)	SR (%)	MO (%)	
Intensa	Junho	7/8A-10	21,42 (±3,88)	25,89 (±4,14)	38,77 (±4,60)	13,40 (±3,22)	
		7/8A-20	9,82 (±2,81)	53,57 (±4,71)	32,18 (±4,41)	8,04 (±2,57)	
		8/6-19	0,90 (±0,89)	27,68 (±4,23)	31,74 (±4,40)	42,86 (±4,68)	
	Agosto	7/8A-10	5,36 (±2,13)	6,25 (±2,29)	38,70 (±4,60)	49,11 (±4,72)	
		7/8A-20	3,58 (±1,76)	25,01 (±4,09)	44,99 (±4,70)	21,43 (±3,38)	
		8/6-19	1,79 (±1,25)	19,64 (±3,75)	29,20 (±4,30)	53,57 (±4,71)	
	Outubro	7/8A-10	30,63 (±4,36)	31,25 (±4,38)	30,88 (±4,37)	10,72 (±2,92)	
		7/8A-20	1,79 (±1,25)	30,36 (±4,34)	47,58 (±4,72)	13,40 (±3,22)	
		8/6-19	1,79 (±1,25)	58,93 (±4,65)	31,00 (±4,37)	11,60 (±3,02)	
	Suave	Junho	7/8A-10	0,90 (±0,89)	55,36 (±4,70)	28,15 (±4,25)	21,43 (±3,88)
			7/8A-20	5,39 (±1,91)	65,84 (±4,01)	24,78 (±3,65)	10,84 (±2,63)
			8/6-19	12,50 (±3,13)	55,36 (±4,70)	20,99 (±3,85)	17,86 (±3,62)
Agosto		7/8A-10	0,00 (±0,00)	9,82 (±2,81)	32,23 (±4,42)	61,61 (±4,60)	
		7/8A-20	8,10 (±2,31)	25,00 (±3,66)	42,19 (±4,17)	21,67 (±3,48)	
		8/6-19	10,72 (±2,92)	24,11 (±4,04)	34,99 (±4,51)	32,14 (±4,41)	
Outubro		7/8A-10	2,15 (±1,22)	12,15 (±2,76)	39,36 (±4,13)	45,00 (±4,20)	
		7/8A-20	6,75 (±1,94)	38,10 (±3,75)	35,00 (±3,68)	21,83 (±3,19)	
		8/6-19	1,79 (±1,25)	54,46 (±4,71)	34,31 (±4,49)	10,72 (±2,92)	

Na Tabela 3.41 apresentam-se os resultados da análise estatística dos resultados realizada através de uma ANOVA a três factores às variáveis **CRt**, **CCt**, **SRt** e **MOt**.

Tabela 3.41 - ANOVA a três factores para as variáveis transformadas, percentagem de estacas com raiz (CRt), com *callus* (CCt), sem resposta (SRt) e mortas (MOt) relativamente aos efeitos da intensidade de poda, do mês de colheita de estacas e do clone

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
CRt				
Intensidade da poda	1	116,42	116,42	1,99 n.s.
Mês de colheita	2	199,82	99,91	1,71 n.s.
Poda * Mês de colheita	2	207,96	103,98	1,78 n.s.
Clone	2	235,19	117,59	2,01 n.s.
Poda * Clone	2	2929,47	1464,73	25,02 ***
Mês de colheita * Clone	4	669,37	167,34	2,86 *
Poda * Mês * Clone	4	511,98	127,99	2,19 n.s.
Residuo	59	3454,02	58,54	
CCt				
Intensidade da poda	1	257,92	257,92	1,96 n.s.
Mês de colheita	2	4580,45	2290,22	17,44 ***
Poda * Mês de colheita	2	1338,06	669,03	5,09 ***
Clone	2	2262,85	1131,43	8,61 ***
Poda * Clone	2	74,24	37,12	0,28 n.s.
Mês de colheita * Clone	4	1881,94	470,49	3,58 *
Poda * Mês * Clone	4	527,39	131,85	1,00 n.s.
Residuo	59	7750,09	131,36	
SRt				
Intensidade da poda	1	255,67	255,67	3,64 n.s.
Mês de colheita	2	886,29	443,14	6,31 ***
Poda * Mês de colheita	2	333,19	166,59	2,37 n.s.
Clone	2	704,63	352,31	5,02 ***
Poda * Clone	2	166,96	83,48	1,19 n.s.
Mês de colheita * Clone	4	452,18	113,05	1,61 n.s.
Poda * Mês * Clone	4	550,06	137,52	1,96 n.s.
Residuo	59	4140,79	70,18	
MOt				
Intensidade da poda	1	88,85	88,85	0,58 n.s.
Mês de colheita	2	3645,41	1822,70	11,88 ***
Poda * Mês de colheita	2	569,57	284,78	1,86 n.s.
Clone	2	2729,28	1364,64	8,89 ***
Poda * Clone	2	1580,19	790,09	5,15 ***
Mês de colheita * Clone	4	1675,73	418,93	2,73 **
Poda * Mês * Clone	4	265,07	66,27	0,43 n.s.
Residuo	59	9054,76	153,47	

(1)- Níveis de significância para a variável de Fisher: **n.s.**- não significativo ($p > 0,05$); *- significativo ($p \leq 0,05$); **- muito significativo ($p \leq 0,01$); ***- altamente significativo ($p \leq 0,001$)

Os resultados do teste de Fisher $LSD_{0,05}$ para comparação de médias relativamente ao mês de colheita de estacas indicam Junho como o mês em que se atingiram os valores mais elevados para **CC** e simultaneamente, mais reduzidos para **SR** e **MO**. O valor mais baixo de **CC** foi obtido em Agosto no qual se atingiram, contudo, os valores mais elevados para as variáveis **SR** e **MO** (Tabela 3.42).

Dos três clones, 7/8A-10 apresentou a menor percentagem de estacas com *callus* e simultaneamente a mortalidade mais elevada; o clone 7/8A-20 teve um comportamento inverso (Tabela 3.42).

Tabela 3.42 - Efeitos do mês de colheita de estacas e do clone nas percentagens de estacas com *callus* (CC); sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD_{0,05})

Factores	CC (%)	SR (%)	MO (%)
Mês de colheita			
Junho	47,60 a	23,87 b	15,75 b
Agosto	16,99 c	36,63 a	36,94 a
Outubro	33,20 b	35,15 a	15,74 b
Clone			
7/8A-10	19,57 b	32,68 b	31,35 a
7/8A-20	38,16 a	36,68 a	11,96 b
8/6-19	38,78 a	25,56 b	25,87 a

A interacção intensidade de poda com o mês de colheita e com o clone, não mostrou evidência para a rejeição da hipótese nula em relação às quatro variáveis **Crt**, **Cct**, **Srt** e **Mot** (Tabela 3.41).

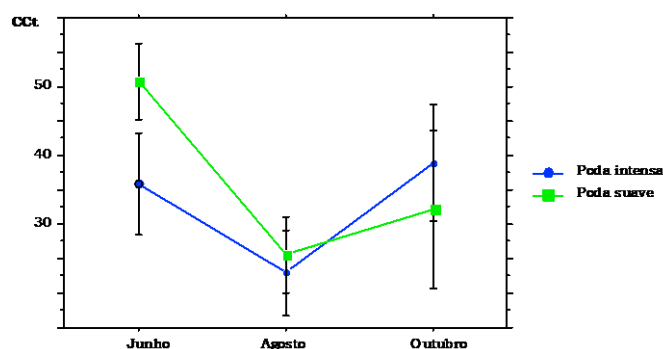


Figura 3.8 - Efeito da interacção da intensidade de poda com o mês de colheita de estacas na variável transformada CCt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%

A interacção da intensidade de poda com o mês de colheita mostrou a existência de diferenças altamente significativas para a variável **CCt** e não significativas para **Crt**, **Srt** e **Mot**. A Fig. 3.8 permite a comparação dos valores médios obtidos para os dois níveis de intensidade de poda nos meses de Junho, Agosto e Outubro, relativamente à variável transformada **CCt**. Analisada a produção de estacas com *callus* em relação aos rametos sujeitos a poda suave e aos sujeitos a poda intensa verificou-se que no mês de Junho a primeira modalidade quase duplicou a segunda, (de 60,00% para 34,35%). Para os dois meses seguintes, o efeito atenua-se, embora em Outubro os resultados apontem para uma inversão dos efeitos.

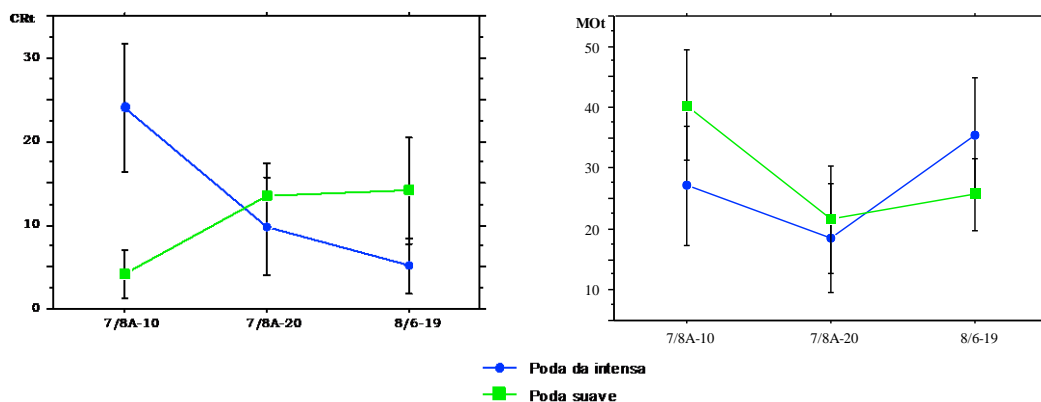


Figura 3.9 - Efeito da interacção da intensidade de poda com o clone nas variáveis transformadas CRT e MOt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%

No que respeita à interacção da intensidade de poda com o clone, as variáveis **CRT** e **MOt** apresentaram-se altamente significativas. Para as variáveis **Cct** e **SRt** não existe evidência para rejeitar a hipótese nula. A observação da Fig. 3.9 indica que o corte intenso dos ramos favoreceu o clone 7/8A-10. Este efeito verificou-se não só através de um aumento da percentagem de estacas com raiz, como também pela diminuição do número de estacas mortas. No entanto, os clones 7/8A-20 e 8/6-19 não apresentaram o mesmo comportamento. Há uma tendência para que o enraizamento destes dois clones seja superior nos ramos sujeitos a uma poda suave.

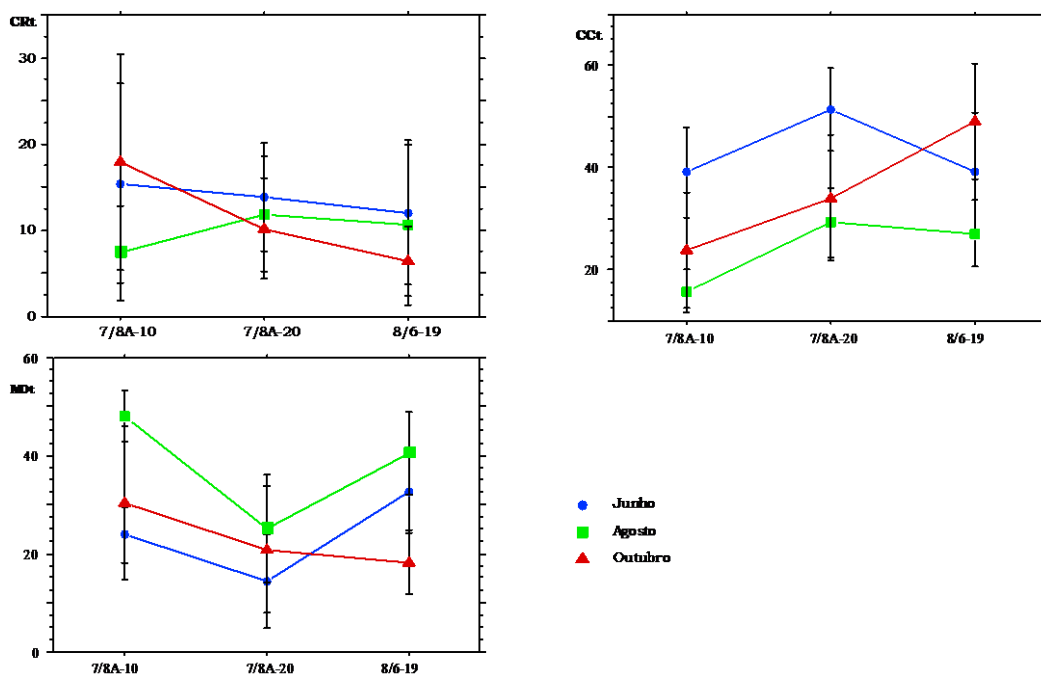


Figura 3.10 - Efeito da interacção do mês de colheita de estacas com o clone nas variáveis transformadas CRT, CCT, SRt e MOt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%

Já no que se refere à interacção do mês de colheita com o clone surgiram diferenças muito significativas para a variável MOt e significativas para CRT e CCt. Os clones estudados apresentaram comportamentos diferentes, consoante os três meses de colheita conforme se observa na Fig. 3.10. Assim, em termos de enraizamento, o clone 7/8A-10, ao contrário dos clones 7/8A-20 e 8/6-19, reagiu favoravelmente no mês de Outubro. Por sua vez, no mês de Junho, o clone 8/6-19 apresentou, relativamente aos outros dois, mortalidade baixa e uma elevada quantidade de estacas com *callus*.

3.2.2.2.4 - Concentração de IBA aplicada, mês de colheita de estacas e clone

O efeito da aplicação de diferentes concentrações de IBA foi analisado em cinco clones: 7/8A-10, 7/8A-20, 8/6-6, 8/6-y e 9/6-14 e repetido em três meses de colheita: Junho, Agosto e Outubro (Anexo VI- ensaio nº2/93). Na Tabela 3.43 apresentam-se os valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as variáveis **CR**, **CC**, **SR** e **MO**.

Tabela 3.43 - Valores médios e respectivos desvios padrões obtidos para as percentagens de estacas com raiz (CR), com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO), relativamente aos efeitos da concentração de IBA, do mês de colheita de estacas e do clone

IBA (%)	Clone	CR (%)	CC (%)	SR (%)	MO (%)	
Junho	0	7/8A-10	10,0 (±3,00)	35,0 (±4,78)	30,0 (±4,58)	25,0 (±4,33)
		7/8A-20	10,0 (±3,00)	20,0 (±4,00)	15,0 (±3,57)	55,0 (±4,97)
		8/6-6	15,0 (±3,57)	35,0 (±4,78)	20,0 (±4,00)	30,0 (±4,58)
	0,5	8/6-y	30,0 (±4,58)	40,0 (±4,90)	5,0 (±2,18)	25,0 (±4,33)
		9/6-14	5,0 (±2,18)	15,0 (±3,57)	35,0 (±4,78)	45,0 (±4,97)
		7/8A-10	5,0 (±2,18)	25,0 (±4,33)	35,0 (±4,78)	35,0 (±4,78)
	1	7/8A-20	20,0 (±4,00)	15,0 (±3,57)	20,0 (±4,00)	45,0 (±1,92)
		8/6-6	20,0 (±4,00)	55,0 (±4,97)	20,0 (±4,00)	5,0 (±2,18)
		8/6-y	10,0 (±3,00)	15,0 (±3,57)	40,0 (±4,90)	35,0 (±4,78)
	2	9/6-14	10,0 (±3,00)	15,0 (±3,57)	35,0 (±4,78)	40,0 (±4,90)
		7/8A-10	0,0 (±0,00)	30,0 (±4,58)	30,0 (±4,58)	40,0 (±4,90)
		7/8A-20	20,0 (±4,00)	35,0 (±4,78)	25,0 (±4,33)	20,0 (±4,00)
4	8/6-6	35,0 (±4,77)	30,0 (±4,58)	20,0 (±4,00)	15,0 (±3,57)	
	8/6-y	10,0 (±3,00)	25,0 (±4,33)	35,0 (±4,78)	30,0 (±4,58)	
	8/6-y	10,0 (±3,00)	25,0 (±4,33)	35,0 (±4,78)	30,0 (±4,58)	
2	9/6-14	5,0 (±2,18)	35,0 (±4,78)	15,0 (±3,57)	45,0 (±4,97)	
	7/8A-10	10,0 (±3,00)	50,0 (±5,00)	20,0 (±4,00)	20,0 (±4,00)	
	7/8A-20	5,0 (±2,18)	75,0 (±4,33)	0,0 (±0,00)	20,0 (±4,00)	
4	8/6-6	20,0 (±4,00)	40,0 (±4,90)	15,0 (±3,57)	25,0 (±4,33)	
	8/6-y	0,0 (±0,00)	50,0 (±5,00)	15,0 (±3,57)	35,0 (±4,78)	
	9/6-14	0,0 (±0,00)	35,0 (±4,78)	55,0 (±4,97)	10,0 (±3,00)	
4	7/8A-10	0,0 (±0,00)	20,0 (±4,00)	45,0 (±4,97)	35,0 (±4,78)	
	7/8A-20	5,0 (±2,18)	35,0 (±4,78)	45,0 (±4,97)	15,0 (±3,57)	
	8/6-6	20,0 (±4,00)	50,0 (±5,00)	10,0 (±3,00)	20,0 (±4,00)	
4	8/6-y	0,0 (±0,00)	35,0 (±4,78)	25,0 (±4,33)	40,0 (±4,90)	
	9/6-14	10,0 (±3,00)	25,0 (±4,33)	55,0 (±4,97)	10,0 (±3,00)	

Tabela 3.43 - (Continuação)

IBA (%)	Clone	CR (%)	CC (%)	SR (%)	MO (%)	
Agosto	0	7/8A-10	10,0 (±3,00)	15,0 (±3,57)	65,0 (±4,77)	10,0 (±3,00)
		7/8A-20	25,0 (±4,33)	35,0 (±4,78)	40,0 (±4,90)	0,0 (±0,00)
		8/6-6	15,0 (±3,57)	25,0 (±4,33)	60,0 (±4,90)	0,0 (±0,00)
		8/6-y	0,0 (±0,00)	20,0 (±4,00)	60,0 (±4,90)	20,0 (±4,00)
		9/6-14	5,0 (±2,18)	5,0 (±2,18)	65,0 (±4,77)	25,0 (±4,33)
	0,5	7/8A-10	15,0 (±3,57)	20,0 (±4,00)	55,0 (±4,97)	10,0 (±3,00)
		7/8A-20	20,0 (±4,00)	40,0 (±4,90)	30,0 (±4,58)	10,0 (±3,00)
		8/6-6	40,0 (±4,90)	20,0 (±4,00)	40,0 (±4,90)	0,0 (±0,00)
		8/6-y	5,0 (±2,18)	25,0 (±4,33)	65,0 (±4,77)	5,0 (±2,18)
		9/6-14	20,0 (±4,00)	5,0 (±2,18)	75,0 (±4,33)	0,0 (±0,00)
	1	7/8A-10	10,0 (±3,00)	10,0 (±3,00)	80,0 (±4,00)	0,0 (±0,00)
		7/8A-20	25,0 (±4,33)	20,0 (±4,00)	45,0 (±4,97)	10,0 (±3,00)
		8/6-6	15,0 (±3,57)	20,0 (±4,00)	60,0 (±4,90)	5,0 (±2,18)
		8/6-y	15,0 (±3,57)	5,0 (±2,18)	75,0 (±4,33)	5,0 (±2,18)
		9/6-14	20,0 (±4,00)	5,0 (±2,18)	75,0 (±4,33)	0,0 (±0,00)
2	7/8A-10	5,0 (±1,92)	40,0 (±4,90)	50,0 (±5,00)	5,0 (±2,18)	
	7/8A-20	15,0 (±3,57)	60,0 (±4,90)	20,0 (±4,00)	5,0 (±2,18)	
	8/6-6	30,0 (±4,58)	40,0 (±4,90)	25,0 (±4,33)	5,0 (±2,18)	
	8/6-y	5,0 (±2,18)	55,0 (±4,97)	35,0 (±4,78)	5,0 (±2,18)	
	9/6-14	20,0 (±4,00)	5,0 (±2,18)	75,0 (±4,33)	0,0 (±0,00)	
4	7/8A-10	10,0 (±3,00)	50,0 (±5,00)	35,0 (±4,78)	5,0 (±2,18)	
	7/8A-20	25,0 (±4,33)	55,0 (±4,97)	20,0 (±4,00)	0,0 (±0,00)	
	8/6-6	40,0 (±4,90)	35,0 (±4,78)	25,0 (±4,33)	0,0 (±0,00)	
	8/6-y	15,0 (±3,57)	45,0 (±4,97)	40,0 (±4,90)	0,0 (±0,00)	
	9/6-14	25,0 (±4,33)	5,0 (±2,18)	65,0	5,0 (±2,18)	
Outubro	0	7/8A-10	5,0 (±2,18)	30,0 (±4,58)	45,0 (±4,97)	20,0 (±4,00)
		7/8A-20	10,0 (±3,00)	30,0 (±4,58)	60,0 (±4,90)	0,0 (±0,00)
		8/6-6	10,0 (±3,00)	25,0 (±4,33)	50,0 (±5,00)	15,0 (±3,57)
		8/6-y	0,0 (±0,00)	10,0 (±3,00)	35,0 (±4,78)	55,0 (±4,97)
		9/6-14	5,0 (±2,18)	20,0 (±4,00)	70,0 (±4,58)	5,0 (±2,18)
	0,5	7/8A-10	10,0 (±3,00)	40,0 (±4,90)	35,0 (±4,78)	15,0 (±3,57)
		7/8A-20	20,0 (±4,00)	60,0 (±4,90)	10,0 (±3,00)	10,0 (±3,00)
		8/6-6	20,0 (±4,00)	45,0 (±4,97)	15,0 (±3,57)	20,0 (±4,00)
		8/6-y	10,0 (±3,00)	30,0 (±4,58)	25,0 (±4,33)	35,0 (±4,78)
		9/6-14	0,0 (±0,00)	30,0 (±4,58)	65,0 (±4,77)	5,0 (±2,18)
	1	7/8A-10	6,7 (±2,50)	40,0 (±4,90)	46,7 (±4,99)	6,7 (±2,50)
		7/8A-20	26,7 (±4,42)	46,7 (±4,99)	20,0 (±4,00)	6,7 (±2,50)
		8/6-6	53,3 (±4,99)	33,3 (±4,71)	13,3 (±3,40)	0,0 (±0,00)
		8/6-y	0,0 (±0,00)	40,0 (±4,90)	33,3 (±4,71)	26,7 (±4,42)
		9/6-14	0,0 (±0,00)	26,67 (±4,42)	73,3 (±4,42)	0,0 (±0,00)
	2	7/8A-10	5,0 (±2,18)	70,0 (±4,58)	20,0 (±4,00)	5,0 (±2,18)
		7/8A-20	20,0 (±4,00)	60,0 (±4,90)	15,0 (±3,57)	5,0 (±2,18)
		8/6-6	25,0 (±4,33)	45,0 (±4,97)	10,0 (±3,00)	20,0 (±4,00)
		8/6-y	5,0 (±2,18)	35,0 (±4,78)	20,0 (±4,00)	40,0 (±4,90)
		9/6-14	5,0 (±2,18)	30,0 (±4,58)	45,0 (±4,97)	20,0 (±4,00)
	4	7/8A-10	5,0 (±2,18)	50,0 (±5,00)	25,0 (±4,33)	20,0 (±4,00)
		7/8A-20	20,0 (±4,00)	25,0 (±4,33)	30,0 (±4,58)	25,0 (±4,33)
		8/6-6	10,0 (±3,00)	40,0 (±4,90)	30,0 (±4,58)	20,0 (±4,00)
		8/6-y	5,0 (±2,18)	30,0 (±4,58)	20,0 (±4,00)	45,0 (±4,97)
		9/6-14	5,0 (±2,18)	30,0 (±4,58)	55,0 (±4,97)	10,0 (±3,00)

Na Tabela 3.44 apresentam-se os resultados da ANOVA a três factores para a concentração de IBA, o mês de colheita das estacas e o clone.

Relativamente à concentração de IBA verificam-se diferenças altamente significativas para as variáveis **Cct** e **Srt** e não significativas para **Crt** e **Mot**. A comparação dos valores médios obtidos (Tabela 3.45), através do teste de Fisher $LSD_{0,05}$, mostrou que a maior produção de estacas com *callus* foi obtida com a aplicação de 2% de IBA. Esta concentração conduziu também ao valor mais baixo de

estacas sem resposta. Os valores de **CC** mais reduzidos e de **SR** mais elevados corresponderam à aplicação de IBA nas concentrações de 0, 0,5 e 1%. Para ambas as variáveis, estas três concentrações não deram respostas significativamente diferentes.

Tabela 3.44 - ANOVA a três factores para as variáveis transformadas, percentagens de estacas com raiz (CRt), com *callus* (CCt), sem resposta (SRt) e de estacas mortas (MOt), relativamente aos efeitos da concentração de IBA, do mês de colheita de estacas e do clone

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F calculado (1)
CRt				
IBA	4	1016,08	254,02	1,27 n.s.
Mês de colheita	2	2102,82	1051,41	5,24 **
IBA* Mês de colheita	8	2730,90	341,36	1,70 n.s.
Clone	4	13073,39	3268,55	16,28 ***
IBA* clone	16	2004,49	125,28	0,62 n.s.
Mês de colheita * clone	8	2136,64	267,09	1,33 n.s.
IBA* mês* clone	32	7040,90	220,03	1,10 n.s.
Residuo	220	44164,59	200,75	
CCt				
IBA	4	10347,01	2586,75	8,99 ***
Mês de colheita	2	4349,50	2174,75	7,56 ***
IBA* mês de colheita	8	5757,17	719,65	2,50 *
Clone	4	9763,71	2440,93	8,48 ***
IBA* clone	16	3033,75	189,61	0,66 n.s.
Mês de colheita * clone	8	4859,69	607,46	2,11 *
IBA* mês* clone	32	7397,40	231,17	0,80 n.s.
Residuo	220	63291,71	287,69	
SRt				
IBA	4	6280,69	1570,17	4,56 ***
Mês de colheita	2	18420,40	9210,20	26,74 ***
IBA* mês de colheita	8	8424,40	1053,05	3,06 ***
Clone	4	21240,15	5310,04	15,42 ***
IBA* clone	16	5603,73	350,23	1,02 n.s.
Mês de colheita * Clone	8	3205,09	400,64	1,16 n.s.
IBA* mês* clone	32	7489,48	234,05	0,68 n.s.
Residuo	220	75770,51	344,41	
MOt				
IBA	4	1678,50	419,63	1,45 n.s.
Mês de colheita	2	24982,62	12491,31	43,07 ***
IBA* mês de colheita	8	2182,94	272,87	0,94 n.s.
Clone	4	5280,94	1320,23	4,55 ***
IBA* clone	16	2303,82	143,99	0,50 n.s.
Mês de colheita * clone	8	6020,18	752,52	2,60 ***
IBA* mês* clone	32	9774,04	305,44	1,05 n.s.
Residuo	220	63799,40	290,00	

(1)- Níveis de significância para a variável de Fisher: **n.s.**- não significativo ($p > 0,05$); *- significativo ($p < 0,05$); **- muito significativo ($p < 0,01$); ***- altamente significativo ($p < 0,001$)

No que respeita ao mês de colheita de estacas e ao clone observaram-se diferenças altamente significativas para as variáveis **CCt**, **SRt** e **MOt** e muito significativas para **CRt**.

Tabela 3.45 - Efeito da aplicação de IBA na base das estacas nas percentagens de estacas com *callus* (CC) e sem resposta (SR). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD_{0,05})

IBA (%)	CC (%)	SR (%)
0	18,33 c	41,72 ab
0,5	23,26 bc	34,72 ab
1	19,73 c	43,28 a
2	44,47 a	22,01 c
4	30,83 b	31,33 bc

O teste de comparação de médias de Fisher LSD_{0,05} (Tabela 3.46) indicou Agosto como o mês que apresentou enraizamentos mais elevados (11,32%). Estes valores contrastaram com a mortalidade e a produção de *callus* mais reduzidas. Em termos das variáveis **CR** e **CC**, Junho e Outubro mostraram-se equivalentes. Já no que respeita à mortalidade, verificou-se que esta foi mais elevada em Junho.

Tabela 3.46 - Efeito do mês de colheita de estacas nas percentagens de estacas com raiz (CR); com *callus* (CC), sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD_{0,05})

Mês de colheita de estacas	CR (%)	CC (%)	SR (%)	MO (%)
Junho	5,92 b	29,27 a	21,63 c	24,44 a
Agosto	11,32 a	19,44 b	52,46 a	1,60 c
Outubro	5,79 b	33,22 a	29,93 b	10,50 b

A análise de comparação de médias (Tabela 3.47) mostrou que os clones 7/8A-20 e 8/6-6 apresentaram, comparativamente, a maior quantidade de estacas com raiz e no que respeita à mortalidade e quantidade de estacas sem respostas as mais baixas. Os restantes clones, embora semelhantes em termos de enraizamentos, mostraram comportamentos diferentes para as outras variáveis. O clone 9/6-14 distinguiu-se pela percentagem de estacas sem resposta, enquanto o 8/6-y pela mortalidade elevada.

Tabela 3.47 - Efeito do clone nas percentagens de estacas com raiz (CR); com *callus* (CC); sem resposta (SR) e mortas (MO). Os valores (retransformados) representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 5% (Fisher LSD_{0,05})

Clones	CR (%)	CC (%)	SR (%)	MO (%)
7/8A-10	3,28 b	30,16 abc	40,35 b	10,89 b
7/8A-20	13,50 a	37,27 a	20,97 c	8,32 b
8/6-6	19,41 a	32,47 ab	23,10 c	6,35 b
8/6-y	3,14 b	25,23 bc	30,16 bc	19,73 a
9/6-14	3,95 b	12,52 c	59,22 a	7,68 b

Relativamente à interacção da concentração de IBA com o mês de colheita de estacas, os resultados obtidos para as variáveis **CRT** e **MOT** não permitiram a rejeição da hipótese nula. Verificou-se a existência de diferenças altamente significativas para a variável **SRt** e significativas para **CCt**. Em ambas as variáveis, observou-se que a concentração de 4% de IBA se sobrepôs ao efeito do mês de colheita das estacas. Nos meses de Junho e Outubro, para concentrações de IBA mais baixas (0% ou 0,5%) verificou-se uma alteração no padrão de resposta das estacas (Fig. 3.11).

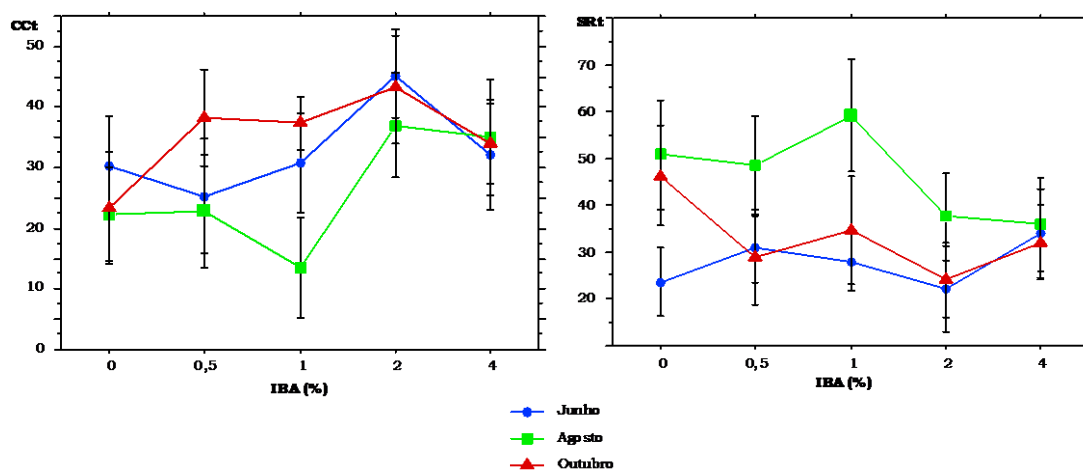


Figura 3.11 - Efeito da interacção da concentração de IBA com o mês de colheita nas variáveis transformadas CCT e SRt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%

O efeito da interacção do mês de colheita com o clone apresentou-se significativo para a variável **CCt** e altamente significativo para **MOT**. A Fig. 3.12 evidencia as alterações na resposta das estacas, em termos de produção de *callus* e de mortalidade, que os meses de colheita exerceram conjuntamente com os clones.

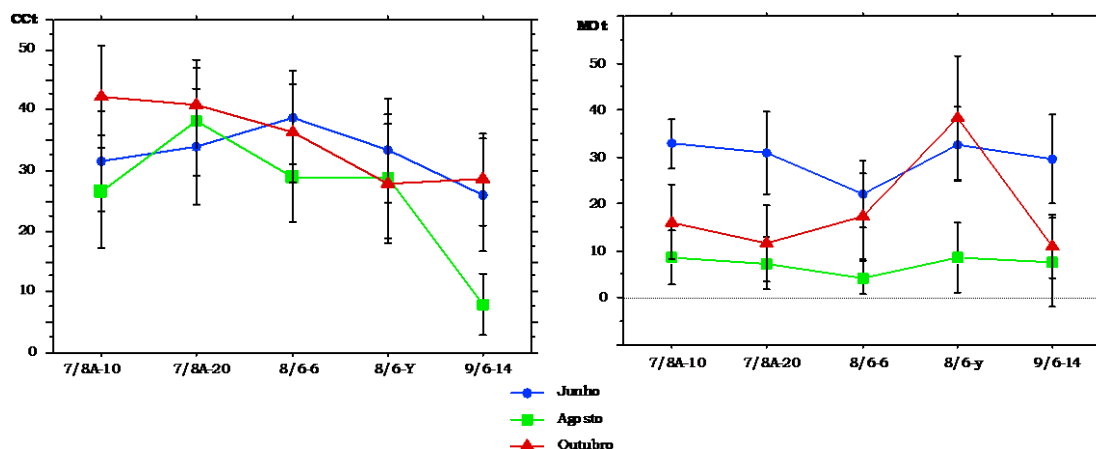


Figura 3.12 - Efeito da interacção do mês de colheita com o clone nas variáveis transformadas CCt e MOt. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%

Em relação às interacções concentração de IBA com o clone e concentração de IBA com o mês de colheita com o clone, os resultados obtidos nos ensaios, para as quatro variáveis, não permitiram detectar diferenças significativas.

3.2.2.2.5 - Análise geral do comportamento dos clones

A importância do clone na resposta das estacas tornou-se evidente ao longo das análises dos vários factores: mês de colheita, intensidade de poda e concentração de IBA. Tomando como base os ensaios realizados no ano de 1993, estudou-se a resposta média dos clones, por forma a determinar quais dos efeitos analisados os que se mostraram mais relevantes. Assim, a variabilidade observada nos dez clones foi alvo de estudo através de uma ACP.

Na Tabela 3.48 apresentam-se para cada clone, os valores médios obtidos para cada uma das variáveis de resposta: **CR**, **CC**, **SR** e **MO**.

Tabela 3.48 - Valores percentuais médios para as variáveis resposta das estacas obtidos para os diferentes clones

Clones	CR (%)	CC (%)	SR (%)	MO (%)
7/8A-10	8,39	36,73	34,34	20,56
7/8A-20	17,38	41,41	28,25	12,96
8/6-19	4,91	40,03	26,94	28,12
8/6-4	12,80	61,73	14,07	11,41
8/6-6	21,15	39,95	23,39	10,51
8/6-y	7,13	35,60	33,16	24,12
8/7-3	25,42	34,58	26,04	13,96
9/6-14	10,97	25,82	50,75	12,46
10/10-4	31,83	22,36	22,80	23,02
10/10-9	19,45	19,52	26,31	34,72

A matriz de correlações entre as diferentes variáveis para os vários clones mostra que **CC** está inversamente correlacionada com **SR**. Não se observaram correlações significativas entre as restantes variáveis (Tabela 3.49).

Tabela 3.49 - Matriz de correlação entre as variáveis de resposta das estacas obtidas para os diferentes clones

Variável	CR	CC	SR	MO
CR	1,000			
CC	-0,038 n.s.	1,000		
SR	-0,492 n.s.	-0,634 *	1,000	
MO	-0,455 n.s.	-0,352 n.s.	-0,001 n.s.	1,000

n=10; gl=n-2=8: P_{0,05}=0,632

P_{0,05}=0,632

Os resultados da ACP mostram que as duas dimensões explicam 77,50% da variabilidade total existente (Tabela 3.50).

Tabela 3.50 - Valores próprios das diferentes componentes e percentagem da variação total explicada

Eixo	Valores próprios	Variabilidade explicada (%)	Percentagem acumulada (%)
1	1,961	49,032	49,032
2	1,139	28,467	77,499
3	0,900	22,501	100,000
4	0,000	0,000	

As contribuições de cada uma das variáveis iniciais para a formação das componentes principais apresentam-se na Tabela 3.51.

Tabela 3.51 - Contribuição das variáveis iniciais para a formação dos dois primeiros eixos principais

Variável	Coeficiente das componentes principais	
	Eixo 1	Eixo 2
CR	-0,4728	-0,5596
CC	-0,5166	0,5150
SR	0,5823	-0,3739
MO	0,4129	0,5309

O primeiro eixo traduz essencialmente a oposição entre as variáveis iniciais **CR** e **CC** com **SR** distinguindo, deste modo, os clones cujas estacas reagiram positivamente (formação de raízes ou *callus*) dos que não apresentaram qualquer resposta. No segundo eixo, **CR** opõe-se a **CC** correspondendo a uma separação dos clones em termos de produção de raízes e de *callus* (Fig. 3.13).

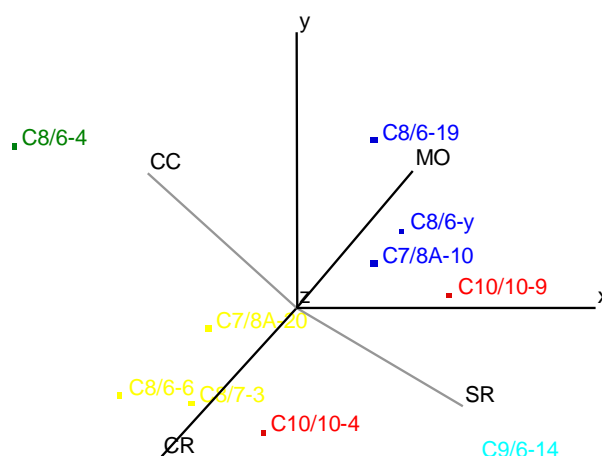


Figura 3.13 - Representação gráfica do plano principal dos diferentes clones e das variáveis iniciais

Com vista ao estabelecimento de grupos de clones que apresentem respostas semelhantes aplicou-se o método de classificação hierárquico. O corte do dendrograma entre os níveis de fusão de 8,81 e 13,91 conduziu a uma separação dos clones em cinco grupos (Figura 3.14). Na Tabela 3.52 apresentam-se os valores médios das variáveis de resposta para cada um dos grupos. O grupo 1 e 5 compõem-se apenas por um elemento cada (clones 8/6-4 e 9/7-14, respectivamente). Os clones 8/6-4 e 9/6-14 surgem distintos e distantes entre si. Embora apresentem valores semelhantes para as variáveis **CR** e **MO**, reagiram de forma inversa relativamente a **CC** e **SR**. No conjunto total dos clones estudados, o 8/6-4 apresentou a produção de estacas com *callus* mais elevada e de estacas sem resposta mais baixa. A resposta deste clone ao mês de colheita de estacas e ao ano de enxertia mostrou que os valores de **CC** mais elevados foram atingidos nas estacas colhidas em Julho e Setembro e retirados de rametos com mais tempo de enxertia. Embora este clone se caracterize por apresentar baixa mortalidade, Agosto correspondeu ao mês em que se atingiu a maior percentagem de estacas mortas (Anexo VII).

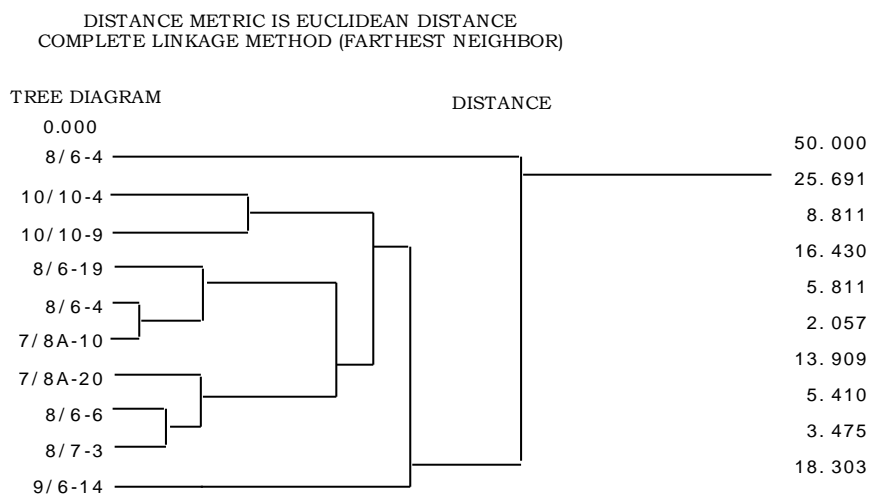


Figura 3.14 - Dendrograma dos 10 clones analisados pelo método de classificação hierárquica utilizando as distâncias euclidianas e do "vizinho mais próximo"

A característica mais importante do clone 9/6-14 (grupo 5) correspondeu à elevada percentagem de estacas que não mostraram resposta. Os valores mais baixos para esta variável foram obtidos apenas nas modalidades Julho e Setembro com aplicação de 1% de IBA. Estas correspondem também às modalidades em que se obteve uma produção de *callus* mais elevada (Anexo VII).

Tabela 3.52 - Valores médios das variáveis CR, CC, SR e MO para os cinco grupos de clones obtidos pelo método de classificação hierárquica

Grupo	Clones	$\overline{\text{CR}}$ (%)	$\overline{\text{CC}}$ (%)	$\overline{\text{SR}}$ (%)	$\overline{\text{MO}}$ (%)
1	8/6-4	12,80	61,73	14,07	11,41
2	10/10-4; 10/10-9	25,64	20,94	24,56	28,87
3	8/6-19; 8/6-y; 7/8A-10	6,81	37,46	31,48	24,27
4	7/8A-20; 8/6-6; 8/7-3	22,98	38,65	25,89	12,48
5	9/6-14	10,97	25,82	50,75	12,46

O grupo constituído pelos dois clones 10/10-4 e 10/10-9 (grupo 2) distinguem-se por apresentar simultaneamente, capacidade de enraizamento e mortalidade elevadas. Estes dois clones apenas foram estudados sob o efeito do mês de colheita de estacas. Ambos os clones apresentaram uma oposição entre a produção de raízes e a de *callus*. Os valores mais elevados para **CR** foram obtidos em Julho e Agosto, enquanto a maior percentagem de estacas com *callus* correspondeu ao mês de Setembro.

O grupo 3 junta os clones que apresentaram enraizamentos baixos, percentagens de estacas com *callus* e sem resposta médias e mortalidade média a alta.

Fazem parte desta classe os clones 7/8A-10, 8/6-19 e 8/6-y. A análise individual realizada para cada um destes clones mostrou que, de um modo geral, os factores estudados não contribuíram para alterar o seu comportamento (Anexo VII). Apenas a poda intensa, aplicada no clone 7/8A-10, induziu um aumento da capacidade de enraizamento. Este resultado parece indicar que a baixa capacidade de enraizamento é uma característica intrínseca a cada um destes clones.

Os clones 7/8A-20, 8/6-6 e 8/7-3 (grupo 4) caracterizaram-se por apresentar uma elevada percentagem de estacas com raiz e, ao mesmo tempo, uma mortalidade reduzida. De um modo geral, verificou-se que, em termos de capacidade de enraizamento, estes clones reagiram bem, nas modalidades de tratamentos estudadas excepto, com a aplicação de 4% de IBA em Outubro. Destacaram-se também, os efeitos negativos que a poda excessiva exerceu no clone 7/8A-20 (Anexo VII).

3.3 - Estudo das peroxidases

Com vista a conhecer o padrão de peroxidases de tecidos de sobreiro prepararam-se vários extractos de diferentes partes de plantas, que se analisaram por focagem isoeléctrica não equilibrada (NEIEF).

A Fig. 3.15 mostra o zimograma da fracção das peroxidases ionicamente ligadas, de raízes, segmentos basais, intermédios e superiores de caules de enraizados. De um modo geral, constata-se a existência de três grupos de peroxidases: ácido (A), neutro (N₁, N₂ e N₃) e básico (B₁, B₂, B₃ e B₄). O grupo neutro surge associado às amostras correspondentes ao segmento superior do caule e raízes, correspondendo, pois, a tecidos mais juvenis e em crescimento. Os padrões encontrados para os segmentos basal e intermédio do caule parecem ser essencialmente caracterizados pelas isoformas B₁ e B₄.

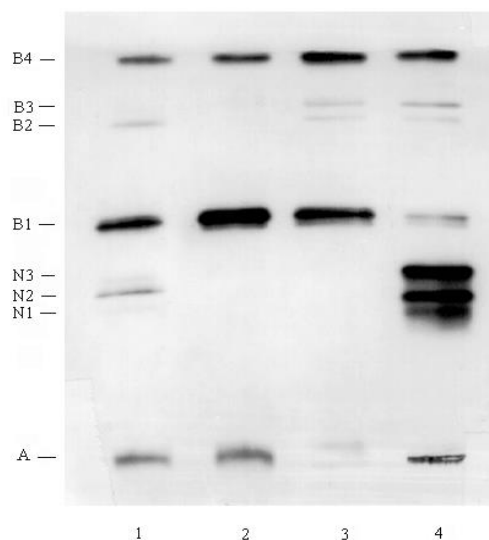


Figura 3.15 - Zimograma de peroxidases ionicamente ligadas, separadas por NEIEF de amostras de raízes (pista 1), de segmentos basais (pista 2), intermédios (pista 3) e superiores (pista 4) de caules de estacas enraizadas

Na Tabela 3.53 apresenta-se a actividade peroxidásica total das diferentes partes de estacas enraizadas. Constatou-se que as raízes constituem o tipo de material com menor actividade, em oposição aos segmentos terminais dos caules cujos valores se mostraram substancialmente superiores. As actividades peroxidásicas nos segmentos basais e intermédios revelaram-se semelhantes.

Tabela 3.53 - Actividade peroxidásica total de diferentes partes de estacas enraizadas, raízes, segmentos basais, intermédios e superiores

Tipo de material vegetal	Actividade peroxidásica (ug-1 de peso fresco)
Raízes	46,12 ± 13,53
Segmento basal do caule	147,09 ± 57,62
Segmento intermédio do caule	155,70 ± 84,84
Segmento superior do caule	555,24 ± 144,92

3.3.1 - Análise das peroxidases durante o processo de formação de raízes em estacas

Durante o processo de formação de raízes em estacas foram retiradas amostras de segmentos basais de caules e preparados extractos com o objectivo de analisar as possíveis alterações na actividade peroxidásica total e no padrão das isoperoxidasas. Analisaram-se amostras de estacas com um, cinco, sete e vinte dias de permanência em substrato de enraizamento. Ao fim de vinte dias encontraram-se diferentes

respostas que se agruparam em três classes: classe I- estacas sem raiz, mas com os caules entumescidos, classe II- estacas com raízes incipientes (comprimento inferior a dois centímetros) e classe III- estacas com raízes já desenvolvidas (comprimento superior a dois centímetros). Ao fim de quatro meses de permanência em bancada de enraizamento as percentagens médias de formação de raízes, de *callus*, sem resposta e mortas foram respectivamente 87,90%, 3,47%, 6,68% e 0%.

Globalmente, os resultados indicaram a ocorrência de alterações durante o processo de enraizamento, quer na actividade enzimática, quer no padrão da fracção das peroxidases ionicamente ligadas. A Fig. 3.16 mostra claramente a existência de dois máximos na actividade peroxidásica. O primeiro corresponde ao quinto dia de permanência no substrato, não tendo ainda sido observadas estacas com raízes visíveis. O segundo máximo, embora inferior ao primeiro, foi observado ao vigésimo dia e correspondeu aos extractos de segmentos de estacas em que se observaram raízes emergentes (classe II).

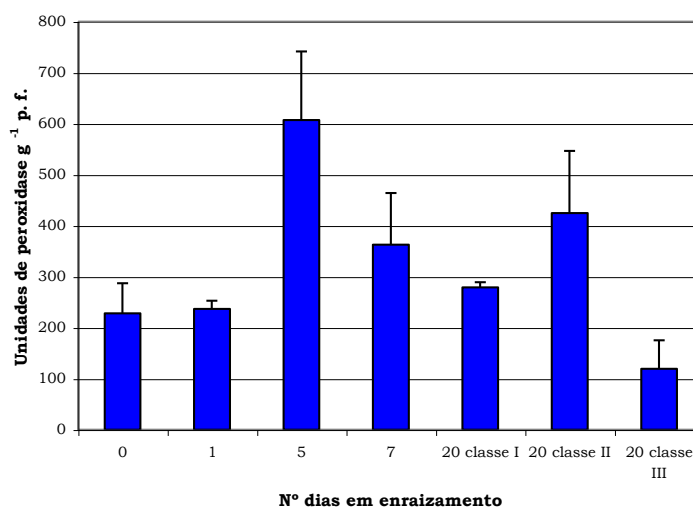


Figura 3.16 - Alterações na actividade peroxidásica da fracção ionicamente ligada, durante o período de enraizamento de estacas. Classe I- Estacas com caules entumescidos; Classe II- Estacas com raízes incipientes (comprimento inferior a 2 cm); Classe III- Estacas com raízes desenvolvidas (comprimento superior a 2 cm)

Paralelamente, os resultados da NEIEF mostraram, ao quinto dia de destacamento das estacas, o aparecimento de duas isoformas neutras N_2 e N_3 e ao mesmo tempo uma diminuição da intensidade das bandas A e B_1 (Fig. 3.17). Ao sétimo dia, presenciou-se o aparecimento de N_1 e uma intensificação de N_2 e N_3 . As observações realizadas ao vigésimo dia mostram um perfil isoperoxidásico distinto dos

anteriores. Assim, nas estacas pertencentes às classes I e II, verificou-se uma intensificação das formas A e B₁, embora não tão forte como a que se observou para a classe III. Por outro lado, o grupo neutro deixou de estar visível.

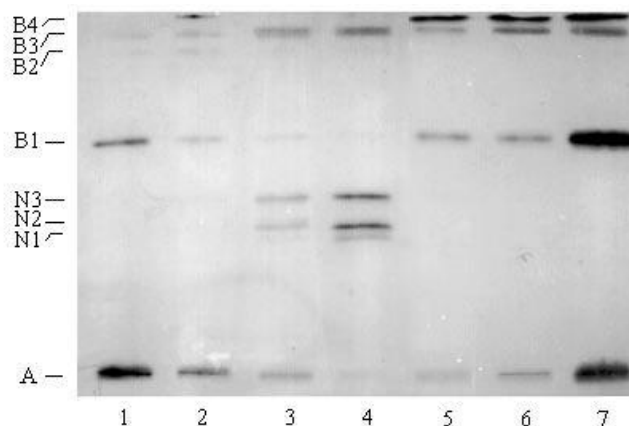


Figura 3.17 - Zimograma de peroxidases ionicamente ligadas, separadas por NEIEF, de extractos de segmentos basais de estacas retiradas de sobreiros jovens em diferentes fases do processo de formação de raízes. Número de dias em substrato de enraizamento: controlo - zero dias (pista 1); um dia (pista 2); cinco dias (pista 3); sete dias (pista 4); vinte dias- classe I (pista 5); vinte dias- classe II (pista 6); vinte dias- classe III (pista 7)

3.3.2 - Análise das peroxidases durante o processo de cicatrização

Mediu-se a actividade peroxidásica total e avaliou-se o padrão das isoperoxidasas de segmentos basais de estacas retiradas de sobreiros jovens imediatamente após o corte, 12 e 72 horas depois de colocadas no substrato de enraizamento.

Relativamente à actividade peroxidásica total, verificou-se um ligeiro aumento após 12 horas de colocação das estacas no substrato (de 783,7 para 867,6 unidades.g⁻¹ de peso fresco), seguido de uma diminuição, às 72 horas, para cerca de metade (467,6 unidades.g⁻¹ de peso fresco) (Fig. 3.18).

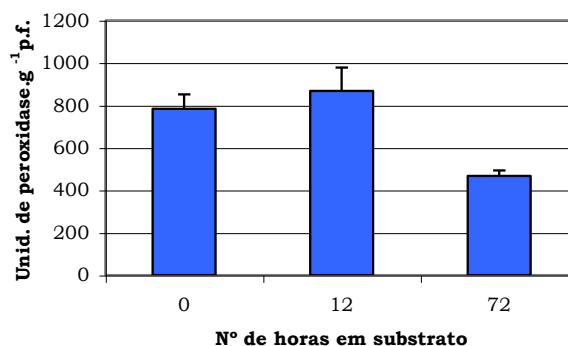


Figura 3.18 - Actividade peroxidásica de extractos de segmentos basais de estacas de sobreiro imediatamente após o destacamento da planta-mãe, 12 e 72 horas depois, correspondentes à fracção ionicamente ligada

Os resultados da NEIEF correspondente à fracção ionicamente ligada mostraram alterações no padrão das isoperoxidasas, que corresponderam, ao fim de 12 horas a uma intensificação nas bandas N₂ e N₃ e o aparecimento de N₁, 72 horas depois (Fig. 3.19).

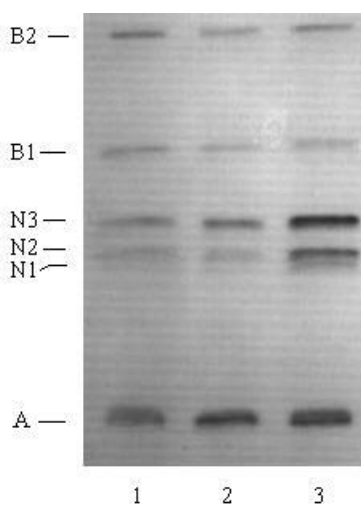


Figura 3.19 - Zimograma de peroxidases ionicamente ligadas, separadas por NEIEF, de extractos de segmentos basais de estacas retiradas de sobreiros jovens imediatamente após o corte (pista 1), 12 horas (pista 2) e 72 horas após o destacamento (pista 3)

Não se observaram modificações no padrão correspondente à fracção solúvel (resultados não apresentados).

3.3.3 - Avaliação da existência de confórmeros

As alterações observadas, no padrão das peroxidases, durante o processo de formação de raízes, nomeadamente a intensificação de N2 e N3 e o simultâneo desaparecimento de B1 colocaram a necessidade de avaliar a existência de possíveis artefactos, motivados pela ligação de compostos fenólicos às peroxidases, durante o processo de extracção. Desta forma, submetem-se amostras de extractos de segmentos basais e superiores de caules às técnicas de desnaturação irreversível, quer pelo calor, quer pela congelação/descongelação alternada. A análise dos resultados mostrou que a isoforma B1 apresenta uma elevada resistência ao calor, alcançando uma desnaturação irreversível de 40% quando se mantém quatro minutos a uma temperatura de 70°C. Ao contrário, o grupo neutro (N1, N2 e N3) atinge o mesmo nível de desnaturação irreversível, quando a amostra é sujeita a 70°C, durante apenas 26 segundos (Fig. 3.20).

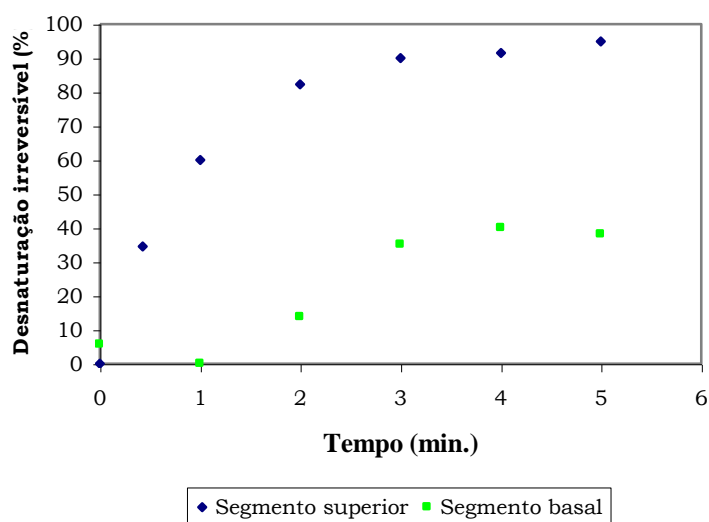


Figura 3.20 - Percentagem de desnaturação irreversível em extractos de segmentos superiores e basais de caules sujeitos à técnica de desnaturação irreversível pelo calor (70°C)

Os resultados de NEIEF, de aplicação da técnica da desnaturação irreversível pelo calor, representados na Fig. 3.21 não são conclusivos relativamente à hipótese do grupo N ser confórmero de B1. A técnica de avaliação pela congelação/descongelação também não se revelou conclusiva (resultados não apresentados).

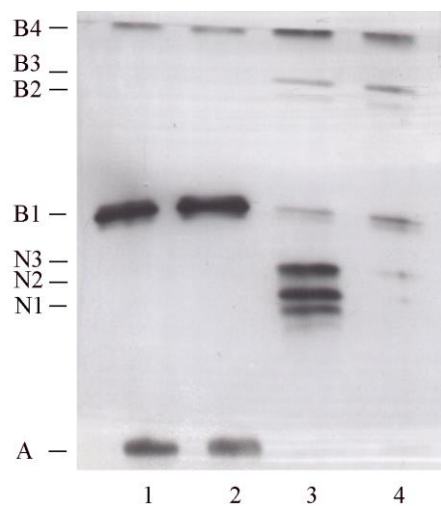


Figura 3.21 - Zimograma de peroxidases ionicamente ligadas, separadas por NEIEF, de extractos de segmentos basais (pistas 1 e 2) e superiores (pistas 3 e 4), de estacas retiradas de sobreiros jovens, sujeitos à técnica de desnaturação irreversível pelo calor. Controle-pistas 1 e 3; amostra exposta a uma temperatura de 70°C durante 26 segundos- pista 4

IV - DISCUSSÃO

4.1 - Tecido caloso e formação de raízes

Para estacas retiradas de plantas jovens parece que as condições que favorecem a iniciação e desenvolvimento de raízes contrariam a formação de tecido caloso e baixam a mortalidade. Já para as estacas colhidas de sobreiros enxertados, a correlação positiva entre a formação de raízes e a de *callus* sugere o oposto. Como ZOBEL (1992) refere, a formação de *callus* não garante o sucesso do enraizamento. Embora MACKENZIE *et al.* (1986, citado em RIBEIRO, 1994) considerem que o aparecimento de *callus* parece ser um requisito para a formação de raízes, tal não se constatou para o sobreiro, relativamente ao material proveniente de enxertia. Para SAN-JOSÉ *et al.* (1992, citado em RIBEIRO, 1994) em culturas *in vitro*, de *Quercus robur*, os primórdios radiculares formam-se geralmente a nível do anel de fibras perivasculares, aproveitando as descontinuidades. Por outro lado, RIBEIRO (1994), num estudo anatómico e histológico efectuado com sobreiros de sete meses de idade sujeitos a um pré-tratamento de escurecimento, verificou que o tecido caloso se formou a nível da periderme, constatando também alterações progressivas na continuidade do anel de fibras perivasculares sem ter, contudo, detectado enraizamento.

Alguns autores consideram que a formação de *callus* pode estar relacionado com a sobrevivência das estacas (MONTEUUIS *et al.*, 1995). Num estudo realizado com plantas-mães de *Acacia mangium* com quatro anos de idade, MONTEUUIS *et al.* (1995) constataram que uma baixa produção de *callus* era acompanhada de uma elevada mortalidade das estacas assim como, na *Sequoia sempervirens* e na *Tectona grandis*, a elevada sobrevivência correspondeu a uma produção de *callus* de elevadas dimensões. Também para *Syringa vulgaris* e *Cotinus coggygria*, duas espécies arbustivas de difícil enraizamento, a mortalidade das estacas lenhosas se associou com a ausência de raízes ou de *callus* (HOWARD, 1996). Como nas estacas retiradas de sobreiros enxertados se verificou uma correlação inversa e altamente significativa entre as estacas com *callus* e estacas mortas e nas estacas de plantas jovens se observou uma maior produção de *callus* associada a uma maior mortalidade, parece, pois, que a formação de tecido caloso poderá corresponder a funções diferentes, consoante a origem do material vegetal.

4.2 - Efeitos ambientais durante o enraizamento

O sucesso do enraizamento está dependente das condições ambientais a que as estacas estão sujeitas durante o período de formação de raízes.

Para algumas espécies a redução da luminosidade durante o período de enraizamento pode contribuir para aumentar a capacidade de formação de raízes adventícias. Diversos autores apontam para a necessidade de usar o ensombramento, como forma de evitar a subida da temperatura do ar e o déficit hídrico da estaca, mantendo o mais baixo possível o seu potencial osmótico. Outros consideram, no entanto, fundamental manter durante o enraizamento níveis de luminosidade que favoreçam a fotossíntese. ZACZEK *et al.* (1997) estudaram o efeito do ensombramento no enraizamento de folhosas consideradas recalcitrantes (*Quercus alba*, *Q. ellipsoidalis*, *Q. palustris*, *Acer griseum*, *A. rubrum*, *A. saccharum* e *Cornus kousa*) e verificaram que a redução da luminosidade aumentou significativamente a capacidade de enraizamento e o número de raízes por estaca, permitindo encurtar a metade a duração do período de enraizamento. No entanto, para o sobreiro a aplicação de ensombramento, durante todo o período em que as estacas se mantiveram na bancada, não favoreceu o enraizamento. Na realidade, as estacas que se mantiveram ensombradas apresentaram um enraizamento de cerca de três vezes inferior ao das estacas sujeitas às condições de luminosidade normais, dentro da estufa. MOE e ANDERSON (1988) ao analisarem os resultados de vários ensaios de enraizamento em ambiente controlado, concluíram que o efeito de diferentes intensidades de radiação no enraizamento depende fundamentalmente das condições de luminosidade a que os pés-mães se desenvolveram. Assim, para uma determinada intensidade de radiação, durante o enraizamento, a capacidade de desenvolvimento das raízes parece aumentar com a intensidade de radiação aplicada nos pés-mães, mas apenas até um determinado nível, a partir do qual, os efeitos produzidos no enraizamento passam a ser contrários. LEAKEY e STORETON-WEST (1992) chegaram à mesma conclusão, num estudo realizado em ambiente controlado com plantas de *Triplochiton scleroxylon*, mas chamam a atenção para os problemas de extrapolar para condições naturais os resultados experimentais. Segundo estes autores, para valores de radiação elevados é difícil conseguir-se artificialmente, características qualitativas semelhantes às encontradas na luz natural.

O substrato de propagação é um factor que pode influenciar a formação de raízes nas estacas, não só em termos quantitativos como também qualitativos. Para além das funções de suporte do material vegetal, o meio contribui também para manter a humidade junto das estacas, permitindo a realização das trocas gasosas

necessárias para a formação das raízes. Embora alguns autores (LOACH, 1988; AL-SAQRI e ALDERSON, 1996) refiram que as condições da estufa, a temperatura do substrato, a época do ano em que decorrem os ensaios e o tipo de material vegetal em estudo possam condicionar as proporções dos diferentes substratos a utilizar, os resultados dos ensaios obtidos com estacas de plantas jovens não mostraram diferenças significativas na capacidade de enraizamento para as diferentes misturas usadas.

A temperatura do substrato apresentou-se como a principal fonte de variação na resposta das estacas. Os valores mais elevados de enraizamento obtiveram-se a 28°C, enquanto que formação de *callus*, não resposta e estacas mortas associaram-se à temperatura de 25°C. Estes resultados vêm reforçar os já alcançados por BARNESCHI (1971), mostrando que, para o sobreiro, temperaturas do substrato mais elevadas (29,9°C) do que as normalmente aconselhadas (25°C) são favoráveis para o enraizamento. Note-se, porém, que vários autores indicam não ser aconselhável que a temperatura do substrato se eleve acima de 25°C, em virtude das condições de humidade relativa e temperatura existentes nas estufas serem propícias ao aparecimento de doenças (ROULUND, 1971; PORLINGIS e THERIOS, 1976; POISSONNIER, 1978; LOACH, 1988; STANKOVA e PANETSOS, 1997).

Em estudos realizados com *Chrysanthemum* e *Forsythia* verificou-se que a influência da temperatura do substrato variava consoante a fase do desenvolvimento do sistema radicular. A temperatura do substrato de 30°C favoreceu a iniciação dos primórdios radiculares, no entanto, o seu crescimento foi beneficiado pela diminuição da temperatura para 25°C. Alguns investigadores realizaram ensaios de multiplicação vegetativa de Inverno, utilizando diferentes regimes diários para a temperatura do substrato, com vista a encontrar soluções mais económicas e igualmente com bons resultados de enraizamento (COOPER, 1977 e SCOTT, 1980 citados em LOACH, 1988). Segundo estes trabalhos e para as espécies estudadas foi considerado vantajoso reduzir o aquecimento do substrato apenas durante uma parte do dia. Embora se tenha verificado uma maior rapidez no enraizamento das estacas sujeitas a um aquecimento contínuo, em termos de resultados finais as percentagens de enraizamento dos vários tratamentos não foram significativamente diferentes. Razões de ordem logística e também económica impediram a realização de estudos mais aprofundados do efeito deste factor no enraizamento do sobreiro, bem como no crescimento das raízes. Daí que, em face dos resultados obtidos, se tenha decidido optar, nos ensaios seguintes, pelo uso de uma temperatura do substrato de 28°C.

4.3 - Efeito do IBA

Os resultados alcançados com a aplicação de hormonas de enraizamento não são sempre reprodutíveis, mostrando-se dependentes não só das condições ambientais em que decorrem os ensaios, como também das plantas-mães ou do próprio clone (BLAZICH, 1988).

HARTMANN *et al.* (1997) e BLAZICH (1988) consideram a imersão da base das estacas em solução concentrada de IBA, durante cinco segundos, mais eficaz do que a aplicação de pó comercial. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho não indicaram diferenças significativas. ROMANO *et al.* (1992) também não constataram a existência de diferenças significativas entre estes dois métodos de aplicação de IBA.

Os vários ensaios de estacaria estabelecidos com diferentes *Quercus* sp. mostraram que, de um modo geral, este género se apresenta como sendo de difícil propagação, daí que HARTMANN *et al.* (1997) aconselhem a aplicação de concentrações elevadas de IBA. Estes autores referem alguns estudos de estacaria em *Quercus virginiana*, *Q. laurifolia* e *Q. shumardii*, nos quais concentrações de IBA entre 1% e 1,2% induziram os melhores resultados de enraizamento. Em *Quercus virginiana*, MORGAN *et al.* (1980) mostraram que concentrações de IBA da ordem de 2,5% foram favoráveis ao enraizamento de estacas retiradas de plantas com quatro anos de idade, embora com material mais jovem, as melhores percentagens se verificassem com 1,5% de IBA. O tratamento de estacas de árvores adultas de *Quercus alba*, *Q. ellipoidales* e *Q. pallustris* com 1% de IBA influenciou positivamente não só o enraizamento, como também o número de raízes por estaca (ZACZEK *et al.*, 1997).

Para o material retirado de sobreiros jovens (ano e meio de idade), as melhores percentagens de enraizamento foram obtidas com uma concentração de 0,5% de IBA. Só as concentrações de 4% e 8% de IBA se apresentaram mais desfavoráveis. No entanto, RIBEIRO (1993), num ensaio de estacaria efectuado com sobreiros de seis meses de idade constatou que a aplicação de 0,5% de IBA conduziu aos valores mais elevados de enraizamento. Esta concentração induziu o maior número de raízes por estaca, assim como aumentou o comprimento da maior raiz. Segundo este autor, a aplicação de 2% de IBA mostrou-se excessiva para este material, provocando uma elevada mortalidade. Porém, para o material proveniente de enxertos, a concentração de IBA de 1% mostrou-se como a mais favorável ao enraizamento. Parece, pois, poder concluir-se que o material vegetativo retirado de plantas mais jovens é menos tolerante a concentrações elevadas de IBA.

Para o ensaio estabelecido em 1993, não se constataram diferenças significativas para as diferentes concentrações de IBA. MONTEUUIS *et al.* (1995)

também constataram divergências na resposta de estacas de *Acacia mangium* ao tratamento de IBA, justificando-as como consequência de interferências nos ritmos endógenos das plantas de pequenas alterações nas condições ambientais.

No global, a interação do clone com a concentração de IBA não se mostrou significativa, no entanto, os clones que mostraram capacidade de enraizamento mais elevada responderam favoravelmente à aplicação de 1% IBA. Este facto sugere uma possível preponderância do efeito do clone sobre o tratamento auxínico. Ao contrário, STANKOVA e PANETSOS (1997), em *Cupressus sempervirens* constataram para o efeito do IBA, diferenças significativas na capacidade de enraizamento e de formação de *callus* entre os vários genótipos analisados.

DAVIES (1984) verificou, em *Ficus pumila*, que a aplicação de IBA em plantas jovens foi suficiente para eliminar as variações do enraizamento devidas à época de colheita. Já relativamente ao material retirado de plantas adultas, a concentração óptima de IBA estava dependente daquele efeito. Para o sobreiro, a aplicação de IBA no enraizamento não se mostrou dependente da época de colheita, tanto nas estacas retiradas de plantas jovens, como nas enxertadas. No entanto, relativamente à formação de *callus* (em material enxertado), a interação da concentração de IBA com a época de colheita apresentou-se significativa. Na realidade, nos dois anos em estudo, as concentrações de IBA de 1% e de 2%, respectivamente em Outubro e Junho, conduziram às mais elevadas percentagens de estacas com *callus*. A existência de uma relação positiva entre a formação de *callus* e raízes sugere que, apesar de não se observarem diferenças significativas no enraizamento será necessário uma concentração mais elevada de IBA em Junho para estimular este processo. Para analisar com mais cuidado este efeito, deveria, em diferentes épocas, estudar-se a acção da concentração de IBA, tanto em material jovem como enxertado. Na realidade, POUPARD *et al.* (1994) constataram, para a *Acacia mangium*, uma interação significativa entre o tratamento de IBA e a idade da planta-mãe. Estes autores sugerem que as diferenças observadas na resposta destes dois tipos de material possam estar relacionadas com uma melhor receptividade dos tecidos jovens ao tratamento auxínico. Uma das acções das auxinas na formação de raízes está relacionada com a expansão celular dos diferentes tecidos do córtex, do floema e do câmbio, provocando rupturas no anel contínuo dos feixes perivasculares (HARTMANN *et al.*, 1997).

4.4 - Duração do enraizamento

Em termos globais, os valores mais elevados de enraizamento foram alcançados mantendo as estacas durante quatro meses no substrato. Os resultados indicaram que ao fim de um mês do início do ensaio, a percentagem de estacas com *callus* já se encontrava definida, no entanto o número de estacas com raízes visíveis ainda era reduzido. Contrariamente, em estacas retiradas de sobreiros com idades compreendidas entre quatro e seis meses, RIBEIRO (1994) verificou a existência de diferenças significativas na percentagem de formação de *callus* após dois e três meses do início do ensaio. Em Julho e Agosto, três meses de permanência das estacas foram suficientes para se atingirem valores elevados na percentagem de formação de raízes. Períodos superiores prejudicaram a sobrevivência das estacas. Uma vez que não se aplicou adubação, justifica-se assim, a mortalidade das estacas já enraizadas ao fim de cinco meses. Uma duração de quatro meses em bancada de enraizamento já justifica a incorporação no substrato de um adubo de libertação lenta, podendo contribuir para aumentar a sobrevivência das estacas. A adubação durante o enraizamento é normalmente evitada, devido ao possível aumento da concentração de sais no meio. No entanto, SPETHMANN e HARMS (1993) num estudo com *Quercus robur* e *Q. petraea* constataram que a aplicação de uma concentração baixa de "Osmocote" (1,5-2,5 gl-1) induziu um acréscimo na capacidade de enraizamento e na sobrevivência das plantas enraizadas. Estes autores aconselham baixas concentrações do adubo para evitar excessiva salinidade.

É importante promover o encurtamento da duração do enraizamento pela dificuldade em manter, durante um período longo, as condições ambientais necessárias para conservar as estacas em bom estado, como também para reduzir os custos associados. Neste sentido, propõe-se a análise de alguns factores capazes de anteciparem a iniciação das raízes. Estudos realizados com a oliveira mostraram que a juvenidade é um desses factores (PORTINGIS e THERIOS, 1976). Também vários autores constataram que a aplicação de IBA acelera o processo de formação de raízes (AL-BARAZI e SCHWABE, 1982; BLAZICH, 1988; ZACZEK *et al.*, 1997; STANKOVA e PANETSOS, 1997). Em sobreiros jovens, RIBEIRO (1994), escurecendo a zona do caule correspondente à base da futura estaca induziu alterações anatómicas e histológicas relacionadas com a formação de raízes ou de tecido caloso, indicando uma antecipação destes processos, relativamente ao material não sujeito ao tratamento.

4.5 - Intervenção na planta-mãe

No enraizamento de estacas retiradas de sobreiros jovens, a época de colheita constituiu a segunda maior fonte de variação, correspondendo o mês de Agosto às percentagens mais elevadas. Os resultados alcançados com material retirado de clones enxertados confirmaram esta tendência, apontando para Julho e Agosto como sendo as épocas com maiores sucessos de enraizamento e com mais baixa mortalidade. Na região de Évora, onde se encontra o parque de clones, os valores médios de insolação, radiação global, temperatura diária do ar e temperatura máxima são mais elevadas durante os meses de Junho, Julho e Agosto (REIS e GONÇALVES, 1987). As condições de luminosidade das plantas-mães influenciam as respostas de enraizamento (MOE e ANDERSON, 1988; CHALUPA, 1993), pois favorecendo a fotossíntese e a acumulação de reservas podem contribuir para uma melhoria na resposta do enraizamento das suas estacas. As reservas seriam utilizadas não só, no crescimento de novos rebentos, induzidos pelas podas consecutivas, como também na formação e desenvolvimento dos primórdios radiculares das estacas retiradas. É também durante Julho e Agosto que as temperaturas mínimas (nocturnas) sobem aos 15°C, valor considerado como o mínimo favorável para o enraizamento de estacas para a maioria das espécies (HARTMANN *et al.*, 1997).

Foi importante constatar o efeito do clone na capacidade de enraizamento das estacas de sobreiro. As variações observadas entre os vários clones são comparáveis com os resultados obtidos para outras espécies. Na estacaria de *Picea abies*, ROULUND (1971) obteve capacidades de enraizamento que variaram entre 3% e 39%, utilizando plantas-mães com oito anos de idade, enquanto que MILLER *et al.* (1982), com ortetos de 12 anos de *Abies fraseri*, obtiveram valores de enraizamento compreendidos entre 3% e 78%.

Parece que o efeito do clone se sobrepõe à influência da época de colheita das estacas, já que os clones com enraizamentos reduzidos não reagiram à época de colheita. As diferenças nas respostas observadas entre os clones podem ser atribuídas quer a variações no genótipo, quer a factores internos relacionados com a planta dadora (MILLER *et al.*, 1982; GREENWOOD e HUTCHISON, 1993). Para BURDON *et al.* (1992) o estado de maturação transmitido pela planta dadora constitui um dos factores que mais contribui para afectar a variabilidade clonal, sobrepondo-se mesmo ao efeito do genótipo.

A técnica da enxertia é um dos factores que pode induzir variabilidade no enraizamento de estacas, devido ao efeito de pré-condicionamento ambiental transmitido no meristema retirado da planta dadora. Num estudo realizado em

Quercus rubra, ZACZEK e STEINER (1997) constataram que a enxertia de gomo de árvores adultas não só contribuiu para aumentar a percentagem de enraizamento de estacas retiradas desses clones, como também alterou a morfologia das folhas (de adultas para juvenis), sugerindo um certo rejuvenescimento, devido, essencialmente, ao efeito do meristema enxertado e não à acção do porta-enxertos. No entanto MOON e YI (1993), sugerem que a juvenilidade do porta-enxertos seja a responsável pela uniformidade e elevado enraizamento obtidos na estacaria de *Quercus acutissima*, na qual se utilizou material retirado de plantas sujeitas a um segundo ciclo de enxertia.

Os resultados obtidos no sobreiro indicam que a acção da enxertia a nível do enraizamento é devida ao possível rejuvenescimento da árvore-mãe, constatando-se mesmo que o material rejuvenescido vai ele próprio envelhecendo ao longo do tempo. De facto, quanto menos tempo a planta tinha de enxertada, maior era o enraizamento e menor a mortalidade das suas estacas. Esta observação foi particularmente evidente com o clone 8/6-6, que em 1992, com três anos de enxertia, foi o pior e em 1993, com dois anos de enxertia, foi o melhor.

Para CHALUPA (1993) e SPETHMANN e HARMS (1993) a poda de plantas-mães de *Quercus robur* e de *Q. petraea*, de várias idades, constituiu uma técnica efectiva para produzir estacas de elevado potencial de enraizamento e sobrevivência. Esta técnica elimina a área da copa que corresponde a fases mais maduras e que contém estacas com menor capacidade de enraizamento. Em duas espécies arbustivas de difícil enraizamento, HOWARD (1996) verificou que a aplicação de uma poda intensa nos pés-mães aumentou a capacidade de enraizamento. Para este autor, o ligeiro acréscimo em diâmetro e em de matéria seca observados nos rebentos de plantas sujeitas a uma poda suave, foi o suficiente para induzir condições fisiológicas e anatômica adversas ao enraizamento.

No estudo do efeito de dois níveis de intensidade de poda, realizadas em plantas-mães de três clones de sobreiro, apenas se verificaram diferenças significativas nas interacções deste factor com a época de colheita e com o clone. Em termos de enraizamento e de mortalidade verificou-se uma preponderância do efeito do clone sobre a intensidade de poda. Os clones com menor capacidade de enraizamento não pareceram beneficiar com a aplicação de uma poda intensa dos pés-mães. Esta modalidade apenas aumentou a percentagem de formação de raízes e a sobrevivência no clone 7/8A-10, não surtindo efeitos em 7/8A-20 e aumentando por sua vez a mortalidade do 8/6-19. Também STANKOVA e PANETSOS (1997) constataram que a poda de plantas-mães de *Cupressus sempervirens* com quatro anos de idade foi prejudicial ao enraizamento, devido eventualmente, à fragilidade do material

resultante das plantas podadas, dificultando a sua sobrevivência, face às condições ambientais durante o enraizamento.

4.6 - As peroxidases como marcadores do enraizamento

A abordagem do enraizamento de estacas sob o ponto de vista bioquímico pode constituir também uma forma de melhor se compreender as variações nas respostas das estacas face a diferentes factores externos que podem influenciar o enraizamento. A variação na actividade e no padrão das peroxidases, observada por vários autores, durante a formação de raízes adventícias em culturas *in vitro* levou a considerar este sistema enzimático como um marcador bioquímico do enraizamento (GASPAR *et al.*, 1992; CALDERÓN-BALTIERRA, 1994; RIPETTI *et al.*, 1994; ROUT *et al.* 1999). Alguns autores indicam-no como um excelente marcador usado para seleccionar tratamentos indutores de enraizamento, realizar as alterações necessárias nos meios de cultura para se atingirem as diferentes fases na micropropagação. Em culturas *in vitro* de vinha e de macieira, MONCOUSIN (1988) refere que a melhor resposta de enraizamento está relacionada com uma forte actividade peroxidásica nas estacas no momento do corte.

Ao longo do processo de formação de raízes no sobreiro, comprovou-se a ocorrência de alterações na actividade total das peroxidases e no padrão da fracção das peroxidases ionicamente ligadas, de tecidos de partes basais de estacas jovens. Em termos de actividade total, observaram-se dois picos, um primeiro ao quinto dia de permanência das estacas no substrato e um segundo ao vigésimo dia, correspondente aos extractos dos segmentos das estacas com raízes emergentes. Relacionando as alterações observadas na actividade peroxidásica total e no padrão obtido constata-se que o primeiro pico pode ser atribuído, em parte, ao aumento de intensidade na expressão das isoformas neutras, enquanto que o segundo pico parece estar associado ao aumento das isoperoxidases tanto básica (B1) como ácida (A). Durante o processo de formação de raízes não se verificou um aumento contínuo na expressão desta isoperoxidase ácida, ao contrário dos resultados alcançados por GASPAR *et al.* (1992). Na realidade, a expressão desta isoenzima vai diminuindo progressivamente até ao sétimo dia para se apresentar bastante intensa, ao vigésimo dia nos extractos correspondentes às estacas com raízes já desenvolvidas. Em termos temporais, as peroxidases neutras N1, N2 e N3 parecem estar associadas à fase de indução no processo de formação da raiz. Contudo, no estudo realizado durante as primeiras 72 horas após o destacamento da estaca, verifica-se uma intensificação das três isoformas o que leva a considerar a hipótese de poderem também estar relacionadas

com a cicatrização dos tecidos após o corte da estaca. Num estudo de controlo hormonal durante o processo de germinação em *Lens culinares*, GASPAR *et al.* (1973) associaram o aumento da actividade peroxidásica total e o aparecimento de três isoperoxidasas básicas ao efeito da ferida resultante do destacamento dos cotilédones do eixo embrionário. No que respeita à isoperoxidase básica B₁, verifica-se que esta isoforma aparece associada a uma fase mais avançada do desenvolvimento radicular, na medida em que surge também como dominante nos extractos de segmentos intermédios e inferiores das estacas, assim como nas raízes. Foi estudada a hipótese destas isoformas resultarem de possíveis artefactos (confórmeros) durante o processo de extracção, em virtude do elevado conteúdo de compostos fenólicos existente no sobreiro. Os resultados do ensaio de desnaturação irreversível pelo calor (70°C) não indicaram alterações nas cargas das isoperoxidasas que caracterizam a presença de confórmeros, mas não se mostraram conclusivos relativamente à formação destes artefactos. Na realidade o grupo neutro mostrou-se completamente desnaturado quando sujeito a uma temperatura de 70°C, durante um período de 26 segundos, ao contrário de B₁ que, após dois minutos à mesma temperatura, ainda se mantinha activa.

Considera-se prematuro decidir se este sistema enzimático poderá ou não ser utilizado como marcador do processo de enraizamento na estacaria do sobreiro. No entanto é de referir que o perfil isoperoxidásico antes da formação de raízes visíveis (até ao sétimo dia desde o início do ensaio) é distinto do perfil obtido após se terem observado estacas já enraizadas. Haveria todo o interesse em estabelecer novos ensaios com o objectivo de averiguar a actividade das peroxidases e os respectivos padrões isoenzimáticos entre o sétimo e o vigésimo dia após a colocação no substrato, de forma a definir concretamente a data de início dos primeiros primórdios radiculares.

V - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Constata-se ser possível a multiplicação de sobreiros adultos por estacaria, se previamente rejuvenescidos por enxertia homoplástica de gomo em porta-enxertos jovens. Foi também possível concluir sobre quais dos factores são mais decisivos para o enraizamento de estacas.

A época mais favorável para o rejuvenescimento por enxertia foi o mês de Setembro, perspectivando-se, deste modo, a utilização desta técnica, para o estabelecimento de um parque de clones, com vista à multiplicação de sobreiros seleccionados.

Dos ensaios de estacaria retiram-se as seguintes conclusões em relação ao enraizamento:

- ausência de diferenças significativas entre as diferentes misturas de substratos estudadas;
- a temperatura do substrato é um factor fundamental para o enraizamento de estacas jovens (melhores resultados a 28°C);
- a aplicação frequente de anti-fúngicos, durante o enraizamento é indispensável, como forma de prevenir o aparecimento de doenças, dadas as elevadas condições de humidade e temperatura prevalecentes;
- a época do ano para a colheita de estacas é um factor decisivo para o sucesso do enraizamento (Julho e Agosto são os meses mais convenientes);
- a permanência das estacas em bancada de enraizamento por um período de quatro meses é a mais favorável. Uma permanência mais longa, sem qualquer aplicação de adubo, induziu uma elevada mortalidade. Para períodos superiores a três meses é importante estudar a adubação a aplicar (quer tipo libertação lenta, quer foliar);
- os efeitos do clone e da idade de enxertia do rameto são mais determinantes do enraizamento do que a época de colheita das estacas. Relativamente ao clone será importante quantificar e distinguir as componentes genotípica e ambiental transmitida pela planta dadora;

- ser indispensável uma produção contínua de enxertos, mantendo no parque de clones apenas os rametos jovens. Propõe-se um estudo que avalie o efeito no enraizamento de sucessivos ciclos de enxertia, já que a enxertia em cascata poderá conduzir também a uma melhoria da capacidade de enraizamento;
- a poda dos rametos do parque de clones, por si só, não é uma técnica efectiva para induzir o enraizamento, uma vez ser influenciada tanto pelo clone como pela época de colheita de estacas;
- estacas de plantas jovens são menos tolerantes a concentrações elevadas de IBA do que as provenientes de material de enxertia. O efeito do IBA parece independente da época do ano e do clone, devendo aprofundar-se este assunto;
- parece verificar-se uma alteração do padrão isoperoxidásico durante a formação de raízes, sendo, no entanto, prematuro considerar estas enzimas como um marcador bioquímico do enraizamento de estacas no sobreiro. Uma das dificuldades resulta da pouca uniformidade da resposta das estacas à iniciação dos primórdios radiculares. A aplicação de IBA poderá ser uma forma de obter maior uniformidade. Poderá então ser, eventualmente, possível esclarecer o interesse das peroxidases como marcadores do enraizamento na estacaria do sobreiro;

O enraizamento é o primeiro passo do estabelecimento de um processo eficaz de produção de plantas de origem vegetativa. Todavia, esse processo tem etapas subsequentes que obrigam ao estudo dos diferentes condicionalismos relativos à aclimatização, à fertilização e à transplantação, de modo a garantir a sobrevivência máxima do material enraizado.

Referências bibliográficas

- AL-SAQRI, F. e ALDERSON, P. G., 1996. Effects of IBA, Type and Rooting Media on Rooting of *Rosa centifolia*. *Journal of Horticultural Science* **71**(5): 729-737.
- AL-BARAZI, Z. e SCHWABE, 1982. Rooting Softwood Cuttings of Adult *Pistacia vera*. *Journal of Horticultural Science* **57**(2): 247-252.
- ALMEIDA, H., CHAMBEL, M. R., HENRIQUES, J. L., PEIXOTO, M., CARVALHO, V. e MARTINS, A., 1997. Estudo da Variabilidade Genética do Sobreiro em Portugal. Livro de Comunicações da "European Conference on Cork Oak and Cork" pp. 237-247, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- ALPUIM, M. e ROLDÃO, M. I., 1993. *Quercus suber* L. Breeding Strategy for Cork Quality. *Annales des Sciences Forestières* **50**(Suppl. 1): 444s-447s.
- ANÓMIMO, 1986. Perfil Florestal. Divisão de Estudos Económicos, Instituto dos Produtos Florestais, Lisboa.
- ANÓMIMO, 1997. *Quercus suber* Network Report of the Third and Fourth Meetings 9-12 June 1996, Sassari, Sardinia, Italy and 20-22 February 1997, pp. 5-22, Almoraima, Spain. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, compiladores: J. Turok, M. C. Varela e C. Hansen.
- BALOCCHI, C. E., 1996. Gain Optimisation Through Vegetative Multiplication of Tropical and Subtropical Pines. In: Dieters, M. J., Matheson, A. C., Nickes, D. G., Harwood, C. E. e Walker, S. M. (ed.) "Tree Improvement for Sustainable Tropical Forestry", Livro de comunicações da Conferência de QFRI-IUFRO, pp. 304-306, Caloundra, Queensland, Austrália, 27 de Outubro a 1 de Novembro de 1996.
- BARCELÓ, A. R., MUNOZ, R. e SABATER, F., 1987. Lupin Peroxidases I. Isolation and Characterization of Cell Wall Bound Activity. *Physiologia Plantarum* **71**: 448-454.
- BARNESCHI, L., 1977. A Criação de Raízes em Renovos de Ramos de *Quercus suber* L. *Bol. do Inst. Prod. Flor.- Cortiça* **466**: 465-470.
- BHATTACHARYA, N. C., 1988. Enzymes Activities during Adventitious Rooting. In: Davis, T. D., Haissing, B. E., Sankhla, N. (ed.) "Adventitious Root Formation in Cuttings" vol 2, pp. 88-101. Dioscorides Press, Portland, Oregon.

- BLAZICH, F. A., 1988. Chemicals and Formulations Used to Promote Adventitious Rooting. *In*: Davis, T. D., Haissing, B. E., Sankhla, N. (ed.) "Adventitious Root Formation in Cuttings" vol 2, pp. 132-149. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- BORGES, M. e CUNHA, C., 1985. A Floresta do Sobreiro, sua Cultura e Repovoamento. Perspectivas, Circuitos de Aprovisionamento. Boletim do Instituto dos Produtos Florestais **564**: 649-653.
- BURDON, R. D., BANNISTER, M. H. e LOW, C. B., 1992. Genetic Survey of *Pinus radiata*: Variance Structures and Heritabilities in Juvenile Clones. *New Zealand Journal of Forest Science* **22**(2-3): 187-210.
- CABRAL, M. T., 1989. Montados de Sobreiro que Alternativas para a sua Exploração?. *In*: "Identificação de Prioridades e Recursos de I&D sobre Cortiça" pp. 23-34. Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Lisboa, 13-14 Julho 1988.
- CALDERÓN-BALTIERRA, X. V., 1994. Changes in Peroxidase Activity During Root Formation by *Eucalyptus globulus* Shoot Raised *in vitro*. *Plant Peroxidase Newsletter* **4**: 27-29.
- CARVALHO, A., 1989. Considerações sobre Silvotecnologia em Subericultura. *In*: "Identificação de Prioridades e Recursos de I&D sobre Cortiça" pp. 81-104. Workshop organizado pela Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Lisboa, 13-14 Julho 1988.
- CARVALHO, A., 1991. Classificação e Zonagem de Qualidade das Cortiças Portuguesas. Inventariação dos Sobreiros Produtores de Cortiça de Superior Qualidade. Relatório Final do Projecto PIDDAC 002, 1988-1990. INIA-EFN.
- CHALUPA, V., 1993. Vegetative Propagation of Oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by Cutting and Tissue Cultured. *Annales des Sciences Forestières* **50**(Suppl. 1): 295s-307s.
- CORREIA, C. A. Paixão, 1955. Estudos sobre o Sobreiro em Portugal. Trabalhos em curso na Estação de Experimentação Florestal do Sobreiro. *Sep. Bol. Junta Nacional Cortiça* **200**: 1-4.
- CORREIA, C. A. P., 1959. Algumas Considerações sobre as Actividades Relativas ao Estudo do Sobreiro no ano de 1958. *Publ. Dir. Geral Serv. Flor. Aquícolas-Estudos e Informação* **112**(G-3), 29 págs.

- CORREIA, C. A. P., 1961. Reacções do Sobreiro em Face de Várias Técnicas de Propagação Vegetativa. *Sep. Publ. Dir. Geral Serv. Flor. Aquícolas* **27**(2):114-136.
- CORREIA, C. A. P., 1965. A Talhadia de Sobreiro. Resultados de um Ensaio Realizado em Portugal. *Bol. Junta Nacional Cortiça* **326**: 247-252.
- CORREIA, C. A. P., 1981. Aspectos Subericolas da Investigação ao Serviço de uma subericultura Renovada. *Bol. Inst. Prod. Flor.- Cortiça* **511**: 112-119.
- DAVIES, F. T., 1984. Shoot RNA, Cambrial Activity and Indolbutyric Acid Efectivity in Seasonal Rooting of Juvenile and Mature *Ficus pumila* Cuttings. *Physiologia Plantarum* **62**: 571-575.
- DENISON, N. P. e KIETZKA, J. E., 1993. The Development and Utilisation of Vegetative Propagation in Mondi for Commercial Afforestation Programmes. *South African Forestry Journal* **166**: 53-60.
- EDSON, J. L., WENNY, D. L., FINS e L., ROBERTS, L. W., 1996. Growth anf Form of Western Larch Stecklings: Plagiotropism and Reiteration. *Canadian Journal Forest Research* **26**: 1273-1283.
- ESAU, K., 1976. Anatomia das Plantas com Sementes. Editora Edgard Blucher, Ltda, S. Paulo, 293 págs.
- ESHED, Y. L., RIOV, J. e ATZMON, N., 1996. Rooting Oak Cuttings from Gibberelin - Treated Stock Plants. *Hostscience* **31**(5): 872-873.
- FARMER, R.E., DURST, J. T., SHAOTANG, D. e JUN-TAO, Y., 1992. Effects of Clones, Primary Ramets and Age of Stock Plants on Tamarack Rooting. *Silvae Genetica* **41**: 22-34.
- FERREIRA, M. e SANTOS, P. E. T., 1997. Melhoramento Genético Florestal dos *Eucalytus* no Brasil. Livro de Comunicações da "IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts" pp. 14-34, Salvador, Brasil de 24-29 de Agosto de 1997.
- FISHER, R.A. YATES, F., 1971. Tabelas Estatísticas para Pesquisa em Biologia, Medicina e Agricultura. Editora Polígono, S. Paulo, 150 págs.
- FOSTER, G. S., CAMPGELL, R. K. e ADAMS, W. T., 1984. Heritability, Gain and C Effects in Rooting of Western Hemlock Cuttings. *Canadian Journal Forest Research* **14**: 628-638.

- FRANCLLET, A., BOULAY, M., BEKKAOUI, F., FOURET, Y., VERSCHOORE- MARTOUZET, B. e WALKER, N., 1987. Rejuvenation. In: "Cell and Tissue Culture in Forestry" Vol. 1: "General Principles and Biotechnology", Editores J. M. Bonga e Don J. Durzan. Martinus Nijhoff Publishers: 232-248.
- GASPAR, T., KHAN, A. A. e FRIES, D., 1973. Hormonal Control of Isoperoxidases in Lentil Embryonic Axis. *Plant Physiology* **51**: 146-149.
- GASPAR, T. e COUMANS, M., 1987. Root Formation. In: Bonga J. M. e Durzan, D. J. (ed.) "Cell and Tissue Culture in Forestry" Vol. 1: "General Principles and Biotechnology" pp. 202-217. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- GASPAR, T. e HOLINGER, M., 1988. Auxin Metabolism During Adventitious Rooting. In: Davis, T. D., Haissing, B. E., Sankhla, N. (ed.) "Adventitious Root Formation in Cuttings" vol 2, pp. 117-131. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- GASPAR, T., PENEL, C., HAGEGE, D. e GREPPIN, H., 1991. Peroxidases in Plant Growth, Differentiation and Development Processes. In: Lobarzewski, J., Greppin, H., Penel, C. e Gaspar, T. (ed.) "Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases" pp. 249-280. Universidade de Geneva, Suíça.
- GASPAR, T., KEVERS, C., HAUSMAN, J. F., BERTHON, J. Y. e RIPETTI, V., 1992. Practical Uses of Peroxidase Activity as a Predictive Marker of Rooting Performance of Micropropagated Shoots. *Agronomie* **12**: 757-765.
- GOLDBERG, R., 1980. Cell Wall Polysaccharidases Activities and Growth Process: A Possible Relationship. *Physiologia Plantarum* **50**: 261-264.
- GOMES, A. L., 1989. Regeneração e Melhoramento Genético do Montado de Sobreiro. In: "Identificação de Prioridades e Recursos de I&D sobre Cortiça" pp. 67-78. Workshop organizado pela Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Lisboa, 13-14 Julho 1988.
- GONÇALVES, J. C. e RAINHO, C. M. T., 1992. Micropropagação do Sobreiro (*Q. suber* L.) por Rebentamento Axilar. Livro de Comunicações do "Segundo Encontro de Montados de Sobreiro e Azinho" pp. 109-118, Évora de 4 e 5 de Junho de 1992.
- GONÇALVES, J. C., DIOGO, G. e AMÂNCIO, S., 1998. *In vitro* Propagation of Chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): Effects of Rooting Treatments on Plant Survival,

- Peroxidase Activity and Anatomical Changes During Adventitious Root Formation. *Scientia Horticulturae* **72**: 265-275.
- GREENWOOD, M. S. e HUTCHINSON K. W., 1993. Maturation as a Developmental Process. In: Ahuja, M.R. e Libby, W. J. (ed.), "Clonal Forestry I. Genetics and Biotechnology" pp. 14-33. Springer-Verlag, Berlim, Heidelberg, New York.
- HACKETT, W. P., 1985. Juvenility, Maturation, and Rejuvenation in Woody Plants. *Horticultural Reviews* **7**: 109-155.
- HARTMANN, H., KESTER, D., DAVIES, F. e GENEVE, R., 1997. Plant Propagation. Principles and Practices. Prentice- Hall, New Jersey, 6ª edição, 770 págs.
- HOULE, G. e BABEUX, P., 1993. Temporal Variations in the Rooting Ability of Cuttings of *Populus Balsamifera* and *Salix planifolia* from Natural Clones-Populations of Subartic Quebec. *Canadian Journal Forest Research* **23**: 2603-2608.
- HOWARD, B. H., 1996. Relationships Between Shoot Growth and Rooting of Cuttings in Three Contrasting Species of Ornamental Shrub. *Journal of Horticultural Science* **71**(4): 591-605.
- IMASEKI, H. 1985. Hormonal Control of Wound-Induced Responses. In: Pharis, R. P. e Reid, D. M., "Hormonal Regulation of Development III. Role of Environmental Factors" pp. 485-512. Spring-Verlag, Berlim, Heidelberg, New York.
- JACKSON, P. e RICARDO, C.P.P., 1992. Cytochrome c Aided Resolution of *Lupinus albus* Isoperoxidases in a Cathodal Polyacrylamide Gel Electrophoresis System. *Analytical Biochemistry* **200**: 36-41.
- JACKSON, P. e RICARDO, C.P.P., 1994. An Examination of the Peroxidases from *Lupinus albus* L. Hypocotyls. *Planta* **194**: 311-317.
- JOERSBO, M., ANDERSON, J. M., OKKELS, F. T. e RAJAGOPAL, R., 1989. Isoperoxidases as Markers of Somatic Embriogenesis in Carrot Cell Suspension Cultures. *Physiologia Plantarum* **76**: 10-16.
- LAWSON, E. J.R. e POETHIG, R. S., 1995. Shoot Development in Plants: Time for a Change. Trends. *Genetics* **11**(7): 263-268.
- LEAKEY e STORETON-WEST (1992). The Rooting Ability of *Triplochiton scleroxylon* Cuttings: the Interactions Between Stock Plant Irradiance, Light Quality and Nutrients. *Forest Ecology and Management* **49**: 133-150.

- LEMOS, L., CARVALHO, A., ARAÚJO, J. A., e BORRALHO, N. M. G., 1997. Short Note: Importance of Additive Genetic and Specific Combining Ability Effects for Rooting Ability of Stem Cuttings in *Eucalyptus globulus*. *Silvae Genetica* **46**(5): 307-308.
- LOACH, K., 1988. Controlling Environmental Conditions to Improve Adventitious Rooting. In: Davis, T. D., Haissing, B. E., Sankhla, N. (ed.) "Adventitious Root Formation in Cuttings" vol 2, pp. 248-273. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- LOOMIS, W. D., 1974. Overcoming Problems of Phenolics and Quinones in the Isolation of Plant Enzymes and Organelles. *Methods Enzymology* **31**: 528-544.
- LOURO, V., 1998. Diagnóstico e Perspectiva da Administração Pública. *Lavoura Portuguesa 1988-1999*: 22-28.
- MACHADO, D. P., 1938. Contribuição para o Estudo do melhoramento da Qualidade da Cortiça. Correlações entre Alguns Caracteres da Morfologia Externa dos Órgãos dos Sobreiros e a Qualidade da Cortiça. *Publ. Dir. Geral Serv. Flor. Aquícolas* **5**: 5-36.
- MADER, M., 1980. Origin of the Heterogeneity of Peroxidase Isoenzyme Group G1 from *Nicotiana tabacum*. I. Conformation. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **96**: 283-296.
- MANZANERA, J. A., 1990. Propagacion Vegetativa de Plantulas de Alcornoque (*Quercus suber* L.) por Cultivo *in vitro*. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* **5**(3): 371-382.
- MANZANERA, J. A. e PARDOS, J. A., 1990. Micropropagation of Juvenile and Adult *Quercus suber* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **21**: 1-8.
- MARQUES, J. J. V. e REIS, R. G. N., 1987. Propagação Vegetativa do Sobreiro: Enxertia. *Bol. Inst. Prod. Flor.-Cortiça* **583**: 13-14.
- MATA, M. I. S., RIBEIRO, M. M. e ANTUNES, M. A. L., 1996. Enraizamento de Estacas de Sobreiro (*Quercus suber* L.): Efeito de Diferentes Feridas e Ácido Indolbutírico. Livro de Comunicações do "Simpósio de Propagação Vegetativa de Espécies Lenhosas" pp. 181-188. Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 18-20 de Abril de 1996.
- MATO, M. C. e VIEITEZ, A. M., 1986. Changes in Auxin Protectors and IAA Oxidases During Rooting of Chestnut Shoots *in vitro*. *Physiologia plantarum* **66**: 491-494.

- MATO, M. C., RÚA, M. L. e FERRO, E., 1988. Changes in Levels of Peroxidases and Fenolics During Root Formation in *Vitis* Cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* **72**: 84-88.
- MAYNARD, B. K. e BASSUK, N. L., 1996. Effects of Stock Plant Etiolation, Shading, Banding and Shoot Development on Histology and Cutting Propagation of *Carpinus betula* L. *fastigiata*. *Journal Amer. Soc. Hort. Sci.* **125**(5): 853-860.
- MENDES, A. S. C., 1997. Tendências de Evolução da Economia do Sector da Cortiça em Portugal. Livro de Comunicações da "European Conference on Cork Oak and Cork" pp. 469-492, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- MILLER, N. F., HINESLEY, L. E. e BLAZICH, F. A., 1982. Propagation of Fraser Fir by Stem Cuttings: Effects of Type of Cuttings, Length of Cuttings and Genotype. *Hortscience* **17**(5): 827-829.
- MOE, R. e ANDERSEN, A. S., 1988. Stock Plant Environmental and Subsequent Adventitious Rooting. *In*: Davis, T. D., Haissing, B. E., Sankhla, N. (ed.) "Adventitious Root Formation in Cuttings" vol 2, pp. 214-234. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- MONCOUSIN, C. e GASPAR, T., 1983. Peroxidase as a Marker for Rooting Improvement of *Cynara scolymus* L. Cultured *in vitro*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **178**: 263-271.
- MONCOUSIN, C., 1988. Adventitious Rhizogenesis Control: New Developments. *Acta Horticulturae* **230**: 97-104.
- MONCOUSIN, C., 1991. Rooting of Microcuttings: Fundamental Aspects. *Acta Horticulturae* **289**: 311-317.
- MONTEUUIS, O., VALLAURI, D., POUPARD, C. e CHAUVIÈRE, M., 1995. Rooting *Acacia mangium* Cuttings of Different Physiological Age with Reference to Leaf Morphology as a Phase Change Marker. *Silvae Genetica* **44**(2-3): 150-154.
- MOON, H. K. e YI, J. S., 1993. Cutting Propagation of *Quercus acutissima* Clones After Rejuvenation Through Serial Grafting. *Annales des Sciences Forestières* **50**(Suppl. 1): 314s-318s.
- MORGAN, D. L., MCWILLIAMS, E. L. e PARR, W. C., 1980. Maintaining Juvenility in Live Oak. *Hortscience* **15**(4): 493-494.

- NATIVIDADE, J. V., 1934. Cortiças, Contribuição para o Estudo do Melhoramento de Qualidade. *Publ. Dir. Geral Serv. Flor. Aquícolas* **1**: 1-143.
- NATIVIDADE, J. V., 1937. Recherches Cytologiques sur Quelques Espèces et Hybrides du Genre *Quercus*. *Bol. Sociedade Broteriana* **12**: 21-85.
- NATIVIDADE, J. V., 1939a. O Problema da Qualidade da Cortiça nos Sobreirais do Norte do Tejo. *Bol. Junta Nacional Cortiça* **8**: 5-16.
- NATIVIDADE, J. V., 1939b. O Problema da Qualidade da Cortiça nos Sobreirais do Norte do Tejo. *Bol. Junta Nacional Cortiça* **9**: 5-13.
- NATIVIDADE, J. V., 1948. Propagação Vegetativa do Sobreiro (*Quercus suber* L.). Trabalho dactilografado, 29 págs.
- NATIVIDADE, J. V., 1950. Subericultura. Ministério da Economia, Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Lisboa, 387 págs.
- NATIVIDADE, J. V., 1954. La Sélection et L'Amélioration Génétique du Chêne- Liège au Portugal. *Revue Forestière Française* **6**: 346-354.
- NÓBREGA, M. F. S., 1996. Polimorfismo Isoenzimático em *Quercus suber* L.. Contribuição para o Estudo da sua Relação com a Qualidade da Cortiça. Tese de Doutoramento em Engenharia Florestal, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 89 págs.
- NORONHA, C., ROMENO, A. e MARTINS-LOUÇÃO, M. A., 1996. Estabelecimento de um Sistema Simples de Enraizamento e Micorrização de Plântulas de Sobreiro Micropropagadas pp. 243-251, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 18-20 de Abril de 1996.
- PACHECO, P., CALDERÓN-BALTIERRA e VEGA, A., 1994. Flavonoids as Regulators and Markers of Root Formation by Shoots of *Eucalyptus globulus* Raised *in vitro*. *Plant Peroxidase Newsletter* **5**: 9-11.
- PALMA, P., 1976. O Melhoramento da Produção Suberícola. *Bol. Inst. Prod. Flor.-Cortiça* **458**: 269-270.
- PEARCE, S. C. 1978. Introduction a la Statistique en Biologie. Editions S.E.I. C.N.R.A.-Versailles, 260 págs.

- PEIXE, A., CAVALEIRO, C., MENDES, A. e GONÇALVES, J. C., 1996. Influência do Genótipo, Idade da Planta Mãe e Posição do Explante Inicial, na Capacidade de Multiplicação *in vitro* do Sobreiro (*Quercus suber* L.). Livro de Comunicações do "Simpósio de Propagação Vegetativa de Espécies Lenhosas" pp. 228-234, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 18-20 de Abril de 1996.
- POETHIG, R. S., 1990. Phase Change and the Regeneration of Shoot Morphogenesis. in Plants. *Science* **250**: 923-930.
- PORLINGIS, I.C. e THERIOS, I. 1976. Rooting Response of Juvenile and Adult Leafy Olive Cuttings to Various Factors. *Journal Horticultural Science* **51**: 31-39.
- POISSONNIER, M., 1978. Essais Préliminaires sur le Bouturage du Chataignier. *AFoCel* 1978: 265-275.
- POUPARD, C., CHAUVIÈRE, M. e MONTEUUIS, O., 1994. Rooting *Acacia mangium* Cuttings: Effects of Age, Within-Shoot Position and Auxin Treatment. *Silvae Genetica* **43**(4): 226-231.
- REIS, R.M.M. e GONÇALVES, M. Z., 1987. O Clima de Portugal. Caracterização Climática da Região Agrícola do Alentejo. Fascículo XXXIV, Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica.
- RIBEIRO, M. M. A. R., 1993. Ensayo de Enraizamento de Estaquillas del Alcornoque (*Quercus suber* L.). Livro de Comunicações do Congresso Florestal Espanhol, vol.2, pp233-238, Lourizán.
- RIBEIRO, M. M. A. R., 1994. Propagação do Sobreiro (*Quercus suber* L.) por Estacaria. Tese de Mestrado em Produção Vegetal, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 109 págs.
- RIPETTI, V., KEVERS, C. e GASPAR, T., 1994. Two Successive Media for the Rooting of Walnut Shoots *in vitro*. Changes in Peroxidase activity and in Ethylene Production. *Adv. Hort. Sci.* **8**: 29-32.
- ROBERTS, A. N. e FUCHIGAMI, L. H., 1973. Seasonal Changes in Auxin Effect on Rooting of Douglas-Fir Stem Cuttings as Related to Bud Activity. *Physiologia plantarum* **28**: 215-221.

- RODRIGUES, J. F., 1989. Montados de Sobro. *In*: "Identificação de Prioridades e Recursos de I&D sobre Cortiça" pp. 35-44. Workshop organizado pela Fundação Luso-Americana para o desenvolvimento, Lisboa.
- ROLDÃO, I. F., 1986. Perspectivas para o Melhoramento Florestal da Espécie *Quercus suber* L. Livro de Comunicações do "I Congresso Florestal Nacional" pp. 117-119, Lisboa.
- ROLDÃO, I. F., 1990. Macropropagação Vegetativa do Sobreiro por Estacaria. Livro de Comunicações do "II Congresso Florestal Nacional" pp. 477-481, Porto.
- ROLDÃO, I. F., ALPUIM, M. e BOHM, J., 1992. Considerações Sobre os Resultados já Obtidos na Propagação Vegetativa do Sobreiro. Estacaria e Enxertia. *Scientia gerundensis* **18**:85-89.
- ROLDÃO, I. F. e SOUILLART, A., 1994. Influência de Alguns Factores na Capacidade de Enraizamento de Estacas de Sobreiro. *Silva Lusitana* **2**(1): 101-108.
- ROLDÃO, I. F., JACKSON, P. e RICARDO, C. P. P., 1996. Developmentally Regulated Peroxidases of *Quercus suber* L. Livro de Comunicações do "IV International Symposium 1996 Plant Peroxidases, Biochemistry and Physiology" pp. 255-258, "University of Agriculture, Vienna, University of Geneva".
- ROMANO, A., MARTINS-LOUÇÃO, A., 1992. Micropropagation of Mature Cork-Oak (*Quercus suber* L.): Establishment Problems. *Scientia gerundensis*, **18**: 17-27.
- ROMANO, A., NORONHA, C., CAÇORINO, A. I. e MARTINS-LOUÇÃO, A., 1992. Técnicas de Propagação Aplicadas ao Melhoramento do Sobreiro. Livro de Comunicações do "Segundo Encontro de Montados de Sobro e Azinho" pp. 196-202, Évora, 4 e 5 de Junho de 1992.
- ROMANO, A. M. L., 1994. Estudos in vitro em *Quercus suber* L. Micropropagação, Micorrização e Conservação. Tese de Doutoramento e Biologia (Biotecnologia Vegetal). Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 281 págs.
- ROMANO, A., GRAÇA, Y., PEREIRA, H. e MARTINS-LOUÇÃO, M. A., 1996. Alterações Morfológicas nas Folhas Durante a Aclimatização de Plântulas de Sobreiro. Livro de Comunicações. Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 18-20 de Abril de 1996.
- ROULUND, H. 1971. Experiments with Cuttings of *Picea abies*, *Picea sitchensis* and the Hybrid *Picea omorika* x *sitchensis*. *Forest Tree Improvement* **3**: 25-57.

- ROUT, G. R., SAMANTARY, S. e DAS, P., 1999. Root Induction in Microshoots of *Simarouba glauca* L. *in vitro* as a Marker for Rooting. *Silvae Genetica* **48**(1):14-17.
- SANTOS, J. B., 1944. Segregação dos Híbridos *Quercus cerris* X *suber*. *Bol. Junta Nacional Cortiça* **64**: 149-153.
- SCHMIDTLING, R. C., 1981. The Inheritance of Precocity and its Relationship with Growth in Loblolly Pines. *Silvae Genetica* **30**(6): 188-192.
- SIEGEL, S. e CASTELLAN Jr, N.J., 1988. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGraw-Hill International Editions, 399 págs.
- SOKAL, R. R. e ROHLF, F. J., 1981. Biometry. W. H. Freeman and Company, New York, 859 págs.
- SPETHMANN, W. e HARMS, P., 1993. Influence of Fertilized Substrate on Rooting and Growth of Oak Cuttings. *Annales des Sciences Forestières* **50**(Suppl. 1): 308s-313s.
- STANKOVA, T. e PANETSOS, K., 1997. Vegetative Propagation of *Cupressus sempervirens* L. of Cretan Origin by Softwood Stem Cuttings. *Silvae Genetica* **46**(2-3): 137-144.
- STEEL, R.G.D. e TORRIE, J. L., 1980. Principles and Proceedings of Statistics. A Biometrical Approach. McGraw-Hill, 633 págs.
- STELZER, H. E. e GOLDFARB, B., 1997. Implementing Clonal Forestry in the Southeastern United States: SREG Satellite Workshop Summary Remarks. *Canadian Journal Forest Research* **27**: 442-446.
- TIMMIS, M. M., EL-NIL, A. e STONECYPHER, R. W., 1987. Potential Genetic Gain Througer Tissue Culture. In: Bonga, J. M., Durzan, D. Y. (Ed.) "Cell and Tissue Culture in Forestry" Vol. 1 "General Principles and Biotechnology" pp. 198-215, Martins, Ni Yhoff, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- TORIBIO, M., CELESTINO, C. e GUIJARRO, B. F., 1992. Reproducción Vegetativa del Alcornoque. Livro de Comunicação do "Simpósio Mediterrâneo sobre Regeneración del Monte Alcornocal" pp. 216-218, Mérida, Montargil e Sevilla.
- VALDECANTOS, J. L. G., 1992. Las Técnicas de Selección y Propagación en la Mejora Genética del Alcornoque. *Scientia Gerundensis* **18**: 11-15.

- VARELA, M. C. e ERIKSSON, G., 1995. Multipurpose Gene Conservation in *Quercus suber*- a Portuguese Example. *Silvae Genetica* **44**(1): 28-37.
- VARELA, M. C. e VALDIVIESSO, T., 1996. Phenological Phases of *Quercus suber* L. Flowering. *Forest Genetics* **3**(2): 93-102.
- VARELA, M. C., 1997. Regions of Provenance for Cork Oak in Portugal. In: *Quercus suber* Network. Report of the third and fourth Meetings 9-12 June 1996, Sassari, Sardinia, Italy and 20-22 February 1997, Almoraima, Spain. Compiladores J. Turok, M. C. Varela e C. Hansen. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy: 37-42.
- WENDEL, J. F. e WEEDEN, 1989. Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. In: Soltis, D. E. e Soltis, P. S. (ed.) "Isozymes in Plant Biology" pp. 5-45, Chapman and Hall, London.
- WILCOX, J. R. e FARMER, R. E., 1968. Heritability and C effects in Early Root Growth of Eastern Cottonwood Cuttings. *Heritability* **23**: 239-245.
- ZACZEK, J. J. e STEINER, K. C., 1997. Grafting-Mediated Meristem Selection Influences Rooting Success of *Quercus rubra*. *Canadian Journal Forest Research* **27**(1): 86-90.
- ZACZEK, J. J., HEUSER, C. W. e STEINER, K. C., 1997. Effect of Shade Levels and IBA During the Rooting of Eight Tree Taxa. *J. Environ Hort.* **15**(1): 56-60.
- ZOBEL, B., 1992. Vegetative Propagation in Production Forestry. *Journal of Forestry* **90**(4): 29-33.
- ZOBEL, B. e TALVERT, J., 1984. Applied Forest Tree Improvement. J. Wiley & Sons, New York, 505 págs.

ANEXO I

Critério de pontuação ponderada utilizado para a qualificação da cortiça das árvores seleccionadas

PARTICULARIDADES DO VENTRE

Cor

Clara (amarelada)	0 pontos
Amarela-dourada	5 "
Escura (acastanhada)	10 "

Relevo

Acidentado geral

Suave e uniforme	0 "
Uniforme e medianamente acidentado	5 "
Desigual e acidentado	10 "
Muito acidentado	15 "

Lenticulas (porosidade)

Tipo	
Circulares e planas	
Sem lábios evidentes	0 "
Com lábios evidentes	
Direitos	5 "
Revirados	10 "
Circulares salientes	
Com lábios abertos e revirados (bofe)	40 "
Com lábios fechados e retraídos (frouxa)	30 "
Elípticas pouco salientes	
Com lábios abertos direitos	20 ou 10 "
Com lábios abertos revirados	25 ou 15 "
Circulares deprimidas	
Elípticas com forte projecção exterior	30 "
Com inclusões duras (preguentas)	40 "
Sem inclusões (frouxas)	30 "
Tamanho e variação	
Pequenas	10 "
Médias	20 "
Grandes	30 "
Muito grandes	40 "
Agregação	
Sobretudo solitárias	0 "
Por vezes agregadas e coalescentes	10 "
Frequentemente agregadas e confluentes	20 "
Oclusão	
Moles (pulverulentas)	0 "
Duras (esclerosas)	10 "
Densidade	
Baixa (pouco numerosas)	0 "
Média (numerosas)	15 "
Alta (muito numerosas)	30 "
Distribuição	
Uniforme	0 "
Pouco desigual	10 "
Muito desigual	20 "

Incrustações

Presença-tipo			
Ausentes		0 pontos	
Esclerosas		5	"
Pregosas		10	"
Superficiais		5	"
Profundas		10	"
Tamanho			
Pequenas		0	"
Médias		5	"
Grandes		10	"
Densidade			
Pouco numerosas		0	"
Numerosas		5	"
Muito numerosas		10	"

ESTRUTURA DA MASSA**Inclusões**

Presença-tipo			
Ausentes		0	"
Preguentas		10	"
Madeirentas		10	"
Preguentas e madeirentas		20	"
Tamanho			
Pequenas		5	"
Médias		20	"
Grandes		35	"
Densidade			
Pouco numerosas		5	"
Numerosas		25	"
Muito numerosas		45	"

Canais lenticulares

Forma			
Direitos		0	"
Cônicos		10	"
Tamanho			
Finos		0	"
Médios		15	"
Largos		30	"
Densidade			
Pouco numerosos		0	"
Numerosos		10	"
Muito numerosos		20	"
Espasmos (expansões)			
Solitários		0	"
Seriados		5	"
Multianelados		20	"
Tamanho			
Pequenos		5	"
Médios		10	"
Grandes		25	"
Muito grandes		40	"
Densidade			
Pouco numerosos		5	"
Numerosos		20	"
Muito numerosos		35	"

Nota: para cada um dos tipos e tamanhos, bem como para a ocorrência relativa, somar tipo e tamanho e determinar percentagens.

Camadas de criação

Definição		
Distintas mas indefinidas	0 pontos	
Distintas mas definidas	2	"
Distintas mas muito definidas	5	"
Regularidade da largura		
Regular	0	"
Irregular	5	"
Ondulação do contorno		
Liso	0	"
Ondulado	5	"
Sinuoso (com picos)	10	"

Alterações cromáticas

Tipo (cor)		
Indistinto	0	"
Marmoreado	5	"
Manchado	10	"
Intensidade (da cor)		
Fraca	0	"
Média	5	"
Forte	10	"
Extensão (superficial)		
Pequena (sem vestígios)	0	"
Média	5	"
Grande	10	"

Verde

Intensidade (deformação)		
Indistinto	0	"
Distinto	10	"
Muito distinto	20	"
Extensão (superficial)		
Fraca 5	"	
Média 20	"	
Forte 35	"	
Distribuição (articular com extensão fraca)		
Pequena	5 ou 0	"
Média	20 ou 5	"
Grande	35 ou 10	"

Linha da barriga

Lisa	0	"
Ondulada	5	"
Sinuosa (com "picos")	10	"

Cor

Clara	0	"
Média	5	"
Intensa	10	"

PARTICULARIDADES DA COSTA**Relevo**

Em depressão (fendimento)		
Intensidade-tipo		
Fendida	10 pontos	
Rachada	20	"
Gretada	25	"
Enguiada	30 pontos	
Picado-intensidade		
Fraca	5	"
Média	15	"
Forte	25	"

Necrosado-intensidade			
	Fraca		5 pontos
	Média		15 "
	Forte		30 "
Em elevação (granitado)			
Tipo			
	Cristado		20 "
	Vulcanado		10 "
Intensidade			
	Fraca		15 "
	Média		25 "
	Forte		35 "
Fio da cortiça			
Inclinação do fio			
	Fraca (<5/100)		0 "
	Média (5-15/100)		10 "
	Forte (>15/100)		20 "
OUTRAS CARACTERÍSTICAS			
Espessura da cortiça			
	Delgadinha (< 22 mm)		0 "
	Delgada (22-27 mm)		10 "
	Meia marca (27-32 mm)		30 "
	Marca (32-40 mm)		30 "
	Grossa (40-54 mm)		30 "
	Triângulo (> 54 mm)		30 "
Densidade (aparente)			
	Excessivamente leve (bofe ou frouxa: <0,150)		10 "
	Leve (algo frouxa: 0,150-0,200)		10 "
	Normal (0,200-0,250)		20 "
	Pesada (preguenta ou madeirenta: 0,250-0,300)		10 "
	Muito pesada (preguenta e madeirenta: >0,300)		20 "
Defeitos acidentais			
Tipo			
	Cortiça cobrilhada		20 "
	Cortiça formigada		20 "
	Cortiça picada		20 "
	Cortiça folhada		5 "
	Cortiça preguenta		5 "
Intensidade (só aplicável na classificação da prancha)			
	Forte		20 "
	Média		10 "
	Fraca		5 pontos
<hr/>			
Pontuação total			

ANEXO II

Resultados dos ensaios de enxertia de gomo realizados em 1989, 1992, 1993 e 1994, em que se estudou, ao longo destes anos, o efeito da época de enxertia nos pegamentos.

Ano de enxertia	Época de enxertia	Pegamentos (%)
1989	Junho/Julho	44,0
		38,0
		53,0
		45,0
		43,0
		50,0
		48,0
		58,0
		46,0
		38,0
	48,0	
	Setembro	52,0
		50,0
		54,0
1992	Junho/Julho	38,0
		42,0
		42,0
		32,0
		30,0
		38,0
		16,0
		36,0
		24,0
		30,0
		38,0
		20,0
	Setembro	70,0
		43,0
		50,0
		60,0
		50,0
		70,0
70,0		
53,0		
50,0		
67,0		

ANEXO II (continuação)

Ano de enxertia	Época de enxertia	Pegamentos (%)
1993	Junho/Julho	44,0
		38,0
		34,0
		42,0
		40,0
		44,0
		50,0
1993	Junho/Julho	46,0
		40,0
		42,0
		44,0
		36,0
		38,0
		38,0
		38,0
		56,0
		Setembro
	43,0	
	50,0	
	50,0	
	53,0	
	50,0	
	57,0	
	70,0	
	43,0	
	57,0	
	1994	Junho/Julho
36,0		
36,0		
36,0		
38,0		
36,0		
34,0		
36,0		
40,0		
44,0		

ANEXO II (continuação)

Ano de enxertia	Época de enxertia	Pegamentos (%)
1994 (cont.)	Junho/Julho (cont.)	44,0
		42,0
		30,0
		38,0
		40,0
	Setembro	57,0
		50,0
		53,0
		47,0
		50,0
		43,0
		43,0
		50,0
		43,0
		50,0
		50,0
		47,0
		50,0
		50,0
		50,0

ANEXO III

Resultados dos ensaios de enraizamento de estacas de plantas jovens em que se estudaram o mês de colheita, os substratos, a concentração de IBA, a temperatura do substrato e o ensombramento. **CR**- percentagem de estacas com raiz, **CC**- percentagem de estacas que formaram *callus*, **SR**- percentagem de estacas sem resposta e **MO**- percentagem de estacas mortas.

Ensaio	Mês de colheita	Substrato	IBA (%)	Temp °C	Emsombramento	Repetição	CR*	CC*	SR*	MO*								
de ensombramento (1/89)	Maio	1Turfa:1perlite	1 (pó)	25	Sim	1	10,00											
						2	2,50											
						3	5,00											
					Não	1	22,50											
						2	15,00											
						3	12,50											
de substrato (2/89)	Junho	Perlite	1 (pó)	25	Não	1	7,50											
						2	0,00											
						3	5,00											
		Turfa				1	10,00											
						2	7,50											
						3	2,50											
		1Turfa:1perlite				1	2,50											
						2	0,00											
						3	10,00											
		Areia				1	12,50											
						2	12,50											
						3	15,00											
		2Turfa:1perlite				1	10,00											
						2	12,50											
						3	15,00											
		1Turfa:1leca				1	9,00											
						2	5,00											
						3	2,50											
		de aplicação de IBA (3/89)				Agosto	1Turfa:1perlite				1 (pó)	28	Não	1	45,00	10,00	45,00	0,00
														2	55,00	7,50	35,00	2,50
														3	52,50	22,50	25,00	0,00
											1 (liq)			1	55,00	17,50	25,00	2,50
														2	57,50	27,50	15,00	0,00
														3	52,50	15,00	32,50	0,00

* Nos ensaios 1/89, 2/89, 1/90 e 2/90 não se realizaram as contagens nas variáveis assinaladas.

ANEXO III (continuação)

Ensaio	Mês de colheita	Substrato	IBA (%)	Temp °C	Emsombramento	Repetição	CR	CC*	SR*	MO*			
de aplicação de IBA (3/89)	Agosto	1Turfa:1perlite	1 (pó)	25	Não	1	25,00	20,00	55,00	0,00			
						2	50,00	20,00	30,00	0,00			
						3	27,50	15,00	50,00	7,50			
			1 (liq)			1	47,50	20,00	27,50	5,00			
						2	15,00	15,00	67,50	2,50			
						3	22,50	17,50	60,00	0,00			
de substrato (4/89)	Agosto	Turfa	1 (pó)	28	Não	1	50,00	15,00	27,50	7,50			
						2	62,50	12,50	25,00	0,00			
						2Turfa:1perlite	1	67,50	15,00	12,50	5,00		
							2	75,00	15,00	10,00	0,00		
							3	62,50	22,50	15,00	0,00		
						1Turfa:1leca	1	30,00	20,00	45,00	5,00		
		2	57,50	30,00	5,00		7,50						
		3	50,00	22,50	25,00		2,50						
		Turfa	25	1 (pó)	25	Não	1	30,00	12,50	55,00	2,50		
							2	32,50	20,00	47,50	0,00		
							2Turfa:1perlite	1	37,50	15,00	45,00	2,50	
								2	40,00	25,00	32,50	2,50	
3	22,50							15,00	57,50	5,00			
1Turfa:1leca	1						50,00	17,50	32,50	0,00			
	2	30,00	30,00	35,00	5,00								
	3	32,50	12,50	42,50	12,50								
de substrato (5/89)	Outubro	Turfa	1 (pó)	28	Não	1	57,50	17,50	20,00	5,00			
						2	47,50	20,00	32,50	0,00			
						3	45,00	30,00	22,50	2,50			
						4	22,50	50,00	22,50	5,00			
		2Turfa:1perlite				1	62,50	17,50	12,50	7,50			
						2	50,00	40,00	7,50	2,50			
						3	50,00	35,00	17,50	0,00			
						4	12,50	42,50	37,50	7,50			
		1Turfa:1leca				1	52,50	37,50	7,50	2,50			
						2	57,50	27,50	12,50	2,50			
						3	52,50	30,00	17,50	0,00			
						4	40,00	35,00	20,00	5,00			
		Perlite				1	60,00	22,50	15,00	2,50			
						2	57,50	22,50	17,50	2,50			
						3	52,50	27,50	20,00	0,00			
						4	30,00	35,00	35,00	0,00			
		Turfa		25		1 (pó)	25	Não	1	30,00	27,50	20,00	22,50
									2	7,50	45,00	47,50	0,00
									3	7,50	47,50	42,50	2,50
									4	10,00	65,00	20,00	5,00

ANEXO III (continuação)

Ensaio	Mês de colheita	Substrato	IBA (%)	Temp °C	Emsombramento	Repetição	CR	CC*	SR*	MO*
de substrato (5/89)	Outubro	2Turfa:1perlite	1 (pó)	25	Não	1	17,50	22,50	37,50	22,50
						2	12,50	42,50	40,00	5,00
						3	5,00	42,50	47,50	5,00
						4	2,50	72,50	12,50	12,50
		1Turfa:1leca	1 (pó)	25	Não	1	12,50	35,00	32,50	20,00
						2	7,50	42,50	40,00	10,00
						3	2,50	42,50	47,50	7,50
						4	10,00	32,50	57,50	0,00
	Perlite					1	22,50	37,50	22,50	2,50
						2	2,50	72,50	12,50	12,50
						3	2,50	75,00	22,50	0,00
de conc. de IBA (1/90)	Abril	1Turfa:1perlite	0,5 (liq)	28	Não	1	35,00			
						2	22,50			
						3	2,50			
			1 (liq)			1	17,50			
						2	2,50			
						3	12,50			
			2 (liq)			1	12,50			
						2	15,00			
						3	20,00			
			4 (liq)			1	10,00			
						2	5,00			
						3	2,50			
			8 (liq)			1	5,00			
						2	7,50			
						3	2,50			
			de conc. de IBA (2/90)			Novembro	1Turfa:1perlite	0,5 (liq)	28	Não
2	20,00									
1 (liq)	1	15,00								
	2	17,50								
2 (liq)	1	17,50								
	2	7,50								
4 (liq)	1	7,50								
	2	5,00								
8 (liq)	1	20,00								
	2	22,50								

ANEXO IV

Resultados dos ensaios de enraizamento de estacas de plantas enxertadas realizados em 1992, em que se estudaram o mês de colheita de estacas, a duração do ensaio, a concentração de IBA e a origem da planta mãe, **CR**- percentagem de estacas com raiz, **CC**- percentagem de estacas que formaram *callus*, **SR**- percentagem de estacas sem resposta e **MO**- percentagem de estacas mortas.

Ensaio	Mês de Colheita	Duração do ensaio (meses)	IBA (%)	Origem pé-mãe	Repetição	CR	CC	SR	MO
de mês de colheita e de duração do ensaio (1/92)	Maio	1	1	Enxertia	1	10,71	25,00	64,29	0,00
					2	0,00	17,86	82,14	0,00
					3	3,57	14,29	82,14	0,00
		2			1	14,29	10,71	71,43	3,57
					2	14,29	3,57	75,00	7,14
					3	3,57	14,29	57,14	25,00
		3			1	10,71	0,00	35,71	53,57
					2	10,71	57,14	21,43	10,71
					3	21,43	14,29	32,14	32,14
					4	7,14	25,00	50,00	17,86
					5	14,29	7,14	25,00	53,57
					6	35,71	17,86	32,14	14,29
	Junho	1	1		1	0,00	17,86	82,14	0,00
					2	0,00	14,29	85,71	0,00
					3	0,00	17,86	82,14	0,00
			2		1	0,00	42,86	50,00	7,14
					2	0,00	28,57	46,43	25,00
					3	7,14	39,29	46,43	7,14
		3	1		10,71	14,29	64,29	10,71	
			2		25,00	28,57	46,43	0,00	
			3		7,14	25,00	60,71	7,14	
		1	1		1	3,57	39,29	57,14	0,00
					2	0,00	32,14	67,86	0,00
					3	3,57	32,14	64,29	0,00
			2		4	14,29	42,86	42,86	0,00
					1	25,00	39,29	35,71	0,00
					2	10,71	46,43	32,14	10,71
		2	1		3	3,57	25,00	57,14	14,29
					4	10,71	35,71	50,00	3,57

ANEXO IV (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	Duração do ensaio (meses)	IBA (%)	Origem pé-mãe	Repetição	CR	CC	SR	MO					
de mês de colheita e de duração do ensaio (1/92)	Julho	3	1	Enxertia	1	14,29	25,00	42,86	17,86					
					2	17,86	14,29	50,00	17,86					
					3	0,00	42,86	42,86	14,29					
					4	21,43	10,71	60,71	7,14					
					5	10,71	10,71	75,00	3,58					
					6	14,29	17,86	64,29	3,56					
					7	7,14	35,71	57,14	0,01					
					8	3,57	42,86	53,57	0,00					
					9	3,57	35,71	57,14	3,58					
					10	3,57	25,00	57,14	14,29					
					11	0,00	25,00	50,00	25,00					
	Agosto	2	2	2	Enxertia	1	14,29	25,00	60,71	0,00				
						2	14,29	35,71	50,00	0,00				
						3	21,43	25,00	50,00	3,57				
						4	3,57	32,14	60,71	3,57				
						1	14,29	50,00	32,14	3,57				
						2	17,86	17,86	53,57	10,71				
						3	17,86	39,29	42,86	0,00				
						4	25,00	39,29	35,71	0,00				
						1	28,57	28,57	42,86	0,00				
						2	21,43	21,43	53,57	3,57				
						3	10,71	42,86	35,71	10,71				
		3	3	1	Enxertia	1	28,57	28,57	42,86	0,00				
						2	21,43	21,43	53,57	3,57				
						3	10,71	42,86	35,71	10,71				
						4	7,14	25,00	50,00	17,86				
						5	21,43	28,57	50,00	0,00				
						6	28,57	39,29	32,14	0,00				
						7	25,00	21,43	50,00	3,57				
						8	32,14	28,57	39,29	0,00				
						9	21,43	21,43	57,14	0,00				
						10	28,57	32,14	35,71	3,58				
						11	14,29	25,00	50,00	10,71				
						12	17,86	14,29	67,86	0,00				
						1	14,29	32,14	46,43	7,14				
						2	14,29	42,86	42,86	0,00				
						3	21,43	39,29	35,71	3,57				
						4	28,57	46,43	25,00	0,00				
						4	4	1	Enxertia	1	17,86	25,00	53,57	3,57
										2	32,14	21,43	35,71	10,71
3										10,71	17,86	67,86	3,57	

Anexo IV (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	Duração do ensaio (meses)	IBA (%)	Origem pé-mãe	Repetição	CR	CC	SR	MO	
de mês de colheita e de duração do ensaio (1/92)	Agosto	4	1	Enxertia	4	14,29	46,43	32,14	7,14	
			2		1	25,00	53,57	21,43	0,00	
			2		2	35,71	28,57	28,57	7,14	
			3		3	46,43	28,57	25,00	0,00	
			4		4	28,57	25,00	46,43	0,00	
	Setembro	3	1		1	1	3,57	0,00	96,43	0,00
					2	2	14,29	14,29	60,71	10,71
					3	3	0,00	14,29	82,14	3,57
					4	4	7,14	25,00	53,57	14,29
					5	5	0,00	21,43	71,43	7,14
					6	6	0,00	7,14	78,57	14,29
					7	7	3,57	25,00	67,86	3,57
					8	8	10,71	25,00	53,57	10,72
					9	9	7,14	28,57	57,14	7,15
					10	10	7,14	32,14	53,57	7,15
					11	11	14,29	46,43	17,86	21,42
					12	12	3,57	3,57	85,71	7,15
					13	13	3,57	3,57	50,00	42,86
					14	14	3,57	3,57	71,43	21,43
					15	15	3,57	10,71	60,71	25,01
				16	16	10,71	3,57	64,29	21,43	
				17	17	3,57	3,57	82,14	10,72	
				18	18	0,00	7,14	85,71	7,15	
				19	19	3,57	10,71	71,43	14,29	
			2	1	0,00	3,57	71,43	25,00		
				2	0,00	14,29	75,00	10,71		
				3	3,57	21,43	53,57	21,43		
				1	28,57	7,14	53,57	10,71		
				2	14,29	10,71	64,29	10,71		
			4	1	3	17,86	14,29	64,29	3,57	
					4	25,00	21,43	46,43	7,14	
					1	7,14	21,43	60,71	10,71	
					2	0,00	7,14	60,71	32,14	
					3	0,00	3,57	75,00	21,43	
				4	0,00	0,00	75,00	25,00		
				2	1	10,71	10,71	35,71	42,86	
					2	21,43	7,14	32,14	39,29	
	3	10,71			21,43	46,43	21,43			
	1	3,57			0,00	32,14	64,29			
	2	0,00	3,57		60,71	35,71				
	5	1	3	7,14	7,14	32,14	53,57			
			4	7,14	7,14	46,43	39,29			
2		1	3,57	0,00	32,14	64,29				
		2	0,00	3,57	60,71	35,71				

ANEXO IV (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	Duração do ensaio (meses)	IBA (%)	Origem pé-mãe	Repetição	CR	CC	SR	MO	
de mês de colheita e de duração do ensaio (1/92)	Outubro	3	1	Enxertia	1	7,14	28,57	64,29	0,00	
					2	17,86	21,43	53,57	7,14	
					3	7,14	39,29	50,00	3,57	
					4	17,86	10,71	71,43	0,00	
					5	21,43	25,00	21,43	32,14	
					6	25,00	10,71	17,86	46,43	
					7	10,71	10,71	42,86	35,72	
					8	25,00	7,14	21,43	46,43	
					9	14,29	10,71	21,43	53,57	
					10	17,86	25,00	14,29	42,85	
					11	10,71	17,86	10,71	60,72	
					12	10,71	25,00	10,71	53,58	
	4	1	14,29	14,29	50,00	21,43				
		2	10,71	17,86	42,86	28,57				
		3	14,29	10,71	42,86	32,14				
		4	14,29	14,29	64,29	7,14				
		1	3,57	0,00	71,43	25,00				
		2	7,14	14,29	50,00	28,57				
		3	10,71	3,57	28,57	57,14				
		4	3,57	7,14	35,71	53,57				
de concent. de IBA (2/92)	Junho	3	0	Enxertia	1	3,57	10,71	71,43	14,29	
					2	7,14	25,00	67,86	0,00	
					3	3,57	14,29	50,00	32,14	
					1	3,57	25,00	67,86	3,57	
			2		14,29	39,29	42,86	3,56		
			3		10,71	21,43	46,43	21,43		
			1		3,57	10,71	32,14	53,58		
			2		14,29	35,71	46,43	3,57		
			3		3,57	14,29	53,57	28,57		
			1		7,14	10,71	50,00	32,15		
			2		7,14	21,43	60,71	10,72		
			3		7,14	14,29	71,43	7,14		
			1		0,00	0,00	28,57	71,43		
			2		0,00	7,14	32,14	60,72		
			3		0,00	32,14	60,71	7,15		
			Agosto		0	1	21,43	32,14	46,43	0,00
						2	7,14	28,57	64,29	0,00
						3	7,14	25,00	67,86	0,00
						4	3,57	21,43	75,00	0,00
						1	14,29	32,14	53,57	0,00
	2	28,57		46,43		21,43	3,57			
	3	14,29		50,00		35,71	0,00			
	4	14,29		53,57		28,57	3,57			
	0.5	0.5	1	14,29	32,14	53,57	0,00			
			2	28,57	46,43	21,43	3,57			
			3	14,29	50,00	35,71	0,00			
			4	14,29	53,57	28,57	3,57			

ANEXO IV (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	Duração do ensaio (meses)	IBA (%)	Origem pé-mãe	Repetição	CR	CC	SR	MO			
de concent. de IBA (2/92)	Agosto	5	1	Enxertia	1	17,86	25,00	42,86	14,28			
					2	14,29	60,71	21,43	3,57			
					3	14,29	46,43	39,29	0,00			
					4	21,43	53,57	25,00	0,00			
			2		1	25,00	50,00	25,00	0,00			
					2	17,86	35,71	42,86	3,57			
					3	17,86	35,71	46,43	0,00			
					4	25,00	28,57	42,82	3,61			
			4		1	17,86	39,29	42,86	0,00			
					2	25,00	32,14	39,29	3,57			
					3	3,57	32,14	57,14	7,15			
					4	10,71	28,57	53,57	7,15			
			Outubro		0	5	0	1	0,00	3,57	89,29	7,14
								2	0,00	0,00	100,00	0,00
								3	10,71	17,86	71,43	0,00
								4	0,00	7,14	89,29	3,57
	0.5	1					14,29	10,71	71,43	3,57		
		2					3,57	7,14	78,57	10,72		
		3					0,00	14,29	78,57	7,14		
		4					7,14	21,43	64,29	7,14		
	1	1			0,00		28,57	71,43	0,00			
		2			10,71		25,00	57,14	7,15			
		3			0,00		14,29	82,14	3,57			
		4			3,57		21,43	75,00	0,00			
	2	1			3,57		25,00	71,43	0,00			
		2			3,57		32,14	64,29	0,00			
		3			3,57		57,14	28,57	10,72			
		4			10,71		35,71	46,43	7,15			
	4	1	21,43		10,71	57,14	10,72					
		2	3,57		25,00	71,43	0,00					
		3	7,14		35,71	53,57	3,58					
		4	25,00		7,14	32,14	35,71					
de mês de colheita e duração do ensaio (3/92)	Julho	1	1	Jovem	1	0,00	28,57	67,86	3,57			
					2	7,14	7,14	85,71	0,00			
					3	17,86	17,86	64,29	0,00			
					4	0,00	21,43	78,57	0,00			
					1	7,14	10,71	53,57	28,57			
					2	7,14	7,14	46,43	39,29			
	2	3			7,14	3,57	14,29	75,00				
		4			3,57	3,57	32,14	60,71				
		4			25,00	7,14	32,14	35,71				

ANEXO IV (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	Duração do ensaio (meses)	IBA (%)	Origem pé-mãe	Repetição	CR	CC	SR	MO	
de mês de colheita e duração do ensaio (3/92)	Julho	3	1	Jovem	1	28,57	21,43	42,86	7,14	
					2	25,00	25,00	42,86	7,14	
					3	17,86	32,14	17,86	32,14	
					4	32,14	25,00	14,29	28,57	
	Agosto	2			2	1	14,29	14,29	57,14	14,29
						2	3,57	28,57	53,57	14,29
						3	14,29	7,14	35,71	42,86
						4	17,86	14,29	57,14	10,71
		3			3	1	17,86	14,29	32,14	35,71
						2	17,86	7,14	50,00	25,00
						3	17,86	10,71	32,14	39,29
						4	14,29	17,86	35,71	32,14
		4			4	1	32,14	25,00	28,57	14,29
						2	28,57	25,00	25,00	21,43
						3	21,43	21,43	57,14	0,00
						4	32,14	17,86	42,86	7,14
	Setembro	3			3	1	3,57	10,71	82,14	3,57
						2	14,29	17,86	64,29	3,57
						3	14,29	14,29	64,29	7,14
						4	10,71	21,43	50,00	17,86
		4			4	1	25,00	10,71	46,43	17,86
						2	14,29	10,71	50,00	25,00
						3	17,86	10,71	53,57	17,86
						4	35,71	7,14	39,29	17,86
		5			5	1	14,29	14,29	35,71	35,71
						2	14,29	14,29	50,00	21,43
						3	7,14	3,57	50,00	39,29
						4	10,71	10,71	46,43	32,14
	Outubro	3			3	1	7,14	17,86	71,43	3,57
						2	14,29	21,43	53,57	10,71
						3	7,14	3,57	75,00	14,29
						4	28,57	14,29	57,14	0,00
		4			4	1	7,14	17,86	35,71	39,29
						2	10,71	17,86	39,29	32,14
						1	0,00	0,00	21,43	78,57
						2	7,14	0,00	17,86	75,00
5		5	3	3,57	0,00	7,14	89,29			

ANEXO V

Resultados dos ensaios de enraizamento de estacas de plantas enxertadas realizados em 1993, em que se estudaram o mês de colheita de estacas, o clone, o ano de enxertia e a intensidade de poda das plantas-mães. **CR**- percentagem de estacas com raiz, **CC**- percentagem de estacas que formaram *callus*, **SR**- percentagem de estacas sem resposta e **MO**- percentagem de estacas mortas.

Ensaio	Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Ano de enxertia	Poda	Repetição	CR	CC	SR	MO						
1/93	Junho	1	10/10-4	1991	Suave	1	33,33	16,67	16,67	33,33						
			10/10-9				0,00	16,67	8,33	75,00						
			7/8A-10				8,33	25,00	16,67	50,00						
			7/8A-20	1989			9,09	36,36	18,18	36,36						
			8/6-4				16,67	50,00	25,00	8,34						
			8/6-6	1991			50,00	50,00	0,00	0,00						
			8/6-y				0,00	0,00	41,67	58,33						
			8/7-3	1990			25,00	8,33	41,67	25,00						
			9/6-14				1991	41,67	16,67	33,33	8,33					
			10/10-4					33,33	16,67	50,00	0,00					
			Julho					10/10-9	1991			41,67	16,67	25,00	16,67	
								7/8A-10				8,33	91,67	0,00	0,00	
	7/8A-20	1989			33,33	58,33		8,33				0,00				
	8/6-4				25,00	75,00		0,00	0,00							
	8/6-6	1991			33,33	66,67		0,00	0,00							
	8/6-y				0,00	83,33		16,67	0,00							
	8/7-3	1990			25,00	75,00		0,00	0,00							
	9/6-14				1991	8,33		75,00	16,67			0,00				
	10/10-4					66,67		8,33	8,33			16,67				
	Agosto					10/10-9		1991					16,67	8,33	33,33	41,67
						7/8A-10							16,67	25,00	16,67	41,67
						7/8A-20							1989	8,33	50,00	33,33
			8/6-4	16,67		50,00	0,00	33,33								
			8/6-6	1991		91,67	8,33	0,00		0,00						
			8/6-y			16,67	33,33	16,67		33,33						
			8/7-3	1990		66,67	16,67	8,33		8,33						
			9/6-14			1991	16,67	41,67		41,67	0,00					
			10/10-4				16,67	16,67		0,00	66,67					
			Setembro				10/10-9	1991					41,67	41,67	0,00	16,67
							7/8A-10						0,00	83,33	8,33	8,33
							7/8A-20						1989	8,33	83,33	8,33
	8/6-4	0,00			91,67		0,00	8,33								
	8/6-6	1991			16,67		58,33	25,00	0,00							
	8/6-y				16,67		25,00	16,67	41,67							
	8/7-3	1990			8,33		41,67	33,33	16,67							
	9/6-14				1991		8,33	50,00	25,00			16,67				
	10/10-4						16,67	16,67	0,00			66,67				

ANEXO V (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Ano de enxertia	Poda	Repetição	CR	CC	SR	MO
1/93	Outubro	1	10/10-4	1991	Suave	1	16,67	25,00	16,67	41,67
			7/8A-10				0,00	75,00	16,67	8,33
			7/8A-20	1989			8,33	50,00	25,00	16,67
			8/6-4	1991			8,33	50,00	0,00	41,67
			8/6-6				8,33	41,67	33,33	16,67
			8/6-y	1990			0,00	58,33	41,67	0,00
			8/7-3				0,00	33,33	41,67	25,00
			9/6-14	1991			25,00	58,33	16,67	0,00
de concent. de IBA (2/93)	Junho	0	7/8A-10	1991	Suave	valores médios	10,00	35,00	30,00	25,00
		0,5					5,00	25,00	35,00	35,00
		1					0,00	30,00	30,00	40,00
		2					10,00	50,00	20,00	20,00
		4					0,00	20,00	45,00	35,00
		0	7/8A-20	1989/90/91			10,00	20,00	15,00	55,00
		0,5					20,00	15,00	20,00	45,00
		1					20,00	35,00	25,00	20,00
		2					5,00	75,00	0,00	20,00
		4					5,00	35,00	45,00	15,00
		0	8/6-6	1991			15,00	35,00	20,00	30,00
		0,5					20,00	55,00	20,00	5,00
		1					35,00	30,00	20,00	15,00
		2					20,00	40,00	15,00	25,00
		4					20,00	50,00	10,00	20,00
		0	8/6-y	1989/90/91			30,00	40,00	5,00	25,00
		0,5					10,00	15,00	40,00	35,00
		1					10,00	25,00	35,00	30,00
		2					0,00	50,00	15,00	35,00
		4					0,00	35,00	25,00	40,00
	0	9/6-14	1991	5,00	15,00	35,00	45,00			
	0,5			10,00	15,00	35,00	40,00			
	1			5,00	35,00	15,00	45,00			
	2			0,00	35,00	55,00	10,00			
	4			10,00	25,00	55,00	10,00			
	Agosto	0	7/8A-10	1991	10,00	15,00	65,00	10,00		
					0,5	15,00	20,00	55,00	10,00	
					1	10,00	10,00	80,00	0,00	
					2	5,00	40,00	50,00	5,00	
					4	10,00	50,00	35,00	5,00	
		0	7/8A-20	1989/90/91	25,00	35,00	40,00	0,00		
		0,5			20,00	40,00	30,00	10,00		
		1			25,00	20,00	45,00	10,00		
		2			15,00	60,00	20,00	5,00		
		4			25,00	55,00	20,00	0,00		

ANEXO V (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Ano de enxertia	Poda	Repetição	CR	CC	SR	MO			
de concent. de IBA (2/93)	Agosto	0	8/6-6	1991	Suave	valores médios	15,00	25,00	60,00	0,00			
		0.5					40,00	20,00	40,00	0,00			
		1					15,00	20,00	60,00	5,00			
		2					30,00	40,00	25,00	5,00			
		4					40,00	35,00	25,00	0,00			
		0	8/6-y	1989/90/91			0,00	20,00	60,00	20,00			
		0.5					5,00	25,00	65,00	5,00			
		1					15,00	5,00	75,00	5,00			
		2					5,00	55,00	35,00	5,00			
		4					15,00	45,00	40,00	0,00			
		0	9/6-14	1991			5,00	5,00	65,00	25,00			
		0.5					20,00	5,00	75,00	0,00			
	1	20,00					5,00	75,00	0,00				
	2	20,00					5,00	75,00	0,00				
	4	25,00					5,00	65,00	5,00				
	0	7/8A-10		5,00			30,00	45,00	20,00				
	0.5			10,00			40,00	35,00	15,00				
	1			6,67			40,00	46,67	6,67				
	2			5,00			70,00	20,00	5,00				
	4			5,00			50,00	25,00	20,00				
	0	7/8A-20	1989/90/91	10,00			30,00	60,00	0,00				
	0.5			20,00			60,00	10,00	10,00				
	1			26,67			46,67	20,00	6,67				
	2			20,00			60,00	15,00	5,00				
	4			20,00			25,00	30,00	25,00				
	0	8/6-6	1991	10,00			25,00	50,00	15,00				
	0.5			20,00			45,00	15,00	20,00				
	1			53,33			33,33	13,33	0,00				
	2			25,00			45,00	10,00	20,00				
	4			10,00			40,00	30,00	20,00				
	0	8/6-y	1989/90/91	0,00			10,00	35,00	55,00				
	0.5			10,00			30,00	25,00	35,00				
	1			0,00			40,00	33,33	26,67				
	2			5,00			35,00	20,00	40,00				
	4			5,00			30,00	20,00	45,00				
	0	9/6-14	1991	5,00			20,00	70,00	5,00				
	0.5			0,00			30,00	65,00	5,00				
	1			0,00			26,67	73,33	0,00				
	2			5,00			30,00	45,00	20,00				
	4			5,00			30,00	55,00	10,00				
	3/93	Outubro	1	7/8A-10			1989	Suave	1	7,14	25,00	46,43	21,43
							1991			21,43	39,29	39,29	0,00
				7/8A-20			1989			17,86	53,57	25,00	3,57

ANEXO V (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Ano de enxertia	Poda	Repetição	CR	CC	SR	MO
3/93	Outubro	1	7/8A-20	1991	Suave	1	60,71	14,29	17,87	7,14
			8/6-4	1989			0,00	78,57	21,43	0,00
				1991			14,29	25,00	60,71	0,00
			8/6-y	1989			10,71	46,43	35,71	7,14
				1991			3,57	50,00	46,43	0,00
4/93	Setembro	1	10/10-4	1991	Suave	1	7,14	28,57	60,71	3,57
						2	3,57	46,43	46,43	3,57
						3	3,57	64,29	32,14	0,00
						4	3,57	60,71	28,57	7,14
						5	6,25	68,75	25,00	0,00
			10/10-9	1		17,86	21,43	60,71	0,00	
				2		14,29	28,57	57,14	0,00	
				3		10,71	32,14	57,14	0,00	
				4		23,81	38,10	38,10	0,00	
				5		0,00	37,50	62,50	0,00	
			7/8A-10	1		17,86	21,43	53,57	7,14	
				2		3,57	46,43	42,86	7,14	
				3		10,71	39,29	46,43	3,57	
				4		7,14	53,57	35,71	3,57	
				5		6,25	75,00	18,75	0,00	
			7/8A-20	1989/90/91		1	21,43	50,00	25,00	3,57
						2	14,29	50,00	21,43	14,29
						3	32,14	46,43	17,86	3,57
						4	28,57	42,86	21,43	7,14
			8/6-4	1991		1	3,57	75,00	21,43	0,00
						2	17,86	60,71	17,86	3,57
						3	28,57	53,57	7,14	10,71
						4	7,14	78,57	14,29	0,00
			8/6-6	1991		1	35,71	50,00	10,71	3,57
						2	21,43	42,86	35,71	0,00
						3	50,00	50,00	0,00	0,00
						4	35,71	64,29	0,00	0,00
						5	6,25	87,50	6,25	0,00
			8/6-y			1	7,14	39,29	39,29	14,29
						2	14,29	53,57	32,14	0,00
						3	0,00	42,86	46,43	10,71
						4	3,57	64,29	32,14	0,00
						5	6,25	75,00	0,00	18,75
			9/6-14			1	14,29	71,43	10,71	3,57
						2	17,86	75,00	7,14	0,00
						3	25,00	21,43	50,00	3,57
						4	21,43	50,00	21,43	7,14

ANEXO V (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Ano de enxertia	Poda	Repetição	CR	CC	SR	MO	
de intens. de poda (5/93)	Junho	1	7/8A-10	1989	Intensa	1	28,57	25,00	42,86	3,57	
						2	10,71	35,71	35,71	17,86	
						3	35,71	14,29	32,14	17,86	
						4	10,71	28,57	46,43	14,29	
					Suave	1	0,00	50,00	25,00	25,00	
						2	0,00	64,28	25,00	10,71	
						3	3,57	53,57	21,43	21,43	
						4	0,00	53,57	17,86	28,57	
					7/8A-20	Intensa	1	7,14	42,86	28,57	21,43
							2	10,71	50,00	39,29	0,00
							3	0,00	67,86	21,43	10,71
							4	21,43	53,57	25,00	0,00
			Suave			1	0,00	85,71	10,71	3,57	
						2	3,57	78,57	14,29	3,57	
						3	7,14	75,00	17,86	0,00	
						4	7,14	53,57	28,57	10,71	
			8/6-19		Intensa	1	3,57	3,57	35,71	57,14	
						2	0,00	39,29	10,71	50,00	
						3	0,00	35,71	32,14	32,14	
						4	0,00	32,14	35,71	32,14	
						Suave	1	10,71	53,57	25,00	10,71
							2	3,57	75,00	3,57	17,86
							3	17,86	50,00	7,14	25,00
							4	17,86	42,86	21,43	17,86
	Agosto	7/8A-10		Intensa	1	3,57	10,71	50,00	35,71		
					2	3,57	7,14	46,43	42,86		
					3	10,71	3,57	32,14	53,57		
					4	3,57	3,57	28,57	64,29		
			Suave		1	0,00	7,14	28,57	64,29		
					2	0,00	17,87	21,43	60,71		
					3	0,00	10,71	32,14	57,14		
					4	0,00	3,57	32,14	64,29		
			7/8A-20	Intensa	1	10,71	25,00	60,71	3,57		
					2	0,00	17,87	39,29	42,86		
					3	0,00	17,87	50,00	32,14		
					4	10,71	21,43	57,14	10,71		
	Suave	1			3,57	42,86	53,57	0,00			
		2			3,57	21,43	25,00	50,00			
		3			0,00	7,14	75,00	17,87			
		4			17,86	21,43	32,14	28,57			
	8/6-19	Intensa		1	0,00	28,57	32,14	39,29			
				2	7,14	28,57	7,14	57,14			
				3	0,00	3,57	32,14	64,29			

ANEXO V (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Ano de enxertia	Poda	Repetição	CR	CC	SR	MO
de intens. de poda (5/93)	Agosto	1	8/6-19	1989	Intensa Suave	4	0,00	17,87	28,57	53,57
						1	3,57	21,43	39,29	35,71
						2	0,00	21,43	28,57	50,00
						3	10,71	35,71	39,29	14,29
	4		28,57		17,87	25,00	28,57			
	Outubro		7/8A-10		Intensa	1	28,57	32,14	25,00	14,29
						2	35,71	46,43	14,29	3,57
						3	7,14	10,71	57,14	25,00
		4				50,00	35,71	14,29	0,00	
		Suave	1		3,57	10,71	71,43	14,29		
			2		0,00	25,00	39,29	35,71		
			3		0,00	0,00	28,57	71,43		
			4		0,00	0,00	17,87	82,14		
		7/8A-20	Intensa		1	0,00	14,29	60,71	25,00	
					2	0,00	46,43	53,57	0,00	
					3	7,14	17,87	53,57	21,43	
					4	0,00	42,86	50,00	7,14	
	Suave		1		3,57	7,14	46,43	42,86		
			2		7,14	71,43	21,43	0,00		
			3		3,57	46,43	50,00	0,00		
			4		0,00	0,00	32,14	67,86		
	8/6-19	Intensa	1		0,00	39,29	50,00	10,71		
			2		0,00	42,86	28,57	28,57		
			3		3,57	82,14	10,71	3,57		
			4		3,57	71,43	21,43	3,57		
		Suave	1		0,00	46,43	39,29	14,29		
			2		3,57	78,57	14,29	3,57		
			3		0,00	21,43	60,71	17,87		
4			3,57	71,43	17,87	7,14				
de mês de colheita (6/93)	Junho	1	Planta-mãe jovem	Não	Não	1	14,81	14,81	44,44	25,93
						2	7,41	14,81	62,96	14,81
						3	11,11	7,41	74,07	7,41
						4	11,11	29,63	51,85	7,41
	Julho					1	33,33	51,85	14,81	0,00
						2	29,63	51,85	18,52	0,00
						3	37,04	25,93	29,63	7,41
						4	11,11	62,96	25,93	0,00
	Agosto					1	44,44	37,04	14,81	3,70
						2	37,04	7,41	44,44	11,11
						3	25,93	25,93	44,44	3,70
						4	11,11	51,85	25,93	11,11
	Setembro					1	18,52	51,85	25,93	3,70
						2	0,00	33,33	33,33	33,33

ANEXO V (continuação)

Ensaio	Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Ano de enxertia	Poda	Repetição	CR	CC	SR	MO
de mês de colheita (6/93)	Setembro	1	Planta-mãe jovem	Não	Não	3	25,93	55,55	11,11	7,41
	4					18,52	51,85	29,63	0,00	
	Outubro	1				11,11	29,63	40,74	18,52	
		2				11,11	37,04	29,63	22,22	
		3				0,00	37,04	40,74	22,22	
		4				7,41	25,93	44,44	22,22	

ANEXO VI

Resultados do ensaio de enraizamento de estacas de plantas enxertadas realizado em 1993 (ensaio n°2/93), em que se estudou o efeito da concentração de IBA, do mês de colheita de estacas e do clone; **CR**- percentagem de estacas com raiz, **CC**- percentagem de estacas que formaram *callus*, **SR**- percentagem de estacas sem resposta e **MO**- percentagem de estacas mortas.

Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Repetição	CR	CC	SR	MO
Junho	0	7/8A-10	1	20,0	20,0	20,0	40,0
			2	20,0	20,0	40,0	20,0
			3	0,0	40,0	40,0	20,0
			4	0,0	60,0	20,0	20,0
		7/8A-20	1	20,0	20,0	20,0	40,0
			2	0,0	40,0	0,0	60,0
			3	0,0	0,0	40,0	60,0
			4	20,0	20,0	0,0	60,0
		8/6-6	1	20,0	40,0	20,0	20,0
			2	20,0	0,0	40,0	40,0
			3	0,0	60,0	20,0	20,0
			4	20,0	40,0	0,0	40,0
		8/6-y	1	20,0	80,0	0,0	0,0
			2	40,0	20,0	0,0	40,0
			3	20,0	40,0	20,0	20,0
			4	40,0	20,0	0,0	40,0
	9/6-14	1	20,0	0,0	20,0	60,0	
		2	0,0	40,0	40,0	20,0	
		3	0,0	20,0	40,0	40,0	
		4	0,0	0,0	40,0	60,0	
	0,5	7/8A-10	1	20,0	0,0	40,0	40,0
			2	0,0	60,0	20,0	20,0
			3	0,0	40,0	20,0	40,0
			4	0,0	0,0	60,0	40,0
		7/8A-20	1	40,0	20,0	20,0	20,0
			2	20,0	40,0	20,0	20,0
			3	20,0	0,0	0,0	80,0
			4	0,0	0,0	40,0	60,0
		8/6-6	1	60,0	40,0	0,0	0,0
			2	0,0	80,0	20,0	0,0
			3	0,0	40,0	40,0	20,0
			4	20,0	60,0	20,0	0,0
8/6-y		1	0,0	20,0	60,0	20,0	
		2	20,0	0,0	20,0	60,0	
		3	0,0	20,0	20,0	60,0	
		4	20,0	20,0	60,0	0,0	

ANEXO VI (continuação)

Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Repetição	CR	CC	SR	MO	
Junho	0,5	9/6-14	1	0,0	0,0	40,0	60,0	
			2	0,0	0,0	60,0	40,0	
			3	20,0	40,0	0,0	40,0	
			4	20,0	20,0	40,0	20,0	
	1	7/8A-10	1	0,0	40,0	0,0	60,0	
			2	0,0	20,0	40,0	40,0	
			3	0,0	40,0	40,0	20,0	
			4	0,0	20,0	40,0	40,0	
		7/8A-20	1	20,0	40,0	20,0	20,0	
			2	20,0	0,0	20,0	60,0	
			3	20,0	60,0	20,0	0,0	
			4	20,0	40,0	40,0	0,0	
		8/6-6	1	20,0	0,0	40,0	40,0	
			2	60,0	40,0	0,0	0,0	
			3	20,0	60,0	20,0	0,0	
			4	40,0	20,0	20,0	20,0	
		8/6-y	1	20,0	0,0	20,0	60,0	
			2	0,0	40,0	40,0	20,0	
			3	0,0	40,0	40,0	20,0	
			4	20,0	20,0	40,0	20,0	
		9/6-14	1	0,0	80,0	20,0	0,0	
			2	0,0	0,0	20,0	80,0	
			3	20,0	40,0	20,0	20,0	
			4	0,0	20,0	0,0	80,0	
		2	7/8A-10	1	40,0	40,0	20,0	0,0
				2	0,0	40,0	40,0	20,0
				3	0,0	80,0	0,0	20,0
				4	0,0	40,0	20,0	40,0
			7/8A-20	1	20,0	80,0	0,0	0,0
				2	0,0	60,0	0,0	40,0
				3	0,0	80,0	0,0	20,0
				4	0,0	80,0	0,0	20,0
	8/6-6		1	20,0	40,0	40,0	0,0	
			2	20,0	60,0	0,0	20,0	
			3	20,0	20,0	0,0	60,0	
			4	20,0	40,0	20,0	20,0	
	8/6-y		1	0,0	80,0	20,0	0,0	
			2	0,0	40,0	20,0	40,0	
			3	0,0	60,0	0,0	40,0	
			4	0,0	20,0	20,0	60,0	
9/6-14	1		0,0	20,0	60,0	20,0		
	2		0,0	80,0	20,0	0,0		
	3		0,0	20,0	60,0	20,0		
	4		0,0	20,0	80,0	0,0		

ANEXO VI (continuação)

Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Repetição	CR	CC	SR	MO		
Junho	4	7/8A-10	1	0,0	0,0	40,0	60,0		
			2	0,0	40,0	20,0	40,0		
			3	0,0	40,0	40,0	20,0		
			4	0,0	0,0	80,0	20,0		
		7/8A-20	1	0,0	20,0	80,0	0,0		
			2	0,0	60,0	20,0	20,0		
			3	20,0	20,0	40,0	20,0		
			4	0,0	40,0	40,0	20,0		
		8/6-6	1	0,0	80,0	0,0	20,0		
			2	20,0	60,0	0,0	20,0		
			3	40,0	20,0	20,0	20,0		
			4	20,0	40,0	20,0	20,0		
		8/6-y	1	0,0	0,0	60,0	40,0		
			2	0,0	40,0	40,0	20,0		
			3	0,0	20,0	0,0	80,0		
			4	0,0	80,0	0,0	20,0		
		9/6-14	1	0,0	20,0	80,0	0,0		
			2	0,0	20,0	60,0	20,0		
			3	40,0	0,0	40,0	20,0		
			4	0,0	60,0	40,0	0,0		
		Agosto	0	7/8A-10	1	20,0	0,0	80,0	0,0
					2	0,0	40,0	20,0	40,0
					3	20,0	20,0	60,0	0,0
					4	0,0	0,0	100,0	0,0
				7/8A-20	1	40,0	40,0	20,0	0,0
					2	20,0	40,0	40,0	0,0
					3	20,0	20,0	60,0	0,0
					4	20,0	40,0	40,0	0,0
8/6-6	1			40,0	0,0	60,0	0,0		
	2			0,0	40,0	60,0	0,0		
	3			20,0	40,0	40,0	0,0		
	4			0,0	20,0	80,0	0,0		
8/6-y	1			0,0	20,0	0,0	80,0		
	2			0,0	20,0	80,0	0,0		
	3			0,0	0,0	100,0	0,0		
	4			0,0	40,0	60,0	0,0		
9/6-14	1			0,0	0,0	0,0	100,0		
	2			20,0	0,0	80,0	0,0		
	3			0,0	0,0	100,0	0,0		
	4			0,0	20,0	80,0	0,0		
0,5	7/8A-10			1	40,0	0,0	40,0	20,0	
				2	20,0	0,0	80,0	0,0	
				3	0,0	20,0	80,0	0,0	
				4	0,0	60,0	20,0	20,0	

ANEXO VI (continuação)

Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Repetição	CR	CC	SR	MO	
Agosto	0,5	7/8A-20	1	40,0	20,0	40,0	0,0	
			2	0,0	60,0	40,0	0,0	
			3	20,0	80,0	0,0	0,0	
			4	20,0	0,0	40,0	40,0	
		8/6-6	1	60,0	20,0	20,0	0,0	
			2	40,0	20,0	40,0	0,0	
			3	40,0	0,0	60,0	0,0	
			4	20,0	40,0	40,0	0,0	
		8/6-y	1	0,0	20,0	80,0	0,0	
			2	20,0	40,0	40,0	0,0	
			3	0,0	40,0	40,0	20,0	
			4	0,0	0,0	100,0	0,0	
		9/6-14	1	40,0	0,0	60,0	0,0	
			2	0,0	0,0	100,0	0,0	
			3	0,0	0,0	100,0	0,0	
			4	40,0	20,0	40,0	0,0	
	1	7/8A-10	1	0,0	0,0	100,0	0,0	
			2	20,0	0,0	80,0	0,0	
			3	0,0	0,0	100,0	0,0	
			4	20,0	40,0	40,0	0,0	
			7/8A-20	1	20,0	0,0	60,0	20,0
				2	0,0	60,0	40,0	0,0
				3	40,0	0,0	40,0	20,0
				4	40,0	20,0	40,0	0,0
			8/6-6	1	0,0	20,0	80,0	0,0
				2	0,0	0,0	100,0	0,0
				3	40,0	0,0	60,0	0,0
				4	20,0	60,0	0,0	20,0
		8/6-y	1	20,0	0,0	80,0	0,0	
			2	0,0	0,0	80,0	20,0	
			3	40,0	20,0	40,0	0,0	
			4	0,0	0,0	100,0	0,0	
		9/6-14	1	0,0	0,0	100,0	0,0	
			2	20,0	0,0	80,0	0,0	
			3	0,0	0,0	100,0	0,0	
			4	60,0	20,0	20,0	0,0	
		2	7/8A-10	1	20,0	40,0	40,0	0,0
				2	0,0	60,0	20,0	20,0
				3	0,0	40,0	60,0	0,0
				4	0,0	20,0	80,0	0,0
7/8A-20			1	0,0	40,0	40,0	20,0	
			2	20,0	60,0	20,0	0,0	
			3	20,0	60,0	20,0	0,0	
			4	20,0	80,0	0,0	0,0	

ANEXO VI (continuação)

Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Repetição	CR	CC	SR	MO	
Agosto	2	8/6-6	1	20,0	40,0	40,0	0,0	
			2	40,0	60,0	0,0	0,0	
			3	60,0	20,0	20,0	0,0	
			4	0,0	40,0	40,0	20,0	
		8/6-y	1	0,0	40,0	40,0	20,0	
			2	0,0	60,0	40,0	0,0	
			3	20,0	80,0	0,0	0,0	
			4	0,0	40,0	60,0	0,0	
		9/6-14	1	20,0	0,0	80,0	0,0	
			2	20,0	0,0	80,0	0,0	
			3	0,0	20,0	80,0	0,0	
			4	40,0	0,0	60,0	0,0	
		4	7/8A-10	1	0,0	60,0	40,0	0,0
				2	20,0	40,0	40,0	0,0
				3	20,0	60,0	20,0	0,0
				4	0,0	40,0	40,0	20,0
	7/8A-20		1	20,0	40,0	40,0	0,0	
			2	20,0	60,0	20,0	0,0	
			3	40,0	60,0	0,0	0,0	
			4	20,0	60,0	20,0	0,0	
	8/6-6		1	40,0	20,0	40,0	0,0	
			2	20,0	60,0	20,0	0,0	
			3	20,0	40,0	40,0	0,0	
			4	80,0	20,0	0,0	0,0	
	8/6-y		1	20,0	80,0	0,0	0,0	
			2	0,0	80,0	20,0	0,0	
			3	0,0	20,0	80,0	0,0	
			4	40,0	0,0	60,0	0,0	
9/6-14	1		60,0	0,0	40,0	0,0		
	2		20,0	20,0	40,0	20,0		
	3		20,0	0,0	80,0	0,0		
	4		0,0	0,0	100,0	0,0		
Outubro	0	7/8A-10	1	0,0	0,0	60,0	40,0	
			2	0,0	40,0	60,0	0,0	
			3	0,0	20,0	60,0	20,0	
			4	20,0	60,0	0,0	20,0	
		7/8A-20	1	20,0	0,0	80,0	0,0	
			2	0,0	40,0	60,0	0,0	
			3	0,0	20,0	80,0	0,0	
			4	20,0	60,0	20,0	0,0	
		8/6-6	1	0,0	0,0	100,0	0,0	
			2	0,0	60,0	20,0	20,0	
			3	20,0	20,0	40,0	20,0	
			4	20,0	20,0	40,0	20,0	

ANEXO VI (continuação)

Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Repetição	CR	CC	SR	MO	
Outubro	0	8/6-y	1	0,0	0,0	20,0	80,0	
			2	0,0	0,0	60,0	40,0	
			3	0,0	40,0	0,0	60,0	
			4	0,0	0,0	60,0	40,0	
		9/6-14	1	0,0	0,0	80,0	20,0	
			2	0,0	0,0	100,0	0,0	
			3	0,0	60,0	40,0	0,0	
			4	20,0	20,0	60,0	0,0	
	0,5	7/8A-10	1	40,0	40,0	20,0	0,0	
			2	0,0	60,0	40,0	0,0	
			3	0,0	40,0	20,0	40,0	
			4	0,0	20,0	60,0	20,0	
		7/8A-20	1	20,0	80,0	0,0	0,0	
			2	20,0	60,0	20,0	0,0	
			3	20,0	40,0	20,0	20,0	
			4	20,0	60,0	0,0	20,0	
		8/6-6	1	20,0	80,0	0,0	0,0	
			2	40,0	20,0	40,0	0,0	
			3	0,0	40,0	0,0	60,0	
			4	20,0	40,0	20,0	20,0	
		8/6-y	1	0,0	80,0	0,0	20,0	
			2	0,0	20,0	80,0	0,0	
			3	0,0	0,0	0,0	100,0	
			4	40,0	20,0	20,0	20,0	
		9/6-14	1	0,0	40,0	60,0	0,0	
			2	0,0	40,0	60,0	0,0	
			3	0,0	0,0	80,0	20,0	
			4	0,0	40,0	60,0	0,0	
		1	7/8A-10	1	20,0	20,0	40,0	20,0
				2	0,0	60,0	40,0	0,0
				3	0,0	40,0	60,0	0,0
			7/8A-20	1	0,0	60,0	20,0	20,0
	2			60,0	40,0	0,0	0,0	
	3			20,0	40,0	40,0	0,0	
	8/6-6		1	80,0	20,0	0,0	0,0	
			2	40,0	40,0	20,0	0,0	
3			40,0	40,0	20,0	0,0		
8/6-y	1		0,0	40,0	40,0	20,0		
	2		0,0	40,0	60,0	0,0		
	3		0,0	40,0	0,0	60,0		
9/6-14	1		0,0	40,0	60,0	0,0		
	2		0,0	20,0	80,0	0,0		
	3		0,0	20,0	80,0	0,0		

ANEXO VI (continuação)

Mês de Colheita	IBA (%)	Clone	Repetição	CR	CC	SR	MO
Outubro	2	7/8A-10	1	0,0	80,0	20,0	0,0
			2	0,0	100,0	0,0	0,0
			3	20,0	60,0	20,0	0,0
			4	0,0	40,0	40,0	20,0
		7/8A-20	1	20,0	80,0	0,0	0,0
			2	0,0	80,0	0,0	20,0
			3	20,0	40,0	40,0	0,0
			4	40,0	40,0	20,0	0,0
		8/6-6	1	0,0	20,0	0,0	80,0
			2	40,0	40,0	20,0	0,0
			3	60,0	40,0	0,0	0,0
			4	0,0	80,0	20,0	0,0
		8/6-y	1	0,0	0,0	0,0	100,0
			2	0,0	40,0	20,0	40,0
			3	0,0	40,0	40,0	20,0
			4	20,0	60,0	20,0	0,0
	9/6-14	1	0,0	40,0	20,0	40,0	
		2	20,0	0,0	60,0	20,0	
		3	0,0	40,0	60,0	0,0	
		4	0,0	40,0	40,0	20,0	
	4	7/8A-10	1	0,0	40,0	20,0	40,0
			2	0,0	40,0	20,0	40,0
			3	0,0	60,0	40,0	0,0
			4	20,0	60,0	20,0	0,0
		7/8A-20	1	20,0	20,0	40,0	20,0
			2	0,0	20,0	0,0	80,0
			3	40,0	20,0	40,0	0,0
			4	20,0	40,0	40,0	0,0
		8/6-6	1	0,0	40,0	20,0	40,0
			2	20,0	0,0	60,0	20,0
			3	20,0	60,0	20,0	0,0
			4	0,0	60,0	20,0	20,0
8/6-y		1	0,0	20,0	0,0	80,0	
		2	20,0	0,0	0,0	80,0	
		3	0,0	60,0	40,0	0,0	
		4	0,0	40,0	40,0	20,0	
9/6-14		1	20,0	20,0	60,0	0,0	
		2	0,0	40,0	20,0	40,0	
		3	0,0	40,0	60,0	0,0	
		4	0,0	20,0	80,0	0,0	

ANEXO VII

Valores médios de enraizamento (CR), para cada um dos dez clones analisados em 1993, em cada uma das modalidades dos factores: mês de colheita de estacas, concentração de IBA, intensidade de poda e ano de enxertia do rameto.

Clone 7/8A-10

Factores estudados	CR	CC	SR	MO
<i>Mês de colheita</i>				
Junho	7,36	34,11	30,71	27,83
Julho	8,33	91,67	0,00	0,00
Agosto	8,39	22,65	45,89	23,08
Setembro	5,36	66,17	23,91	4,57
Outubro	9,88	41,38	32,82	15,98
<i>IBA (%)</i>				
0	8,33	26,67	46,67	18,33
0,5	10,00	28,33	41,67	20,00
1	9,37	36,35	29,98	29,35
2	6,67	53,33	30,00	10,00
4	5,00	40,00	35,00	20,00
<i>Poda</i>				
Intensa	19,18	21,13	35,42	24,41
Suave	6,77	39,07	34,18	19,98
<i>Ano de enxertia</i>				
1991	7,68	41,13	34,69	16,50
1990	10,41	24,26	33,33	32,07

Clone 7/8A-20

Factores estudados	CR	CC	SR	MO
<i>Mês de colheita</i>				
Junho	10,94	41,19	21,66	26,21
Julho	33,33	58,33	8,33	0,00
Agosto	17,40	38,48	35,11	9,02
Setembro	17,06	49,80	30,75	2,39
Outubro	21,14	38,91	29,56	10,10
<i>IBA (%)</i>				
0	15,00	28,33	38,33	18,34
0,5	20,00	38,33	20,00	21,63
1	18,36	40,48	30,67	10,49
2	13,33	65,00	11,67	10,00
4	16,67	38,33	31,67	13,34
<i>Poda</i>				
Intensa	5,06	36,31	44,34	14,29
Suave	18,99	44,08	26,15	12,79
<i>Ano de enxertia</i>				
1991	29,82	17,68	31,79	20,72
1990	10,22	48,09	29,71	11,99
1989	18,72	42,60	26,76	11,92

ANEXO VII (continuação)**Clone 8/6-19**

Factores estudados	CR	CC	SR	MO
<i>Mês de colheita</i>				
Junho	6,70	41,52	21,43	30,36
Agosto	6,25	21,88	29,02	42,86
Outubro	1,79	56,70	30,36	1,16
<i>Poda</i>				
Intensa	1,49	35,42	27,08	36,01
Suave	8,33	44,65	26,79	20,24

Clone 8/6-4

Factores estudados	CR	CC	SR	MO
<i>Mês de colheita</i>				
Junho	16,67	50,00	25,00	8,34
Julho	25,00	75,00	0,00	0,00
Agosto	16,67	50,00	0,00	33,33
Setembro	7,15	79,32	7,60	5,96
Outubro	5,66	58,03	25,90	10,43
<i>Ano de enxertia</i>				
1991	15,36	58,36	12,60	13,70
1989	0,00	78,57	21,73	0,00

Clone 8/6-6

Factores estudados	CR	CC	SR	MO
<i>Mês de colheita</i>				
Junho	23,50	44,00	15,00	17,50
Julho	33,33	66,67	0,00	0,00
Agosto	35,67	26,83	36,00	1,51
Setembro	19,54	65,87	14,68	0,30
Outubro	19,17	38,50	25,67	16,67
<i>IBA (%)</i>				
0	13,33	28,33	43,33	15,00
0,5	26,67	40,00	25,00	8,34
1	35,91	44,84	15,53	3,73
2	25,00	41,67	16,67	16,67
4	23,33	41,67	21,67	13,34

ANEXO VII (continuação)**Clone 8/7-3**

Factores estudados	CR	CC	SR	MO
<i>Mês de colheita</i>				
Junho	25,00	8,33	41,67	25,00
Julho	25,00	75,00	0,00	0,00
Agosto	66,67	16,07	8,33	8,33
Setembro	10,42	39,59	38,54	11,46
Outubro	2,51	31,67	48,34	17,50
<i>Ano de enxertia</i>				
1991	25,42	34,58	26,04	13,96
1990	5,00	30,00	55,00	10,00

Clone 8/6-y

Factores estudados	CR	CC	SR	MO
<i>Mês de colheita</i>				
Junho	8,34	27,50	26,95	37,22
Julho	0,00	83,23	16,67	0,00
Agosto	9,45	30,56	48,61	11,39
Setembro	11,46	43,75	17,71	27,09
Outubro	4,29	37,47	32,14	26,10
<i>IBA (%)</i>				
0	10,01	23,33	33,33	33,33
0,5	8,33	23,33	43,33	25,00
1	7,17	38,99	34,35	19,67
2	3,34	46,67	23,33	26,67
4	6,67	36,67	28,33	28,34
<i>Ano de enxertia</i>				
1991	13,27	50,83	23,40	12,50
1990	6,67	40,00	26,67	26,67
1989	10,71	46,43	35,71	7,14

Clone 9/6-14

Factores estudados	CR	CC	SR	MO
<i>Mês de colheita</i>				
Junho	9,67	23,17	40,83	26,33
Julho	8,33	75,00	16,67	0,00
Agosto	17,67	8,67	67,67	6,01
Setembro	13,99	52,23	23,66	10,12
Outubro	5,50	30,50	56,00	8,00
<i>IBA (%)</i>				
0	5,00	13,33	56,67	25,00
0,5	10,00	16,67	58,33	15,00
1	15,30	43,78	33,57	7,36
2	8,34	23,33	58,33	10,00
4	13,33	20,00	58,33	8,33

ANEXO VII (continuação)**Clone 10/10-4**

Factores estudados	CR	CC	SR	MO
<i>Mês de colheita</i>				
Junho	33,33	16,67	16,67	33,33
Julho	33,33	16,67	50,00	0,00
Agosto	66,67	8,33	8,33	16,67
Setembro	9,13	45,14	22,32	23,42
Outubro	16,67	25,00	16,67	41,67

Clone 10/10-9

Factores estudados	CR	CC	SR	MO
<i>Mês de colheita</i>				
Junho	0,00	16,67	8,33	75,00
Julho	41,67	16,67	25,00	16,66
Agosto	16,67	8,33	33,33	41,67
Setembro	19,45	36,41	38,59	5,56