

Isa Raquel da Costa Ramalho

Propagação *in vitro* de Cipreste-do-Buçaco (*Cupressus lusitanica* Mill.)



Orientadora interna: Professora Doutora Filomena Gomes

Orientador externo: Professor Doutor José Carlos Gonçalves

Isa Raquel da Costa Ramalho

Propagação *in vitro* de Cipreste-do-Buçaco

(*Cupressus lusitanica* Mill.)



Orientadora interna: Professora Doutora Filomena Gomes

Orientador externo: Professor Doutor José Carlos Gonçalves

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Recursos Florestais

Castelo Branco, 2022

O que dá o verdadeiro sentido ao encontro é a busca, e é preciso andar muito para se alcançar o que está perto.

José Saramago

Agradecimentos

A presente Dissertação contou com diversos apoios e incentivos, que contribuíram para a sua realização e que me faz sentir eternamente grata.

Ao Professor Doutor José Carlos Gonçalves, pela sua orientação, disponibilidade e aprendizagem, durante toda a experiência enquanto Bolseira de Investigação, no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI).

À Joana Domingues, pela colaboração, auxílio e apoio nas atividades laboratoriais, bem como aos restantes colegas de trabalho, que de alguma forma contribuíram para o meu bem-estar.

À Professora Doutora Filomena Gomes, como minha orientadora interna, pela sua disponibilidade, recomendações e auxílio.

A todos os docentes que me foram acompanhando no decorrer do curso e que me transmitiram os conhecimentos.

Ao meu namorado, por todo o apoio, força, coragem e ajuda, não só na vida pessoal, como na vida académica.

Aos meus pais, avós, irmão e restante família, que foram os meus pilares, que contribuíram para o meu bem-estar, com quem pude sempre partilhar os meus sucessos e insucessos, as minhas alegrias e as minhas tristezas, por serem as pessoas que moldaram a minha personalidade e por toda a educação, respeito e carinho.

Financiamento

Este trabalho foi realizado do âmbito do projeto FOREST for FUTURE (F4F), que tem como objetivo a demonstração de tecnologias inovadoras, com o intuito de aumentar a cadeia de valor da fileira florestal.

O projeto é constituído por quatro pilares: Plantas e Viveiros, Gestão Florestal, Soluções Industriais e Floresta Multifuncional, cada um com diversos Projetos Piloto (PP). Este trabalho insere-se no pilar Plantas e Viveiros, no PP5 – Produção em Massa de Plantas, que tem como principal objetivo o aumento produtivo de plantas obtidas *in vitro*, através de material selecionado.

A execução deste trabalho teve como promotor líder o Centro de Inovação e Competências da Floresta (serQ) e foi cofinanciado pelo Centro2020, Portugal 2020 e pelo Fundo Social Europeu.

O trabalho foi desenvolvido no Instituto Politécnico de Castelo Branco (IPCB), no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior.

Promotor líder:



Cofinanciado por:



Desenvolvido no:



Resumo

O objetivo do presente trabalho foi adaptar procedimentos para o estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização da espécie *Cupressus lusitanica* Mill. Assim, testaram-se tempos de desinfecção e meios de cultura para o estabelecimento da espécie; avaliou-se a capacidade de multiplicação e alongamento *in vitro*, recorrendo a diferentes concentrações de sacarose e diferentes citocininas, em meio de cultura semissólido; testou-se a utilização de biorreatores de imersão temporária; e avaliou-se a capacidade rizogénica, tanto *in vitro* como *ex vitro*.

Desta forma, utilizaram-se plantas existentes na coleção do CBPBI. Fez-se o estabelecimento de rebentos de *C. lusitanica*, em que se testaram três tempos diferentes de desinfecção (10 min, 15 min e 30 min) e duas concentrações diferentes de hipoclorito de sódio (NaClO) (1:3 e 1:4), assim como dois meios de cultura diferentes, MS e DKW. A fase de multiplicação contou com dois ensaios diferentes em meio semissólido e um ensaio em meio líquido, com biorreatores de imersão temporária. Para o meio de cultura semissólido fez-se um ensaio em que se testaram 3 concentrações de sacarose: 10 g/L, 20 g/L e 30 g/L; e o outro, em que foram testadas 3 citocininas (2iP, BAP e KIN) com concentrações diferentes: 0,5 mg/L, 1 mg/L e 2 mg/L. O ensaio de biorreatores pretendeu testar diferentes intervalos de imersão, assim como a duração da imersão. Efetuou-se um ensaio de enraizamento *in vitro* e outro *ex vitro*. No ensaio *in vitro*, foram testadas diferentes concentrações de AIB: 1 mg/L, 3 mg/L e 5 mg/L; e no ensaio *ex vitro*, testaram-se dois substratos diferentes (jiffys e turfa com perlite) e duas condições dos rebentos: com agulhas na base e com remoção das agulhas na base.

Os resultados mostraram que a espécie *C. lusitanica* apresentou uma taxa de infeção de 0%, nos rebentos que estiveram sujeitos a 10 minutos de desinfecção, com a concentração de NaClO de 1:3, em meio de cultura DKW. Para o parâmetro do comprimento dos rebentos maiores, o melhor resultado apresentou-se nas mesmas condições de teste, com o valor médio de 2,5 cm. No entanto, a taxa de multiplicação foi mais elevada quando os rebentos estiveram sujeitos a 10 minutos em NaClO, com uma concentração de 1:4, em meio MS. Relativamente aos ensaios de multiplicação, verificou-se que os rebentos que estiveram em meio com 20 g/L de sacarose obtiveram uma taxa de multiplicação mais elevada, assim como um maior comprimento. No ensaio de concentração de citocininas, os rebentos que estiveram sujeitos a 1 mg/L de 2iP, foram os que apresentaram maior taxa de multiplicação e rebentos maiores. O ensaio de biorreatores de imersão temporária não obteve resultados fidedignos, devido a falhas técnicas no sistema informático de controlo do programa de imersão. Quanto ao ensaio de enraizamento *in vitro*, os resultados não foram considerados favoráveis, uma vez que em todas as concentrações a percentagem de enraizamento foi inferior a 10%. O ensaio *ex vitro* teve como melhores resultados os rebentos que estiveram em jiffys, com a remoção das agulhas, contando com cerca de 73% de plântulas enraizadas.

Palavras-chave: Biorreatores; *Cupressus lusitanica* Mill.; Enraizamento; Estabelecimento; Multiplicação.

Abstract

The aim of the present work was to adapt procedures for the establishment, multiplication, rooting and acclimatization of the species *Cupressus lusitanica* Mill. Disinfection times and culture media were tested for the establishment of the species; the *in vitro* multiplication and elongation capacity was evaluated, using different cytokinins and different sucrose concentrations, in solid culture medium; the use of temporary immersion bioreactors was tested; and, the rhizogenic capacity was evaluated, both *in vitro* and *ex vitro*.

Plants from the CBPBI collection were used. The establishment of *C. lusitanica* shoots was carried out, in which three different disinfection times (10, 15 and 30 minutes) and two different concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) (1:3 and 1:4) were tested, as well as two different culture media, MS and DKW. The multiplication phase included two different trials in semi-solid medium and one trial in liquid medium, with temporary immersion bioreactors. For the semi-solid culture medium there was one trial in which three concentrations of sucrose were tested: 10 g/L, 20 g/L and 30 g/L; and the other, in which three cytokinins were tested (2iP, BAP and KIN) with different concentrations: 0.5 mg/L, 1 mg/L and 2 mg/L. The bioreactor trial aimed to test different immersion times, as well as the immersion duration. An *in vitro* and an *ex vitro* rooting assay were performed. In the *in vitro* assay, different concentrations of AIB were tested: 1 mg/L, 3 mg/L and 5 mg/L; and in the *ex vitro* assay two different substrates (jiffys and peat with perlite) and two conditions of the shoots: with needles at the base and with removal of the needles at the base.

The results showed that *C. lusitanica* showed a 0% infection rate on shoots that were subjected to 10 minutes of disinfection, with a NaClO concentration of 1:3, in DKW culture medium. For the length parameter of the largest shoots, the best result was found under the same test conditions with an average value of 2.5 cm. However, the multiplication rate was higher when the shoots were subjected to 10 minutes in NaClO, at a concentration of 1:4, in MS medium. Regarding the multiplication assays, the shoots that were in medium with 20 g/L of sucrose obtained a higher multiplication rate, as well as a greater length. In the cytokinin concentration assay, the shoots that were subjected to 1 mg/L of 2iP, had the highest multiplication rate and larger shoots. The temporary immersion bioreactor assay did not obtain reliable results, due to technical failures in the computer control system of the immersion programme. As for the *in vitro* rooting test, the results were not considered favorable, since in all concentrations the rooting percentage was less than 10%. The best results in the *ex vitro* test were the shoots that were in jiffys, with the removal of the needles, with about 73% of rooted seedlings.

Keywords: Bioreactors; *Cupressus lusitanica* Mill.; Establishment; Multiplication; Rooting.

Índice

Resumo	III
Abstract	IV
Lista de figuras	VI
Lista de tabelas	IX
Lista de siglas e abreviaturas	X
1. Introdução	1
1.1. Importância das plantas	2
1.2. A espécie <i>Cupressus lusitanica</i> Mill.	3
1.2.1. Taxonomia e descrição botânica	4
1.2.2. Distribuição geográfica, ecologia e importância	5
1.3. Abordagens biotecnológicas para a propagação de espécies vegetais	10
1.3.1. Princípios básicos da micropropagação	10
1.3.2. Importância do meio de cultura	12
1.3.3. Importância das condições de cultura	12
1.3.4. Fases da micropropagação por proliferação de meristemas	13
1.3.5. Potencialidades da micropropagação de <i>C. lusitanica</i>	15
1.4. Utilização de biorreatores na micropropagação	15
2. Materiais e métodos	17
2.1. Material vegetal	17
2.2. Processo de desinfecção e estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>C. lusitanica</i>	17
2.3. Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i>	19
2.3.1. Multiplicação em meio semissólido	19
2.3.2. Multiplicação em biorreatores de imersão temporária	20
2.4. Ensaio de enraizamento e aclimatização	21
2.5. Recolha de dados e tratamento estatístico	23
3. Resultados e discussão	25
3.1. Desinfecção e estabelecimento <i>in vitro</i>	25
3.2. Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i>	27
3.2.1. Multiplicação em meio semissólido	28
3.2.2. Multiplicação em biorreatores de imersão temporária	31
3.3. Ensaio de enraizamento e aclimatização	31
4. Conclusão	36
5. Bibliografia	37
Anexos	i

Lista de figuras

Figura 1: Evolução da ocupação das principais espécies e formações florestais em Portugal, desde o ano de 1995 a 2015. (Fonte: Dados obtidos através do 6º Inventário Florestal Nacional (IFN) (ICNF, 2019))	2
Figura 2: Registo fotográfico de <i>C. lusitanica</i> Mill., no parque da Pena (Sintra).	4
Figura 3: Distribuição geográfica da <i>C. lusitanica</i> , em Portugal Continental. (Fonte: https://jb.utad.pt/especie/Cupressus_lusitanica)	5
Figura 4: Pormenor de folhas de <i>C. lusitanica</i> , na Quinta do Furadouro (Óbidos).	8
Figura 5: Frutificação e sementes de <i>C. lusitanica</i> . (A) Frutificação na árvore, capturado na Quinta do Furadouro (Óbidos). (B) Frutificação com as escamas abertas. (C) Sementes de <i>C. lusitanica</i>	9
Figura 6: Relações evolutivas entre os grandes grupos de plantas terrestres. O sufixo «-idae» refere-se à categoria de subclasse; tradução para português entre parênteses retos. As aspas assinalam grupos parafiléticos. (Fonte: Lista vermelha da flora vascular de Portugal Continental).....	9
Figura 7: Representação esquemática das fases da micropropagação. A fase de enraizamento pode ser realizada <i>in vitro</i> ou <i>ex vitro</i> , sendo que neste último caso, pode ser realizada em simultâneo com a fase da aclimatização.	13
Figura 8: Biorreator de imersão temporária SETIS TM	16
Figura 9: Plantas-mãe utilizadas para o estabelecimento de <i>C. lusitanica</i> , existentes na coleção do CBPBI.	17
Figura 10: Protocolo de desinfeção para o estabelecimento de <i>C. lusitanica</i> . (A) Colocação dos explantes em fungicida, com agitação. (B) Passagem dos explantes por etanol a 70%. (C) Desinfeção com NaClO e Tween-20.....	18
Figura 11: Explantes de <i>C. lusitanica</i> , em tubos de ensaio.	18
Figura 12: Meios de cultura utilizados no ensaio de multiplicação <i>in vitro</i> . (A) Meio de cultura semissólido, em frascos. (B) Meio de cultura líquido, em biorreatores de imersão temporária.	19
Figura 13: Explantes em meio de cultura DKW, sem adição de regulador de crescimento.	19
Figura 14: Preparação dos ensaios em biorreatores de imersão temporária. (A) Rebentos provenientes de população stock, utilizados para os ensaios. (B) Preparação dos explantes. (C) Colocação dos explantes dentro dos biorreatores. (D) Vista pormenorizada dos explantes no interior dos biorreatores.	20
Figura 15: Substratos utilizados para os testes de enraizamento <i>ex vitro</i> de <i>C. lusitanica</i> . (A) Cápsula de Jiffy. (B) Caixa com mistura de turfa com perlite.....	21
Figura 16: Plântulas de <i>C. lusitanica</i> para o ensaio de enraizamento <i>ex vitro</i> . (A) Plântula com corte da base. (B) Plântula com corte da base e remoção de agulhas até cerca de 1 cm.	21
Figura 17: Processo do ensaio de enraizamento <i>ex vitro</i> de <i>C. lusitanica</i> , através do uso de Jiffys. (A) Hidratação de Jiffys com solução de enraizamento AgroBeta Enraizador Plus. (B) Imersão da base em gel de enraizamento Clonex. (C) Colocação do rebento na Jiffy. (D) Rebento pronto para enraizar/aclimatizar.	22
Figura 18: Plântulas para aclimatizar. (A) Plântulas com ensaio de enraizamento <i>ex vitro</i> , recorrendo à utilização de Jiffys. (B) Câmara bioclimática para aclimatização.	22

Figura 19: Processo do ensaio de enraizamento ex vitro de <i>C. lusitanica</i> , através do uso da mistura de turfa com perlite. (A) Hidratação da mistura do substrato. (B) Corte da base do rebento. (C) Remoção das agulhas da base do rebento. (D) Imersão da base no gel de enraizamento Clonex. (E) Colocação do rebento na mistura do substrato.....	23
Figura 20: Colocação da caixa com as plântulas de <i>C. lusitanica</i> no substrato de turfa com perlite, a aclimatizar, na câmara bioclimática.	23
Figura 21: Registos fotográficos dos explantes, após 6 semanas do estabelecimento. (A) Explante sujeito a 10 minutos de desinfeção, com a concentração de 1:3, em meio DKW. (B) Explante sujeito a 30 minutos de desinfeção, com a concentração de 1:4, em meio DKW. (C) Explante sujeito a 10 minutos de desinfeção, com a concentração de 1:4, em meio MS. (D) Explante sujeito a 15 minutos de desinfeção, com a concentração de 1:4, em meio MS.	25
Figura 22: Percentagem de infeções, mortes e sobrevivência dos explantes, de acordo com os tempos de desinfeção e meio de cultura.....	25
Figura 23: Taxa de multiplicação dos rebentos com qualidade, na interação de meio de cultura, com o tempo de desinfeção, com a concentração de NaClO.	26
Figura 24: Ensaio da concentração de sacarose. Da esquerda para a direita: 10 g/L, 20 g/L e 30 g/L.	28
Figura 25: Taxa de multiplicação com diferentes concentrações de sacarose de rebentos de <i>C. lusitanica</i>	28
Figura 26: Rebentos obtidos no ensaio da concentração de reguladores de crescimento. Da esquerda para a direita: 0,5 mg/L, 1 mg/L e 2 mg/L. (A) Utilização do regulador de crescimento 2-iP. (B) Utilização do regulador de crescimento BAP. (C) Utilização do regulador de crescimento KIN.....	29
Figura 27: Taxa de multiplicação dos rebentos, no ensaio de multiplicação, com diferentes concentrações de reguladores de crescimento, de rebentos de <i>C. lusitanica</i>	30
Figura 28: Rebento com uma raiz, na concentração de 3 mg/L de AIB.	31
Figura 29: Percentagem de enraizamento in vitro de rebentos de <i>C. lusitanica</i>	32
Figura 30: Presença de raízes nas plântulas testadas com jiffys. (A) Plântula em que se removeram as agulhas da base. (B) Plântula em que não se removeram agulhas da base.	33
Figura 31: Percentagem de enraizamento ex vitro de rebentos de <i>C. lusitanica</i>	34

Anexo - Figura 1: Representação gráfica que comprova que a taxa de multiplicação na fase do estabelecimento não segue uma distribuição normal.	ii
Anexo - Figura 2: Representação gráfica que comprova que o comprimento médio dos maiores rebentos, na fase do estabelecimento não segue uma distribuição normal.	iii
Anexo - Figura 3: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da taxa de multiplicação, na fase do estabelecimento.	iii
Anexo - Figura 4: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da qualidade dos rebentos, na fase do estabelecimento.	iv
Anexo - Figura 5: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados do comprimento médio dos rebentos maiores, na fase do estabelecimento.	iv
Anexo - Figura 6: Representação gráfica que comprova que a taxa de multiplicação na fase da multiplicação, no ensaio da sacarose, não segue uma distribuição normal.....	i

Anexo - Figura 7: Representação gráfica que comprova que o comprimento médio dos rebentos maiores, na fase da multiplicação, no ensaio da sacarose, segue uma distribuição normal.....	i
Anexo - Figura 8: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da qualidade dos rebentos, na fase da multiplicação, no ensaio da sacarose.....	ii
Anexo - Figura 9: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados do comprimento médio dos rebentos maiores, na fase da multiplicação, no ensaio da sacarose. (Nota: na coluna “Cell No”, 1 refere-se a 10 g/L, 2 a 20 g/L e 3 a 30 g/L).	ii
Anexo - Figura 10: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da taxa de mortalidade, na fase da multiplicação, no ensaio da sacarose.....	ii
Anexo - Figura 11: Representação gráfica que comprova que a taxa de multiplicação na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento, não segue uma distribuição normal.	iii
Anexo - Figura 12: Representação gráfica que comprova que o comprimento médio dos rebentos maiores, na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento, não segue uma distribuição normal.	iii
Anexo - Figura 13: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da taxa de multiplicação, na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento.	iv
Anexo - Figura 14: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da qualidade dos rebentos, na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento.....	iv
Anexo - Figura 15: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados do comprimento médio dos rebentos maiores, na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento.....	iv
Anexo - Figura 16: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da taxa de sobrevivência, na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento.	iv
Anexo - Figura 17: Representação gráfica que comprova que o comprimento médio da raiz maior, na fase do enraizamento, segue uma distribuição normal.	vi
Anexo - Figura 18: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da taxa do enraizamento ex vitro.	vi
Anexo - Figura 19: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados do comprimento da raiz maior, para o enraizamento ex vitro. vi	vi
Anexo - Figura 20: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da qualidade das plântulas, para o enraizamento ex vitro.....	vii

Lista de tabelas

Tabela 1: Classificação científica da <i>C. lusitanica</i> Mill.	4
Tabela 2: Composição dos meios de cultura utilizados para o estabelecimento de <i>C. lusitanica</i>	18
Tabela 3: Composição do meio de cultura utilizado para o ensaio em biorreatores de imersão temporária, com os respectivos tempos de imersão.	20
Tabela 4: Composição da solução nutritiva utilizada para o enraizamento ex vitro de <i>C. lusitanica</i> , para o substrato da mistura de turfa com perlite.	23
Anexo - Tabela 1: Dados obtidos referentes ao estabelecimento de <i>C. lusitanica</i>	ii
Anexo - Tabela 2: Resultados obtidos através dos dados retirados da fase do estabelecimento, em função da interação do meio de cultura, com o tempo de desinfecção, com a concentração do NaClO.	i
Anexo - Tabela 3: Resultados obtidos através dos dados retirados da fase do estabelecimento, em função do meio de cultura.	i
Anexo - Tabela 4: Efeito das diferentes concentrações de sacarose na fase de multiplicação in vitro de <i>C. lusitanica</i>	ii
Anexo - Tabela 5: Efeito das diferentes citocininas e concentrações, na multiplicação in vitro de <i>C. lusitanica</i>	v
Anexo - Tabela 6: Efeito das diferentes concentrações de AIB no enraizamento in vitro de rebentos de <i>C. lusitanica</i>	v
Anexo - Tabela 7: Efeito da presença/ausência de agulhas basais e do tipo de substrato, na fase do enraizamento ex vitro, em rebentos de <i>C. lusitanica</i>	vii

Lista de siglas e abreviaturas

- 2,4-D – Ácido 2-4-Diclorofenoxiacético
- 2iP – 6-(γ - γ -Dimethylallylamino)-Purina
- AG₃ – Ácido Giberélico
- AIA – Ácido 3-Indolacético
- AIB – Ácido Indole-3-Butírico
- ANA – Ácido Naftalenoacético
- BAP – 6-Benzilaminopurina
- CBPBI – Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
- CFLH – Câmara de Fluxo Laminar Horizontal
- DKW – Meio de Driver e Kuniyuki (Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. In Vitro Propagation of Paradox walnut Rootstock, Hort. Science, 19(4), August 1984).
- ENF – Estratégia Nacional para as Florestas
- FSC – Forest Stewardship Council
- F4F – Forest for Future
- ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas
- IFN – Inventário Florestal Nacional
- IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza
- KIN – Cinetina
- LC – *Least Concern*
- MS – Meio de Murashige e Skoog (Murashige T. and Skoog F., Physiol. Plant, 15, 473, 1962).
- NaClO – Hipoclorito de Sódio
- PGF – Plano de Gestão Florestal
- PP – Projeto Piloto
- RC – Regulador de crescimento
- RDFCI – Redes de Defesa da Floresta Contra Incêndios
- RJAAR – Regime Jurídico de Ações de Arborização e Rearborização
- UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
- WPM – Woody Plant Medium (McCown & Lloyd, 1981)
- ZEA – Zeatina

1. Introdução

A espécie *Cupressus lusitanica* Mill., vulgarmente conhecido por Cedro-do-Buçaco, é uma planta de estrato arbóreo, resinosa, da família Cupressaceae e alóctone, sendo originária da América Central. Foi introduzida em Portugal na Época dos Descobrimentos, de forma a potencializar a construção e modernização das embarcações portuguesas. Para além desse propósito, atualmente é bastante apreciada pelo setor industrial mobiliário e para fins ornamentais. Entre os ciprestes, é a espécie que mais se encontra em Portugal, distribuída nas zonas centro e norte litoral. Está bem-adaptada ao clima mediterrânico e às condições edáficas do país. Existem alguns exemplares dignos de nota, devido às suas dimensões e idade, que se podem encontrar na Mata do Buçaco, Serra da Lousã e Serra de Moncorvo.

Segundo a Estratégia Nacional para as Florestas (ENF), há uma necessidade de valorizar os recursos naturais, uma vez que se tratam de uma fonte de riqueza. A valorização desta espécie passa pela importância dos valores de uso direto (comercial), como a madeira, o pastoreio e a caça e, de uso indireto, a proteção dos solos, a proteção dos recursos hídricos, o sequestro de carbono, a proteção da paisagem, a biodiversidade e a conservação da natureza (Presidência do Conselho de Ministros, 2015).

Do ponto de vista da informação técnica e científica sobre a espécie, ela é escassa, nomeadamente nas áreas da multiplicação e com destaque para a micropropagação, havendo poucos trabalhos experimentais registados. No entanto, estes tipos de estudos são importantes para potencializar as técnicas de multiplicação, para a instalação de novos povoamentos com esta espécie e para assegurar uma gestão florestal sustentável.

A micropropagação consiste na propagação *in vitro* de pequenos explantes vegetais. Existem três técnicas diferentes de micropropagação: embriogénese somática, organogénese e proliferação de meristemas. Esta última é a técnica mais utilizada para a obtenção de clones em larga escala. Tem cinco etapas principais: seleção da planta-mãe e preparação do material vegetal, estabelecimento dos explantes (*in vitro*), multiplicação dos rebentos (*in vitro*), enraizamento (*in vitro* ou *ex vitro*) e aclimatização (que ocorre ao mesmo tempo que o enraizamento, quando este é feito *ex vitro*). Esta é uma técnica que apresenta diversas vantagens, nomeadamente na manutenção da uniformidade genética das plantas e, é um método de propagação rápido e independente das condições atmosféricas. No entanto, também apresenta desvantagens, sobretudo quando se tenta aplicar esta técnica em plantas lenhosas e adultas, apresentando uma taxa de sucesso muito reduzida.

O presente trabalho teve como principais objetivos adaptar procedimentos para o estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização da espécie *Cupressus lusitanica* Mill.. Testar tempos de desinfeção e meios de cultura que se adequam melhor ao estabelecimento da espécie. Avaliar a capacidade de multiplicação e alongamento *in vitro*, recorrendo a diferentes concentrações de sacarose e a diferentes citocininas, em meio de cultura semissólido. Verificar a existência de vantagens/desvantagens na utilização de biorreatores para a multiplicação e alongamento dos rebentos. Avaliar a capacidade rizogénica, tanto *in vitro* e conseqüente aclimatização *vs.* enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a aclimatização.

1.1. Importância das plantas

A floresta atual portuguesa é o resultado de diversas mudanças ao longo dos tempos, desde a distribuição geográfica, clima e atuação do Homem. A floresta autóctone começou-se a desenvolver desde há 13000 anos atrás, em que começaram a aparecer os primeiros carvalhos, que deram origem aos bosques. Mais tarde, começaram-se a formar as primeiras florestas, que eram frequentadas tanto por carvalhos de folha caduca, como por árvores de folha persistente (é o exemplo da azinheira e do sobreiro). Seguiram-se o surgimento de outras espécies, como as ripícolas, junto às linhas de água e outros arbustos, como é o caso do azevinho e do medronheiro. Posteriormente, ocorreram as ocupações de povos, que recorreram excessivamente à agricultura, nomeadamente ao pastoreio, provocando uma desflorestação acentuada. Com a Época dos Descobrimentos, a floresta tornou-se uma fonte de madeira para a construção de embarcações, causando assim uma depressão mais acentuada na floresta portuguesa. Devido à escassez de madeira, houve a necessidade de se criarem as primeiras regulamentações, de forma a fazer cumprir a proteção das florestas (Floresta Comum, 2014). No século passado verificou-se um acréscimo da floresta em Portugal, uma vez que foram plantados pinheiros, sobreiros e azinheiras, altura em que também foram introduzidos os eucaliptos em maior escala (florestas.pt, 2022).

Atualmente, a floresta autóctone portuguesa ocupa cerca de 39% do país, sendo que a sua ocupação é a mais representativa do solo nacional (florestas.pt, 2022). Existem 4 grupos principais de espécies na floresta portuguesa: eucaliptais; carvalhos, castanheiros e outras folhosas; montados de sobreiro e azinheiras; pinhais (**Figura 1**).

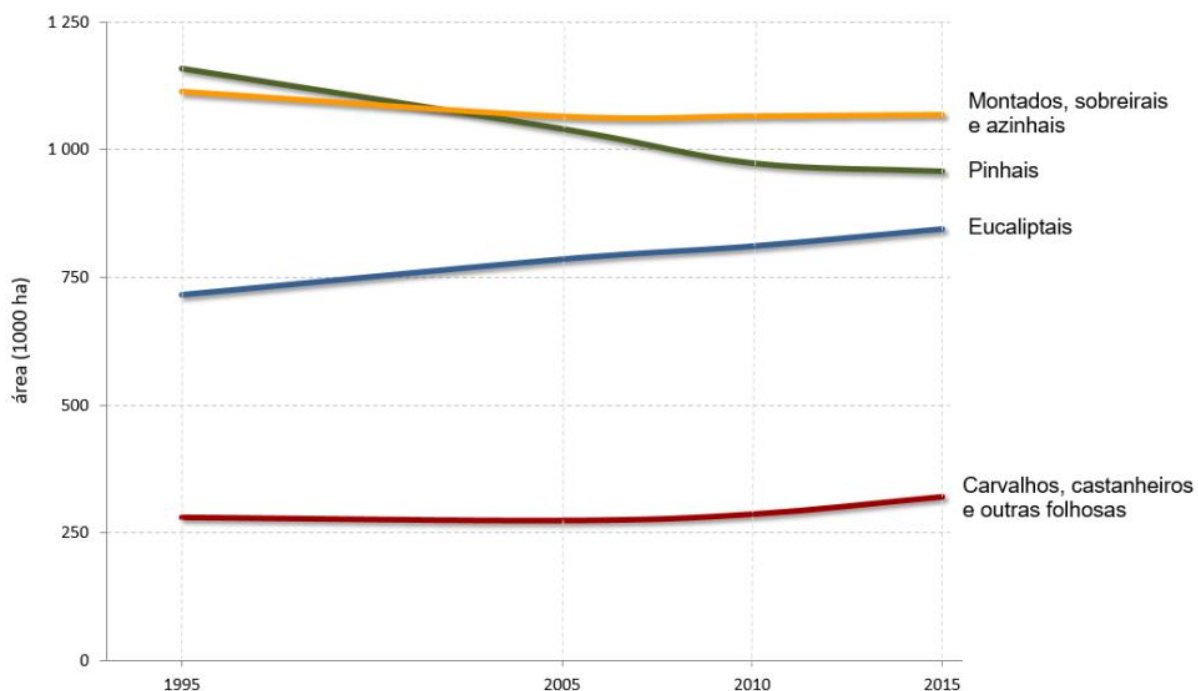


Figura 1: Evolução da ocupação das principais espécies e formações florestais em Portugal, desde o ano de 1995 a 2015. (Fonte: Dados obtidos através do 6º Inventário Florestal Nacional (IFN) (ICNF, 2019))

As plantas florestais apresentam uma importância muito significativa, pois são elas que fazem a constituição da floresta, que por sua vez tem uma função importante a nível ecológico e ambiental, nomeadamente na conservação da água, do solo e da biodiversidade (Floresta Comum, 2014). A floresta permite a garantia da conservação de água, pois as raízes das plantas permitem uma melhor infiltração da água no solo. A cobertura florestal, não é só essencial para a proteção dos solos, – nomeadamente de erosões, que podem ocorrer pelo excesso de água proveniente das chuvas, e, evaporação excessiva, que podem ocorrer devido ao excesso de raios solares e ventos fortes, – como também enriquece os solos oferecendo-lhes nutrientes, através da matéria orgânica. Os solos florestais são os principais responsáveis pela captura de carbono (florestas.pt, 2021). Relativamente à biodiversidade, trata-se de desempenhar funções no que diz respeito à conservação de *habitats* de espécies de fauna, permitindo assim que os animais selvagens consigam através dela obter abrigo e alimentação, dando continuidade à sua reprodução. É também fundamental na conservação de espécies de flora, que por sua vez, cria uma relação trófica com a fauna (Floresta Comum, 2014).

Dentro de todas as plantas existentes nas florestas, existem as plantas resinosas, designadas também por coníferas – devido à maior parte das árvores apresentarem os seus frutos com a forma de cone – e que pertencem ao grupo botânico das gimnospermas. Por norma, são plantas que apresentam folha perene, sendo em agulhas ou em escamas. Dentro das resinosas existem diversos géneros, estando incluídos os *Pinus*, os *Cupressus*, os *Cedrus* e os *Juniperus* (UTAD, 2004).

Em virtude da garantia de uma boa produção de espécies florestais, há também a necessidade de se obterem plantas com maior resistência a doenças e pragas, assim, surge o interesse na aposta do melhoramento genético das mesmas. Para isso, existem técnicas de multiplicação vegetativa, com elevada importância na propagação dos genótipos que têm as características mais interessantes, permitindo a obtenção de clones, de forma a garantir a continuidade genética. Uma das técnicas que se utiliza com esta finalidade, é a micropropagação (Canhoto, 2010).

1.2. A espécie *Cupressus lusitanica* Mill.

A espécie *Cupressus lusitanica* Mill., que tem como designação científica *Cupressus lusitanica* Mill. var. *lusitanica* (Figura 2), foi assim atribuída pelo autor Phillip Miller, no ano 1768. É vulgarmente conhecido por Cipreste-do-Buçaco, cedro-do-Buçaco, cedro-de-Goa, falso-cedro-do-Buçaco, entre outros. É uma planta de estrato arbóreo, resinosa, da família Cupressaceae e alóctone. Entre os ciprestes, é a espécie que mais se encontra em Portugal. Existem alguns exemplares que se destacam, devido às suas dimensões e idade (Melo et al., 2019; Farjon, 1993).



Figura 2: Registo fotográfico de *C. lusitanica* Mill., no parque da Pena (Sintra).

1.2.1. Taxonomia e descrição botânica

Com base nas suas características morfológicas, esta planta pertence ao Filo Pinophyta, Classe Pinopsida, Ordem Pinales, Família Cupressaceae e Género *Cupressus* (**Tabela 1**). Este é o mesmo género que o *Cupressus arizonica* Greene, *Cupressus sempervirens* L. e *Cupressus macrocarpa* Hartweg ex Gordon, também existentes em Portugal (UTAD, 2004).

Tabela 1: Classificação científica da *C. lusitanica* Mill..

Domínio	Eukarya
Reino	Plantae
Filo	Pinophyta
Classe	Pinopsida
Ordem	Pinales
Família	Cupressaceae
Género	<i>Cupressus</i>
Espécie	<i>Cupressus lusitanica</i> Mill.

Na atribuição do nome da espécie, Phillip Miller, partiu de exemplares oriundos da Mata do Buçaco, daí o termo *lusitanica*. Sem conhecer o país de origem da espécie, o autor, presumiu que esses exemplares teriam vindo de Goa, quando na verdade são provenientes da América Central. Esse erro foi repetidamente cometido em diversas publicações desde o século XVIII, tendo ficado conhecido na língua inglesa como Cedar-of-Goa (SERRALVES, 2022).

1.2.2. Distribuição geográfica, ecologia e importância

Os dois géneros com maior distribuição geográfica da família Cupressaceae são os *Cupressus*, a par com os *Juniperus*, principalmente, na América do Norte, Médio Oriente, Ásia e Europa (Okino, et al., 2010).

O Cipreste-do-Buçaco é originário do México, onde é espécie espontânea, assim como na Guatemala, em zonas próprias, situadas entre os paralelos 15° e 28° de latitude Norte e 89° a 108° de longitude Oeste (UTAD, 2004) e tem larga expansão nas montanhas do maciço central, desde os 1800 m aos 2600 m de altitude, podendo medrar até aos 3200 m, essencialmente nas encostas e ravinas profundas, onde a humidade é constante. Distribui-se ainda na Colômbia e Costa Rica (Correia & Oliveira, 2002).

Por norma, distribui-se naturalmente, nas mesmas regiões que o género *Pinus* e, acima dos 3100 m da altitude, encontra-se com os abetos. Atualmente, encontra-se em abundância na Califórnia, na África Oriental, na Nova Zelândia, em Portugal, em Espanha, na França, em Itália e no Brasil. Entre os ciprestes, esta é a espécie que mais se verifica em Portugal (UTAD, 2004).

Foi introduzido em Portugal, na Época dos Descobrimentos, entre o século XV e XVII na mata do antigo Convento do Buçaco, onde se encontram alguns exemplares que se caracterizam pelas suas dimensões e idade. Foram esses exemplares, que foram mais tarde enviados para outros países da Europa e para o Brasil, onde a árvore continua a ser designada como "portuguesa", tal como consta no nome científico (Shimizu, Júnior, & Ribatski, 1995).

Em Portugal, ocupa a zona centro e norte litoral, desde o Oeste até ao Minho (**Figura 3**) (UTAD, 2004). É uma espécie que está disseminada em diversos espaços, tendo uma ocorrência frequente em florestas, em parques e jardins urbanos e, em áreas sociais.



Figura 3: Distribuição geográfica da *C. lusitanica*, em Portugal Continental. (Fonte: https://jb.utad.pt/especie/Cupressus_lusitanica)

Podem-se encontrar alguns exemplares monumentais na Mata do Buçaco (Fundação Mata do Bussaco, 2017), na Serra da Lousã (florestas.pt, 2020), na Serra de Moncorvo (Expandindústria, 2015) e no Parque da Pena e Monserrate, em Sintra (Melo et al., 2019).

As características ecológico-culturais desta espécie florestal em Portugal, passam pelas condições edafoclimáticas, técnicas de silvicultura e os seus usos. No que diz respeito ao clima, é nas zonas ecológicas com maior influência atlântica que esta espécie encontra as melhores condições de desenvolvimento, nos níveis basal, submontano e montano (Correia & Oliveira, 2002). Está bem-adaptada para zonas de influência mediterrânica, por ser exigente em teores de humidade, – compreende uma precipitação média anual de 400 mm a 900 mm, suportando valores superiores a 1000 mm nas cotas mais elevadas, – e temperatura média anual compreendidas entre os 10°C e os 17°C (UTAD, 2004). Relativamente aos solos, apesar de na sua área de origem se ter desenvolvido em solos vulcânicos, em Portugal, tem-se adaptado bem a solos derivados de rochas sedimentares, nomeadamente arenitos e calcários e derivados de rochas eruptivas, em particular granitos e dioritos (Correia & Oliveira, 2002).

É uma espécie que possui alguns fatores limitantes, tais como: solos pouco profundos; solos com drenagem inadequada; não resiste à competição com a vegetação espontânea, como gramíneas, nas primeiras fases de desenvolvimento; existem agentes patogénicos que lhe causam danos (como por exemplo o cancro cortical, provocado pelo fungo *Seiridium cardinale*); é sensível à geada, ventos fortes e a zonas de nebulosidade excessiva (Chaves & Fonseca, 1991; Caetano & Ramos, 2009).

Esta espécie é intolerante ao ensombramento, sendo, portanto, uma espécie de luz/heliófila, uma vez que necessita de exposição à luz solar para viver e reproduzir. É considerada uma árvore de crescimento relativamente rápido, com registos de produção média anual superior a 10 m³/ha/ano, em povoamentos de 35 a 45 anos, sendo que, após essa idade a produção anual diminui (Correia & Oliveira, 2002).

Nas ações de plantação, são utilizadas plantas com 1 ano de idade e retanchadas até o outro ano, ou seja, nas duas campanhas de plantação seguintes. Não se encontrou qualquer referência a densidades de plantação na bibliografia portuguesa, no entanto, utiliza-se normalmente o compasso de 3x2 m (Correia & Oliveira, 2002), tendo sempre em conta as condições edafoclimáticas do local, o material vegetal a utilizar e a presença de outros agentes bióticos, como a fauna silvestre que possa comprometer o bom desenvolvimento das plantas (Direção de Serviços de Valorização do Património Florestal, 2003).

A avaliação da qualidade das plantas a utilizar na plantação é feita em função das características genéticas (proveniência da semente que deu origem à planta e adequabilidade às características ecológicas onde se pretendem instalar) e das características externas (equilibradas e sem deformações, feridas ou doenças). Ao contrário do que acontece com algumas espécies cuja comercialização é atualmente de certificação de qualidade obrigatória, a plantação desta espécie, através de plantas de torrão, não carece de certificação de qualidade, pelo que se recomendam apenas as especificações legais aplicáveis, a par dos pinheiros e restantes cupressáceas (Direção de Serviços de Valorização do Património Florestal, 2003).

As restantes ações silvícolas na condução dos povoamentos de *C. lusitanica* passam por várias limpezas de matos, desramações, fertilizações e vários desbastes, até ao corte final, aproximadamente aos 40 anos (Correia & Oliveira, 2002), tendo em vista uma das

principais utilizações, a produção de lenho para obtenção de madeira de elevada qualidade, para além de ser utilizada enquanto ornamental (Vasconcelos et al., 2018).

De forma geral, os *Cupressus* têm características de madeira semelhantes: interessante granularidade, densidade média-baixa, baixo encolhimento, excelente estabilidade e, mais importante, durabilidade natural elevada. A madeira dos ciprestes é altamente adequada para uso em marcenaria externa, como mobiliário, painéis de proteção e construção de barcos. Embora seja usado atualmente em móveis, a baixa dureza superficial da madeira de cipreste o diminui para esse uso (Okino, et al., 2010)

Na *C. lusitanica*, a madeira obtida, de cor amarelada, às vezes castanha-pálida ou ligeiramente rosada, com cerne mais ou menos distinto (Correia & Oliveira, 2002), tem uma textura fina e uniforme e é pouco durável em contato com o solo, difícil de ser tratada pelos processos de imersão e pouco permeável nos processos de impregnação. O tratamento pode ser consideravelmente melhorado pelo uso da técnica de incisão. É leve e fácil de trabalhar, aceita bem vernizes, colas e pinturas. É bem aproveitada para produção de postes, mourões, em carpintaria de obra, na produção de alguns tipos de móveis, caixotarias e construções rurais. Todavia, esta madeira é fraca e inadequada para usos que requerem resistência mecânica. Por outro lado, não apresenta dificuldade no processo de polpação, no entanto, a polpa apresenta baixa resistência ao rasgo, o que a torna desapropriada para a produção de pasta de papel (Pereira & Higa, 2003).

Trata-se de uma madeira de boa qualidade, pesada, dura e fácil de trabalhar e, por isso, é muito utilizada em carpintaria e marcenaria, para produção de móveis (Melo et al., 2019), para construção de elementos estruturais e limpos, mobiliário maciço, painéis decorativos, carpintaria fina, contraplacados e folheados (toros com poucos nós), microlaminados, aglomerados de partículas e celulose (Correia & Oliveira, 2002). Para além disso, tem grão fino, o alburno de cor branco-amarelado e o cerne castanho avermelhado. Entre as suas aplicações está a criação de sebes em jardins. É uma espécie que resiste bem a podas, proporcionando a criação de vários tipos de figuras e desenhos, nessa finalidade (SERRALVES, 2022).

Pode assumir outras funções, para além de planta ornamental nos jardins das habitações ou, como é vulgarmente vista, nos jardins públicos, como proporcionar o efeito de “cortina de abrigo” tanto ao nível visual, como contra os ventos e geadas para defesa de culturas, proporcionar ensombramento e, através da sua abundante ramificação permite uma boa cobertura do solo, travando o desenvolvimento dos matos e outra vegetação espontânea (Correia & Oliveira, 2002), contribuindo para a descontinuidade horizontal no caso da propagação de incêndios rurais.

Uma curiosidade, é o facto do braço das guitarras ser constituído por esta madeira, devido à sua densidade ser a mais apropriada (FSC, 2020). Além disso, a Certificação Forest Stewardship Council (FSC) de Projeto inclui a *C. lusitanica* noutros produtos e construções, atribuindo-lhe valor na cadeia quando se trata de madeira certificada. Do ponto de vista paisagístico, os povoamentos de *C. lusitanica* exaltam um embelezamento natural e emitem uma sensação olfativa característica

Atualmente, esta árvore tem sido bastante utilizada nas arborizações efetuadas ao abrigo dos programas comunitários de reflorestação. Apesar de se tratar de uma espécie

resinosa, apresenta menor inflamabilidade e combustibilidade do que os pinheiros (Expandindústria - Estudos Projectos e Gestão de Empresas, SA, 2015).

É considerada uma espécie exótica, uma vez que é uma planta introduzida fora da sua área de distribuição natural, que se adaptou às condições locais e, posteriormente, conseguiu reproduzir-se. Trata-se de uma espécie florestal de estrato arbóreo, com utilização no âmbito florestal em Portugal Continental e está contemplada na lista de espécies exóticas não invasoras abrangidas pela “lista de espécies exóticas não incluídas na lista nacional de espécies invasoras”, estabelecida de acordo com o n.º 4 do artigo 1.º do Decreto-Lei n.º 92/2019 de 10 de julho (Presidência do Conselho de Ministros, 2019). Assim, trata-se de uma espécie de introdução antrópica antiga, com estatuto naturalizada (Costa, et al., 2016).

Do ponto de vista internacional no que respeita à conservação da natureza, assume um estatuto de Conservação, segundo as categorias da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), correspondente a *Least Concern* (LC), ou seja, é pouco preocupante ao nível global (Farjon, The IUCN Red List of Threatened Species in 2013, 2013).

Deve obedecer a algumas limitações para ser utilizada no terreno, tais como, respeitar as exceções das restrições decorrentes de legislação específica, como as normas das Redes de Defesa da Floresta Contra Incêndios (RDFCI), do Regime Jurídico de Ações de Arborização e Rearborização (RJAAR), de planos de gestão florestal (PGF), de instrumentos de ordenamento e gestão de áreas protegidas e de outros programas especiais (ICNF, 2022).

A *C. lusitanica* é uma árvore monóica, perenifólia, megafanerófito, de crescimento rápido, chegando a atingir cerca de 30 metros de altura e os 100 cm de diâmetro, com copa piramidal nos indivíduos jovens e copa aplanada no cimo nos adultos (UTAD, 2004). Apresenta um tronco ereto, com ritidoma castanho-avermelhado, sendo que nos indivíduos jovens apresenta-se em placas e nos adultos é acastanhado e fendido longitudinalmente. Os ramos são curtos, em flecha e apresentam raminhos geralmente pendentes (Vasconcelos et al., 2018).

Esta espécie adota um regime de folha persistente, apresentando folhas opostocruzadas, com escamas, agudas e livres no ápice. Os ramos são todos cobertos pelas folhas imbricadas, com a cor verde glauco (**Figura 4**) (Vasconcelos et al., 2018).



Figura 4: Pormenor de folhas de *C. lusitanica*, na Quinta do Furadouro (Óbidos).

Trata-se de uma planta com floração unissexual. As flores masculinas têm estruturas com 0,4 cm a 0,6 cm e as femininas têm escamas inicialmente glaucas, mais tarde ficam acastanhadas-brilhantes, pedunculadas. Quanto à sua frutificação apresenta-se como um pseudofruto, que é característico das gimnospérmicas. No caso, consiste em gábulos globosos com 1 a 1,5 cm (**Figura 5 (A)**), apresentando 6 a 8 escamas oposto-cruzadas, lenhosas, peltadas, escuro com mucrão desenvolvido e agudo (**Figura 5 (B)**) e, com maturação bienal (Vasconcelos et al., 2018). A partir dos 6 anos de idade das árvores, as sementes produzidas já são férteis, sendo que cada gábulos contém 8 a 10 sementes, que são estreitamente bialadas (**Figura 5 (C)**) (UTAD, 2004).



Figura 5: Frutificação e sementes de *C. lusitanica*. (A) Frutificação na árvore, capturado na Quinta do Furadouro (Óbidos). (B) Frutificação com as escamas abertas. (C) Sementes de *C. lusitanica*.

A **Figura 6** lustra esquematicamente a evolução dos grandes grupos de plantas terrestres, onde se inclui o grupo Cupressidae (Carapeto et al., 2020).

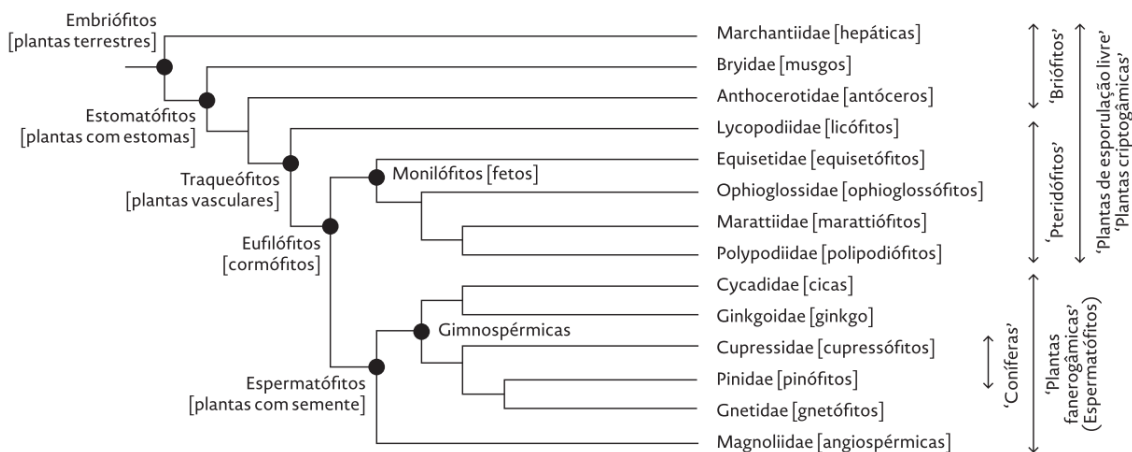


Figura 6: Relações evolutivas entre os grandes grupos de plantas terrestres. O sufixo «-idae» refere-se à categoria de subclasse; tradução para português entre parênteses retos. As aspas assinalam grupos parafiléticos. (Fonte: Lista vermelha da flora vascular de Portugal Continental)

Atualmente, as plantas com semente repartem-se em dois grandes grupos: gimnospérmicas e angiospérmicas. As gimnospérmicas, onde se incluem os *Cupressus*, não têm flores: os sacos polínicos e os primórdios seminais dispõem-se em estróbilos, respetivamente masculinos e femininos, de difícil interpretação evolutiva. Nestas plantas, o pólen é transportado pelo vento até à entrada (micrópilo) do primórdio seminal

(Carapeto et al., 2020), ou seja, a polinização é anemófila. A época de floração decorre entre os meses de fevereiro e março. O tipo de propagação natural desta espécie resinosa é por semente (Vasconcelos et al., 2018).

Ainda assim, esta planta para além de ter a capacidade de se propagar de forma seminal, também se consegue propagar de forma vegetativa, como por exemplo, recorrendo à técnica de micropropagação. Tem a limitação de quando cortada na base se tornar num cepo, sem capacidade de germinar novos rebentos, em condições naturais (Kratz & Wendling, 2007).

1.3. Abordagens biotecnológicas para a propagação de espécies vegetais

A propagação vegetativa *in vitro* é uma técnica que consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais (George, 2008) e o seu objetivo principal é clonar espécies de plantas ou híbridos que apresentam características interessantes, como por exemplo, uma elevada taxa de crescimento, uma boa tolerância às diferenças de temperatura e salinidade, uma boa capacidade de resistência a pragas e doenças, entre outras (Dutra, Wendling, & Brondani, 2010).

Esta técnica apresenta diversas vantagens, nomeadamente a uniformidade genética das plantas obtidas, bem como o seu rápido crescimento; trata-se de uma forma mais rápida de propagar as plantas vegetativamente, comparativamente com a propagação convencional por estacaria e, por último, as plantas apresentam uma elevada qualidade fitossanitária, pois a propagação *in vitro* ocorre em condições assépticas. Quanto às desvantagens, é de referir que esta forma de propagação não é possível em determinadas espécies vegetais, pois nem sempre a regeneração é possível, principalmente quando se trata de plantas lenhosas adultas, que atingindo a maturação, diminuem a capacidade rizogénica, tornando, por vezes, impossível a obtenção de raízes na fase final da técnica da micropropagação (Martins, 2015; Canhoto, 2010).

1.3.1. Princípios básicos da micropropagação

A micropropagação é uma técnica de multiplicação vegetativa que consiste no cultivo *in vitro* de estruturas biológicas vegetais. Tem como principal objetivo a clonagem de plantas que apresentam características interessantes. Este método de propagação é bastante vantajoso por permitir a obtenção de inúmeros indivíduos (aumento da taxa de multiplicação), num espaço de tempo mais curto, comparativamente com a propagação vegetativa em campo (por exemplo, a estacaria ou a enxertia). Este método torna-se mais interessante por manter a existência das plantas durante todo o ano e conservação de espécies ameaçadas (diminuindo os impactos da sua existência devido à estação do ano, distribuição geográfica ou desaparecimento de espécies) e serem mantidas num ambiente controlado, conforme as necessidades das plantas. Permite ainda a conservação de

material genético por crio-conservação e a produção de plantas geneticamente modificadas ou melhoradas (Sidhu, 2011; Canhoto, 2009).

Assim, existem três métodos para micropropagar plantas: a embriogénese somática, a organogénese e a proliferação de meristemas (Martins, 2015).

A embriogénese somática pode apresentar-se de duas formas: direta e indireta. Na forma direta, ocorre a formação de embriões através de células somáticas, sem ocorrer a formação de *callus*, sendo esta uma técnica menos usual pois poucas são as espécies que respondem por esta via. Na via indireta, que é uma técnica utilizada com maior frequência, induzem-se embriões somáticos a partir das células de *callus*. Para a formação dos embriões somáticos é necessária a utilização de auxinas ou criar condições de stress (Pereira, 2014). Este método de multiplicação vegetativo apresenta algumas desvantagens, no que diz respeito ao crescimento, que ocorre com alguma casualidade de forma assíncrona e alguns dos embriões somáticos podem apresentar anomalias. Por outro lado, quando a propagação é feita a partir da embriogénese somática, existe alguma probabilidade dos clones gerados apresentarem diferenças genéticas entre si e da planta-mãe (Gomes, 2011).

A organogénese, também conhecida como multiplicação de gomos adventícios, é uma técnica que visa a diferenciação de estruturas organogénicas, caulinares e radiculares e constitui também a base de regeneração de plantas após processos de melhoramento genético por recombinação génica e que é frequentemente usada na obtenção de plantas transgénicas. Trata-se de um tipo de multiplicação que pode ocorrer também de forma direta ou indireta (Carvalho et al., 2006). Na forma direta, a organogénese ocorre através de tecidos ou órgãos vegetativos, que se obtêm da planta-mãe. Se porventura se efetuar de forma indireta há primeiro a formação de *callus*. Assim como na embriogénese somática, a organogénese por via indireta pode ter algumas desvantagens, tem-se como exemplo, o facto das plantas clonadas poderem ter maior probabilidade de diferenças genéticas entre si e com a planta-mãe. Esta ocorrência não é necessariamente negativa, pois pode ser usada para o melhoramento genético da planta numa perspetiva de biodiversidade (Gomes, 2011).

A proliferação de meristemas é uma forma de propagação que se caracteriza por ter um tipo de crescimento rápido, que permite a multiplicação das plantas em larga escala (Canhoto, 2010). É utilizada principalmente para a clonagem de plantas e os materiais vegetais utilizados podem ser os meristemas apicais, que contenham algumas folhas primordiais, ou meristemas axilares, habitualmente dormentes (Gomes, 2011). Esta forma de propagação utiliza-se quando uma espécie apresenta dificuldades em se propagar através dos métodos tradicionais, sendo bastante utilizada no melhoramento vegetal, como é o caso da produção de novos híbridos (Canhoto, 2010). Esta via, em relação às metodologias abordadas anteriormente e motivo esse pela qual se utiliza para a propagação em larga escala, apresenta vantagem no que diz respeito ao tempo que é necessário dispensar, pois a regeneração das plantas ocorre diretamente de um explante, sem necessitar da indução de um novo meristema (Pereira, 2014). Também por essa razão, esta técnica faz com que se mantenha uma maior estabilidade genética dos rebentos (Martins, 2015). Este método é, normalmente, o mais utilizado na micropropagação de espécies com relevância comercial (Gomes, 2011).

1.3.2. Importância do meio de cultura

Os meios de cultura são misturas que se fazem através da junção de macronutrientes, micronutrientes inorgânicos, vitaminas, hidratos de carbono e reguladores de crescimento vegetal, entre outras possíveis substâncias. Estes podem ser semissólidos, quando utilizado um gelificante, ou líquidos, dependendo do tipo de sistema de cultivo que se pretende realizar. São utilizados de forma a que estes forneçam substâncias essenciais, que permitem o desenvolvimento das espécies *in vitro* (Zavattieri A. , 2002).

Existem diversos meios de cultura e os seus constituintes variam de acordo com as necessidades específicas das espécies, ou seja, cada espécie tem exigências nutricionais e reguladores de crescimento diferentes, existindo a necessidade de variar os meios conforme as condições que as plantas exigem, tendo em consideração o objetivo do seu cultivo (Martins, 2015).

Os macronutrientes fornecem azoto (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S). Já os micronutrientes disponibilizam boro (B), cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), molibdénio (Mo), manganês (Mn) e zinco (Zn). Como vitaminas podem ser utilizadas a piridoxina, o ácido nicotínico, a biotina, o pantotenato de cálcio, o ácido ascórbico e a riboflavina, no entanto, nenhuma das anteriores é essencial para o cultivo de plantas *in vitro*, sendo que a tiamina é a única vitamina fundamental para este tipo de propagação. Também a glicina, um aminoácido, é considerada uma substância essencial no meio de cultura.

Relativamente aos reguladores de crescimento utilizados na micropropagação, existem três classes: as auxinas, as citocininas e as giberelinas. As auxinas têm como efeito o alongamento celular, a formação de raízes, a dominância apical e os tropismos (crescimento orientado das plantas), das quais as mais utilizados nos sistemas *in vitro* são o ácido 3-indolacético (AIA), o ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D). As citocininas que são responsáveis pelos processos de divisão celular e quebra da dominância apical por estimulação do desenvolvimento dos gomos laterais, sendo as mais utilizadas a 6-benzilaminopurina (BAP), a cinetina (KIN), a isopenteniladenina (2iP) e a zeatina (ZEA). Por último, as giberelinas que têm forte ação nos processos de alongamento celular, sendo o ácido giberélico (AG₃) o mais frequentemente utilizado (Melo, 2002).

1.3.3. Importância das condições de cultura

Para fases de estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro*, as estruturas vegetativas têm a necessidade de estarem dentro de uma sala de cultura (câmara bioclimática), em que os fatores ambientais, tais como a luz (intensidade e fotoperíodo) e a temperatura, sejam controlados (Yildiz, 2012).

Por norma, são utilizadas lâmpadas fluorescentes, por cima de cada prateleira, para manter a luz artificial indicada e mais uniforme para as culturas. Habitualmente, utilizam-se fotoperíodos de 16 horas de luz e de 8 horas de escuro, no entanto, e conforme as culturas com que se trabalham, pode haver a necessidade de se fazer ajustes nas horas

do fotoperíodo, conforme as condições de dias longos ou de dias curtos das plantas (Yildiz, 2012).

Segundo o mesmo autor, a temperatura na câmara bioclimática é igualmente importante quanto a luz, pois as temperaturas desajustadas para as plantas são um dos principais motivos para o insucesso, devido a provocar-lhes stress. Nas espécies de clima temperado as temperaturas são, usualmente, de 25 °C/dia e 20-22 °C/noite.

1.3.4. Fases da micropropagação por proliferação de meristemas

A micropropagação por proliferação de meristemas, caracteriza-se por ter cinco fases principais (**Figura 7**) na sua execução: a seleção da planta-mãe e a devida preparação do explante, o estabelecimento, a multiplicação, o enraizamento (que pode ser executado *in vitro* ou *ex vitro*) e, por última, a aclimatização (Murashige, 1974; Debergh & Maene, 1981).

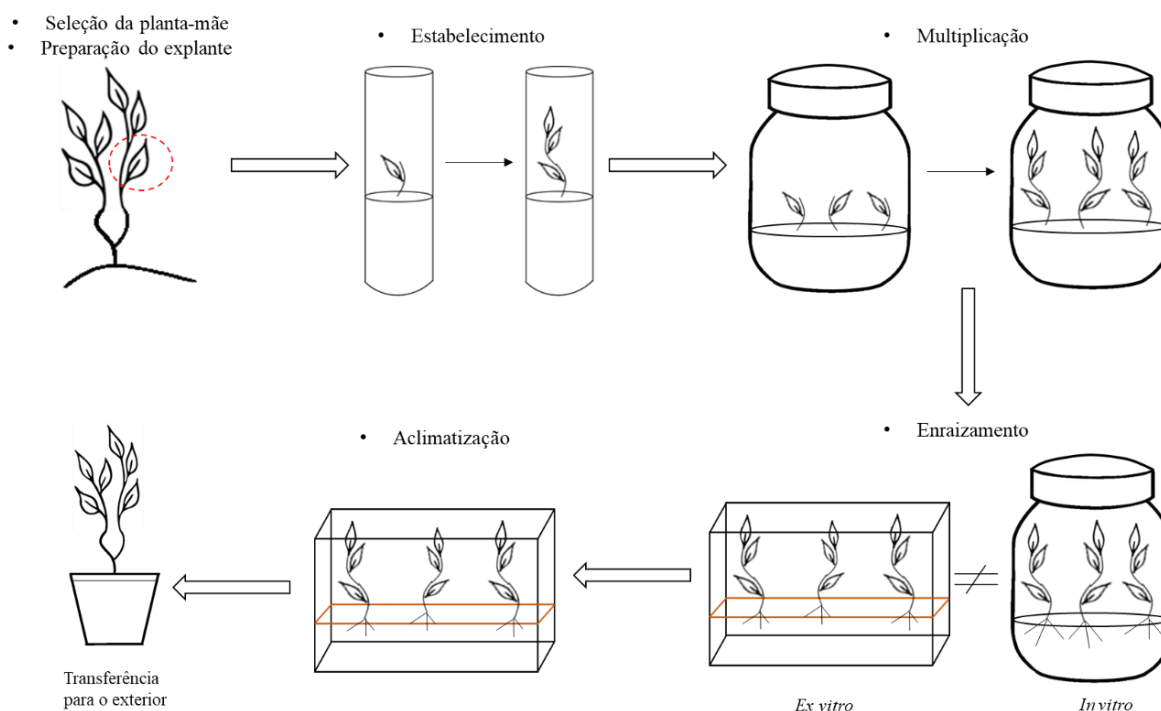


Figura 7: Representação esquemática das fases da micropropagação. A fase de enraizamento pode ser realizada *in vitro* ou *ex vitro*, sendo que neste último caso, pode ser realizada em simultâneo com a fase da aclimatização.

O início da cultura *in vitro*, a seleção da planta mãe e a preparação do explante, é dos momentos mais importantes para todo o processo, pois, as restantes fases dependem das condições da preparação das plantas-mãe, relativamente às contaminações de fungos e/ou bactérias. Dessa forma, há que garantir que as plantas-mãe selecionadas apresentam um bom estado fisiológico e sanitário, mantendo-as em estufa, com crescimento controlado. Estas componentes são fundamentais para o alcance do sucesso máximo no estabelecimento dos explantes (Canhoto, 2010).

Relativamente à segunda fase, o estabelecimento da cultura passa por selecionar os explantes que se pretendem estabelecer. De seguida, faz-se a desinfeção do material vegetal, com diferentes substâncias desinfetantes como álcool, hipoclorito de sódio ou bicloreto de mercúrio, bem como com fungicidas. Depois, faz-se a lavagem com água destilada/esterilizada e, por fim, coloca-se em meio de cultura esterilizado. Após esta fase de desinfeção, há também que ter em consideração alguns fatores como a temperatura e a luz em que os explantes crescem. A temperatura influencia diretamente o crescimento das culturas e a luz tem interferência na qualidade do desenvolvimento das plantas resultantes dos explantes (Zavattieri, 2002).

A fase da multiplicação tem como objetivo multiplicar os rebentos de forma a obter um maior número de novos explantes, ou seja, gerar clones, mantendo a estabilidade genética da planta-mãe. Deste modo, nesta fase é necessário ter em conta a formulação do meio de cultura. A metodologia passa por retirar os rebentos obtidos na etapa anterior, segmentá-los e colocá-los em meio de cultura novo. De forma a garantir o êxito desta fase, pode recorrer-se ao uso de hormonas e/ou reguladores de crescimento, como por exemplo as citocininas que promovem os processos de divisão e de diferenciação celular. Em certos casos, os rebentos que se formam durante a fase de multiplicação, apresentam dimensões inferiores, o que dificulta muito o processo de rizogénese subsequente e impossibilita a transferência das plantas para o solo. Assim, existe a necessidade de efetuar o seu alongamento, recorrendo ao uso de giberelinas. Contudo, existem casos em que o contacto dos explantes com as giberelinas pode afetar, de forma negativa a fase seguinte, o enraizamento (Canhoto, 2010).

A fase seguinte consiste no enraizamento. Esta fase pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes, sendo que pode ser realizada *in vitro* ou *ex vitro*. Recorre-se ao uso de hormonas e/ou reguladores de crescimento, geralmente auxinas, para estimular a iniciação radicular, colocando depois a planta em substrato (Pereira & Peres, 2016). Existem diversos tipos de substratos que podem ser utilizados para o enraizamento *ex vitro*, entre eles estão a turfa, a perlite, a vermiculite, o esfagno, os jiffys, entre outros. Relativamente à turfa, é um substrato que se forma através da decomposição lenta de espécies vegetais e é frequentemente utilizada para o cultivo de plantas, pois devido à sua porosidade, torna-se muito favorável ao desenvolvimento de raízes (Husqvarna, s.d.). A perlite é um substrato que deriva de um tipo de vidro vulcânico e que é muitas vezes utilizada em enraizamentos, devido ao arejamento das raízes e à retenção de humidade. Quanto à vermiculite, deriva de um material de silicato e, ao contrário da perlite, a retenção de muita água não permite o arejamento das raízes, que consequentemente, diminui a quantidade de oxigénio, fazendo com que em certas espécies possa danificar as raízes, apodrecendo-as (GroHo, s.d.). O esfagno é um tipo de musgo utilizado como substrato para culturas que necessitam de uma quantidade maior de humidade, uma vez que este tem uma capacidade de retenção de água muito superior, mantendo assim o substrato mais fresco durante mais tempo (Planeta Huerto, 2019). Quanto aos jiffys, caracterizam-se por serem cápsulas com turfa compactada, envolvida numa rede e têm um orifício, na parte de cima, onde se colocam as plântulas. A sua utilização obriga a que haja uma hidratação prévia de forma a aumentar o seu volume (EcoCenter.pt, s.d.). Por vezes, formam-se raízes espontâneas quando se faz a passagem do meio de cultura utilizado na multiplicação *in vitro*, para o meio de cultura sem adição de hormonas ou reguladores de crescimento de enraizamento. No entanto, em plantas

lenhosas existe uma dificuldade maior em obter raízes desta forma, pois a capacidade rizogénica é menor (Canhoto, 2010).

A última fase do processo da micropropagação é a aclimatização, que visa otimizar as plantas de condições *in vitro* para *ex vitro*, para, de seguida, irem para a estufa e, por fim, para o campo. Nesta fase, as plantas adaptam-se gradualmente às condições exteriores, nomeadamente luz, temperatura e humidade relativa (Zavattieri, 2002). É neste momento que as plantas desenvolvem estratégias para se adaptarem mais facilmente ao exterior, entre as quais o desenvolvimento de estomas, a indução de mecanismos para controlar a transpiração e a perda de água e, o aumento da taxa de fotossíntese. Por outras palavras, esta fase é essencial para as plantas se adaptarem e tornarem autossuficientes fotossinteticamente (Canhoto, 2010).

1.3.5. Potencialidades da micropropagação de *C. lusitanica*

Como consequência do abandono de espaços agrícolas, existe uma maior probabilidade de risco de incêndios florestais, devido à elevada acumulação de carga de combustível. Assim, existe a necessidade de criar planos de gestão florestal. A *C. lusitanica* apresenta elevado potencial para esse tipo de gestão, uma vez que tem utilidades quanto à produção de madeira, assim como na proteção microclimática e recuperação de solos degradados (Guiomar et al., 2011). Apesar de um reduzido número de estudos publicados quanto à sua produção em larga escala, estes tipos de estudos são importantes para potencializar as técnicas de multiplicação, para a instalação de novos povoamentos e para auxiliar na garantia de uma gestão florestal sustentável.

Para além das potencialidades que apresenta na qualidade da madeira, a *C. lusitanica* também se revela interessante quanto às propriedades do óleo essencial obtido através das suas folhas que, devido às suas propriedades antimicrobianas, é utilizado para diversos tratamentos medicinais, nomeadamente tosse convulsa, hemorroidas e reumatismo. Quando utilizado internamente, auxilia no tratamento de doenças intestinais, como colite e síndrome de Crohn, assim como ajuda também na higiene oral, prevenindo cáries e mau hálito. A medicina tradicional já fazia uso das suas folhas para tratar de doenças da pele, infeções do sistema respiratório e de proteção contra insetos. O óleo desta espécie é composto por toratol, sabineno e α -pineno, sendo os dois primeiros de maior destaque. De acordo com estudos científicos, este óleo essencial não apresenta toxicidade (Teke, Elisée, & Roger, 2013; inovep, 2019).

1.4. Utilização de biorreatores na micropropagação

Os biorreatores são equipamentos utilizados para a propagação *in vitro*, que pretendem substituir o meio de cultura semissólido pelo líquido, aumentando as superfícies de contacto do meio de cultura com os explantes, assim como a produção em larga escala, devido às dimensões dos equipamentos serem maiores do que as utilizadas em meio de cultura gelificado (Figueiredo, 2019).

Existem dois tipos de biorreatores: o de imersão contínua – que mantém os explantes em imersão durante todo o tempo de cultivo – e o de imersão temporária (**Figura 8**) – que tal como o nome indica, faz imersões temporárias, controladas pelo número de imersões diárias e o tempo de imersão. Ambos são utilizados para meios de cultura líquido e têm a capacidade de arejamento, através da renovação de ar. O biorreator de imersão contínua é desvantajoso em comparação com o biorreator de imersão temporária devido ao facto dos explantes permanecerem todo o tempo de cultivo em imersão, causando uma hiperhidratação, que pode apresentar-se sob anomalias no material vegetal. Por esses motivos, o biorreator de imersão temporária apresenta-se mais eficiente devido à existência de um maior controlo dos tempos de imersão (Figueiredo, 2019).



Figura 8: Biorreator de imersão temporária SETIST™.

O sistema de biorreatores de imersão temporária é composto por dois compartimentos, em que o de baixo contém o meio de cultura líquido e o de cima contém os explantes. Cada um dos compartimentos tem uma entrada de ar e uma abertura que permite a conexão de ambos. No caso do compartimento inferior, a entrada de ar faz com que o meio de cultura suba para o compartimento superior, estabelecendo contacto com o material vegetal e nesse compartimento a entrada de ar, permite o arejamento. Ambas as entradas de ar são revestidas por um filtro, de forma a evitar contaminações.

Os biorreatores, quando são bem-sucedidos, apresentam uma alternativa para a multiplicação em meio de cultura semissólido. Nesses casos, significa que poderá ser vantajoso relativamente aos custos, pois têm dimensões maiores comparativamente com os frascos e é suposto que as plantas absorvam mais nutrientes devido a estarem todas elas em contacto com o meio de cultura durante a imersão, isto terá como consequência o aumento da produtividade, reduzindo o custo por planta. Outra vantagem assenta no facto de haver a possibilidade de propagar diferentes órgãos das plantas ao mesmo tempo, isto é, podem-se colocar folhas, caules e raízes dentro do mesmo biorreator de imersão temporária (Scheid, et al., 2009).

2. Materiais e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do CBPBI, que cedeu os equipamentos mencionados ao longo deste capítulo.

2.1. Material vegetal

A propagação *in vitro* inicia-se com a fase do estabelecimento, que necessita da preparação prévia do material vegetal, selecionando os exemplares que servem de plantas-mãe. Desta forma, com o auxílio de uma tesoura de poda, foram colhidos explantes de *C. lusitanica*, com cerca de 1 ano de idade, existentes na coleção do CBPBI (**Figura 9**) e, de seguida, colocados numa tina com água.

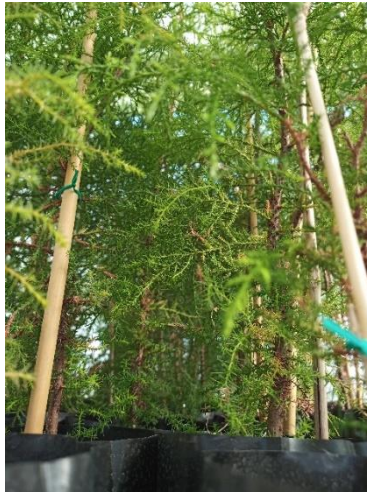


Figura 9: Plantas-mãe utilizadas para o estabelecimento de *C. lusitanica*, existentes na coleção do CBPBI.

2.2. Processo de desinfeção e estabelecimento *in vitro* de *C. lusitanica*

Após a recolha do material vegetal, os rebentos foram colocados numa tina com fungicida (**Figura 10 (A)**) com agitação contínua, utilizando uma placa com agitação (VMS-C7 ADVANCED), durante cerca de 10 minutos. Decorrido esse tempo, descartou-se o sobranete. De seguida, levaram-se os rebentos para a Câmara de Fluxo Laminar Horizontal (CFLH) (BIOBASE BBS-H1800) e colocaram-se em etanol a 70% (**Figura 10 (B)**), durante 30 segundos e, posteriormente, descartou-se de novo o sobranete. Seguidamente, a desinfeção foi feita por imersão dos rebentos em NaClO, em que foram testadas duas concentrações diferentes: 1:3¹ e 1:4², juntamente com algumas gotas de Tween-20 (**Figura 10 (C)**), realizando diferentes tempos de desinfeção: 10 min, 15 min

¹ Concentração de 1 parte de NaClO para 3 partes iguais de água.

² Concentração de 1 parte de NaClO para 4 partes iguais de água.

e 30 min. Por fim, fizeram-se 3 lavagens com água destilada e esterilizada, deixando os rebentos permanecerem na quarta água.

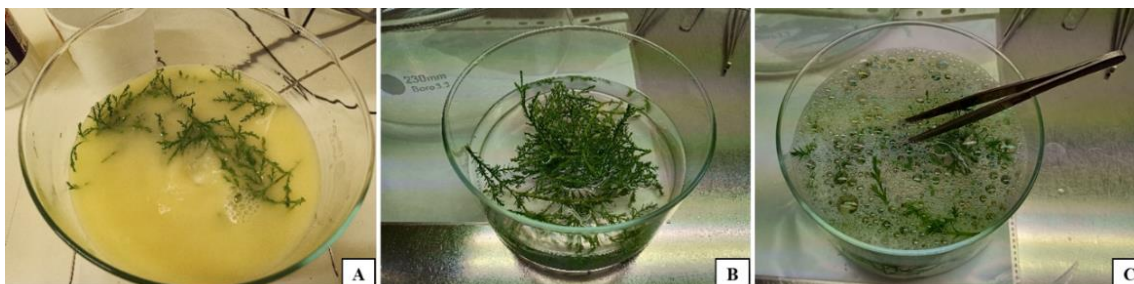


Figura 10: Protocolo de desinfecção para o estabelecimento de *C. lusitanica*. (A) Colocação dos explantes em fungicida, com agitação. (B) Passagem dos explantes por etanol a 70%. (C) Desinfecção com NaClO e Tween-20.

Terminado o protocolo de desinfecção, foram utilizadas pinças e bisturis esterilizados, através de um esterilizador de esferas (STERI 21), para segmentar os rebentos, obtendo explantes com um comprimento entre 1 cm e 1,5 cm. Estes foram colocados em tubos de ensaio, com 13 mL de meio, com dois meios de cultura diferentes, de Murashige e Skoog (1962) (MS) e meio de Driver e Kuniyuki (1984) (DKW), com suplemento de vitaminas, reguladores de crescimento e sacarose (**Tabela 2**). O pH foi ajustado com soluções concentradas de hidróxido de sódio ou de ácido clorídrico e os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm, durante 20 min.

Tabela 2: Composição dos meios de cultura utilizados para o estabelecimento de *C. lusitanica*.

Meio de cultura	Vitaminas (mg/L)	Reguladores de crescimento (mg/L)	Sacarose (g/L)	pH
MS	0,1 Tiamina 0,5 Piridoxina 0,5 Ácido nicotínico	1 BAP 0,5 KIN	30	5,5
DKW	2 Glicina			

Concluída a inoculação, os tubos de ensaio com os explantes primários (**Figura 11**), foram colocados dentro da câmara bioclimática, com fotoperíodo de 16h de luz (lâmpadas fluorescentes cool-white), com intensidade 50 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$ e 8h de escuro, a uma temperatura de 25 °C/dia, 22 °C/noite, durante 6 semanas.



Figura 11: Explantes de *C. lusitanica*, em tubos de ensaio.

Decorrido esse tempo, foram recolhidos os dados para tratamento estatístico e passou-se à fase seguinte, a multiplicação.

2.3. Ensaios de multiplicação *in vitro*

Os ensaios de multiplicação *in vitro*, foram realizados através da população stock, proveniente do estabelecimento mencionado anteriormente. A população stock foi obtida através de meio de cultura DKW, com as vitaminas 0,1 mg/L de tiamina, 0,5 mg/L de piridoxina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico e 2 mg/L de glicina, com 0,5 mg/L de KIN. O pH utilizado foi de 5,5.

Todas as manipulações do material vegetal foram realizadas em CFLH, com esterilizador de esferas para pinças e bisturis e, um borrifador com álcool a 70%, para desinfecção frequente das mãos e da CFLH.

Estes ensaios foram realizados tanto em meio de cultura semissólido, como em meio líquido, sendo que, para o meio semissólido foram utilizados frascos com (Ø8cm x 11cm) (**Figura 12 (A)**) e para o meio líquido, biorreatores de imersão temporária modelo SETISTM (<https://setis-systems.be/home>) (**Figura 12 (B)**).

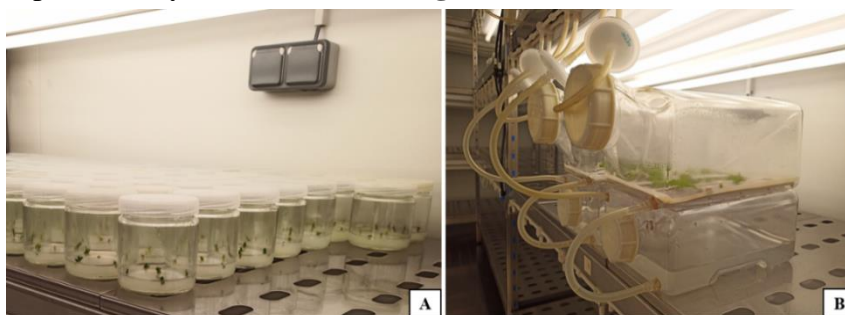


Figura 12: Meios de cultura utilizados no ensaio de multiplicação *in vitro*. (A) Meio de cultura semissólido, em frascos. (B) Meio de cultura líquido, em biorreatores de imersão temporária.

2.3.1. Multiplicação em meio semissólido

Para a realização da multiplicação em meio semissólido, foram realizados vários ensaios, para avaliar o efeito das variações de concentração de sacarose e de citocininas (KIN, 2iP e BAP). Em todos os ensaios foram utilizados 5 frascos, com 7 explantes, totalizando 35. Cada frasco continha 50 mL de meio de cultura DKW.

De forma a realizarem-se os ensaios da concentração de sacarose, utilizaram-se 3 concentrações diferentes, 10 g/L, 20 g/L e 30 g/L.

Relativamente aos testes de concentrações dos reguladores de crescimento, houve a necessidade da utilização de um teste de controlo, em que se fez a repicagem para meio DKW, sem a adição de qualquer regulador (**Figura 13**).



Figura 13: Explantes em meio de cultura DKW, sem adição de regulador de crescimento.

Seguiram-se os testes de concentrações de reguladores de crescimento, em que foram usadas as mesmas concentrações, para diferentes substâncias. Como já referido anteriormente, foram utilizadas diferentes citocininas (que por norma apresentam eficiência na multiplicação): KIN, BAP e 2iP. As concentrações testadas foram: 0,5 mg/L, 1 mg/L e 2 mg/L. Para estes ensaios, utilizaram-se 30 g/L de sacarose.

Os dados foram retirados após 5 semanas de se terem iniciado os ensaios.

2.3.2. Multiplicação em biorreatores de imersão temporária

Para a multiplicação em biorreatores de imersão temporária, fizeram-se 4 ensaios com diferentes tempos de imersão, sendo que o meio de cultura foi igual ao já utilizado na multiplicação para população stock (**Tabela 3**). Foram colocados 50 explantes em cada biorreator.

Tabela 3: Composição do meio de cultura utilizado para o ensaio em biorreatores de imersão temporária, com os respetivos tempos de imersão.

Meio de cultura	Vitaminas (mg/L)	Regulador de crescimento (mg/L)	Sacarose (g/L)	pH	Tempos de imersão
DKW	0,1 Tiamina 0,5 Piridoxina 0,5 Ácido nicotínico 2 Glicina	0,5 KIN	30	5,5	Imersão: 4h em 4h Duração da imersão: 2 min
					Imersão: 6h em 6h Duração da imersão: 3 min
					Imersão: 8h em 8h Duração da imersão: 3 min
					Imersão: 12h em 12h Duração da imersão: 4 min

A **Figura 14** mostra a preparação dos ensaios em biorreatores de imersão temporária.

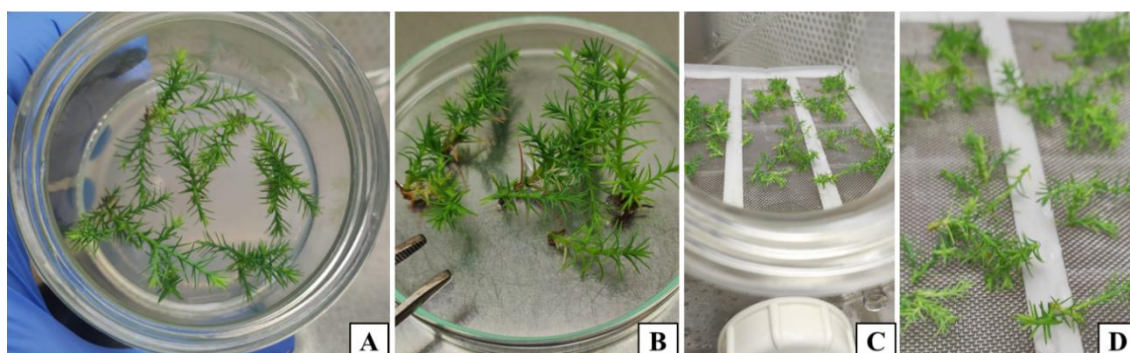


Figura 14: Preparação dos ensaios em biorreatores de imersão temporária. (A) Rebentos provenientes de população stock, utilizados para os ensaios. (B) Preparação dos explantes. (C) Colocação dos explantes dentro dos biorreatores. (D) Vista pormenorizada dos explantes no interior dos biorreatores.

2.4. Ensaios de enraizamento e aclimatização

Em determinadas espécies, a fase de enraizamento inicia-se ainda *in vitro*, no entanto, outras espécies necessitam de um auxílio de substâncias de enraizamento, para que a produção de raízes possa ocorrer.

Para o caso da *C. lusitanica*, realizaram-se ensaios de enraizamento, tanto *in vitro* como *ex vitro*, de forma a avaliar a capacidade rizogénica de ambas as formas.

Na realização dos ensaios *in vitro*, utilizaram-se rebentos com 3 cm a 4 cm de comprimento, desenvolvidos na fase de multiplicação e colocados em meio de cultura DKW, sendo que foram testadas três concentrações diferentes do regulador de crescimento de enraizamento AIB: 1 mg/L, 3 mg/L e 5 mg/L.

Relativamente aos ensaios *ex vitro*, testaram-se dois substratos diferentes: Jiffy-7® (<http://www.jiffypot.com/en/products/jiffy7.html>) (**Figura 15 (A)**) e uma mistura de 1:3³ de turfa com perlite, humedecida a 70% (**Figura 15 (B)**).

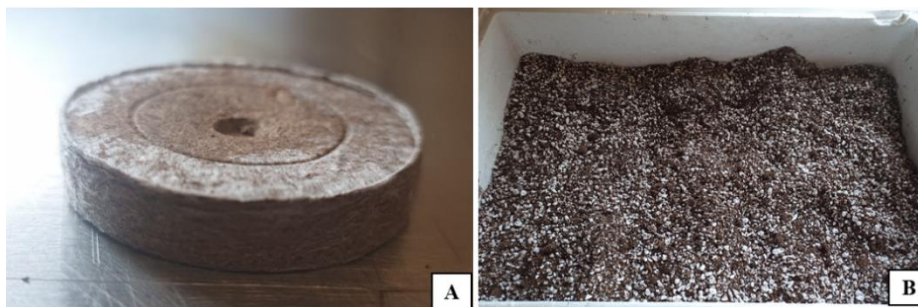


Figura 15: Substratos utilizados para os testes de enraizamento *ex vitro* de *C. lusitanica*. (A) Cápsula de Jiffy. (B) Caixa com mistura de turfa com perlite.

Em relação aos ensaios realizados com Jiffys, foram executadas duas modalidades, cada uma com 30 rebentos: corte da base sem remoção das agulhas do centímetro basal (**Figura 16 (A)**) e corte da base com a remoção de agulhas em cerca de 1 cm da base do caule (**Figura 16 (B)**). O corte da base foi realizado com o auxílio de uma tesoura e para a remoção das agulhas, utilizou-se uma pinça.

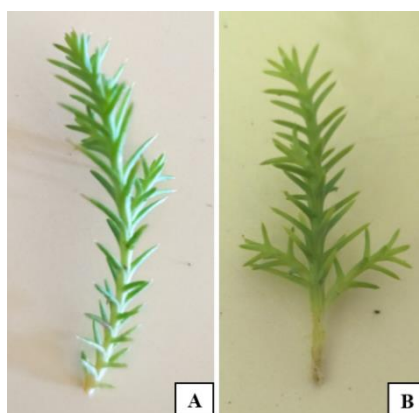


Figura 16: Plântulas de *C. lusitanica* para o ensaio de enraizamento *ex vitro*. (A) Plântula com corte da base. (B) Plântula com corte da base e remoção de agulhas até cerca de 1 cm.

³ Mistura efetuada através de 1 parte de turfa para 3 partes de perlite (v:v).

Após a preparação dos rebentos, colocaram-se Jiffys a hidratar (**Figura 17 (A)**) com a solução de enraizamento AgroBeta Enraizador Plus, diluída em água (10 mL para 5 L de água). De seguida, fez-se a imersão das bases dos rebentos no gel de enraizamento Clonex, (<https://www.growthtechnology.com/product/clonex/>) com a concentração de 3,3 g/L de AIB (**Figura 17 (B)**) e colocaram-se nos Jiffys hidratados (**Figura 17 (C) e (D)**).

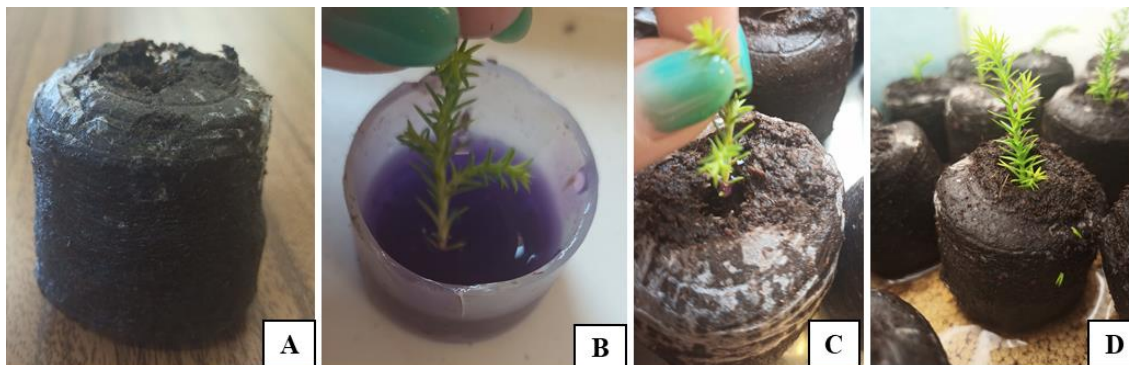


Figura 17: Processo do ensaio de enraizamento *ex vitro* de *C. lusitanica*, através do uso de Jiffys. (A) Hidratação de Jiffys com solução de enraizamento AgroBeta Enraizador Plus. (B) Imersão da base em gel de enraizamento Clonex. (C) Colocação do rebento na Jiffy. (D) Rebento pronto para enraizar/aclimatizar.

Posteriormente, colocaram-se os rebentos dentro de caixas de esferovite, cobertas com uma tampa transparente acrílica (**Figura 18 (A)**) e deixaram-se a aclimatizar na câmara bioclimática com luz (fotoperíodo 16h, intensidade $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), temperatura ($25 \text{ }^\circ\text{C}/\text{dia}$ e $22 \text{ }^\circ\text{C}/\text{noite}$) e humidade exterior controladas (80%) (**Figura 18 (B)**). O enraizamento/aclimatização decorreu 4 semanas com abertura gradual da tampa.

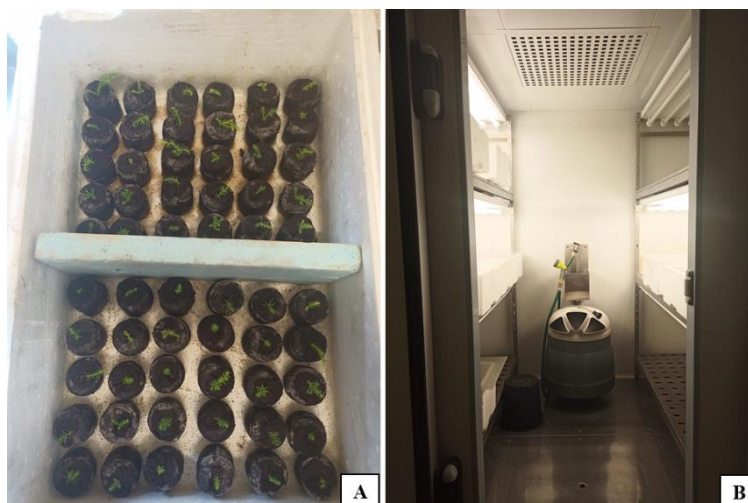


Figura 18: Plântulas para aclimatizar. (A) Plântulas com ensaio de enraizamento *ex vitro*, recorrendo à utilização de Jiffys. (B) Câmara bioclimática para aclimatização.

Para o ensaio realizado com a mistura de turfa com perlite utilizaram-se também 30 rebentos. Primeiramente, preparou-se uma caixa e fez-se a mistura de turfa com perlite e, de seguida, hidratou-se com solução nutritiva (**Tabela 4** e **Figura 19 (A)**). Prepararam-se os rebentos a enraizar, cortaram-se as bases com o auxílio de uma tesoura (**Figura 19 (B)**) e removeram-se as agulhas da base (**Figura 19 (C)**), recorrendo à utilização de uma pinça, à semelhança da técnica utilizada no ensaio anterior. Seguidamente, mergulharam-se as bases das plântulas em gel de enraizamento Clonex (**Figura 19 (D)**) e colocaram-se no substrato (**Figura 19 (E)**).



Figura 19: Processo do ensaio de enraizamento *ex vitro* de *C. lusitanica*, através do uso da mistura de turfa com perlite. (A) Hidratação da mistura do substrato. (B) Corte da base do rebento. (C) Remoção das agulhas da base do rebento. (D) Imersão da base no gel de enraizamento Clonex. (E) Colocação do rebento na mistura do substrato.

Tabela 4: Composição da solução nutritiva utilizada para o enraizamento *ex vitro* de *C. lusitanica*, para o substrato da mistura de turfa com perlite.

Macronutrientes		Micronutrientes	Ferro EDTA	Inositol
MS	NO ₃	MS		
1/2	1/4	Completa	MS	MS

Por fim, fechou-se a tampa da caixa e colocou-se a aclimatizar dentro da câmara bioclimática, nas condições referidas atrás (**Figura 20**).



Figura 20: Colocação da caixa com as plântulas de *C. lusitanica* no substrato de turfa com perlite, a aclimatizar, na câmara bioclimática.

2.5. Recolha de dados e tratamento estatístico

O presente estudo teve como objetivo adaptar procedimentos para as diversas fases da micropropagação por proliferação de meristemas, da espécie *C. lusitanica* Mill.. Para isso, testaram-se tempos de desinfecção diferentes e meios de cultura na fase do estabelecimento; avaliou-se a capacidade de multiplicação recorrendo a ensaios de sacarose e ensaios estabelecidos com diferentes reguladores de crescimento; ainda na fase

da multiplicação, testou-se a utilização de biorreatores; avaliou-se a capacidade rizogénica da espécie em ensaios *in vitro* e *ex vitro*, com a devida aclimatização.

Assim, tiveram-se em consideração diversos parâmetros como: número de contaminações, número de necroses, número de rebentos por explante estabelecido e respetivos comprimentos dos maiores e menores, número de rebentos que desenvolveram raízes *in vitro* e número de plântulas que desenvolveram raízes *ex vitro*.

Para a interpretação dos resultados observados, foram quantificados os seguintes parâmetros:

- 1) Na fase de estabelecimento, foram registadas as contaminações (por fungos ou bactérias) e explantes necrosados, calculando a taxa de sobrevivência;
- 2) Na fase de estabelecimento e de multiplicação, foram registados o número de rebentos por explante, comprimento do maior rebento, comprimento do menor rebento e número de explantes secundários obtidos;
- 3) Foi estabelecida uma escala qualitativa, de 1 a 2, em que 1 representava os rebentos necrosados ou vitrificados e 2 os rebentos que estavam em bom estado fisiológico para a multiplicação;
- 4) Na fase de enraizamento foram registados o número de rebentos enraizados, número de raízes e comprimento da maior raiz e, formação/ausência de formação de *callus*;

Os parâmetros acima mencionados, nomeadamente os dos pontos 3), no ensaio de sacarose e 4), no ensaio de enraizamento *ex vitro*, foram sujeitos à análise de variância, calculada com o modelo ANOVA (através do *Software* STATISTICA, versão 12.0) (Duncan, 1955; Zar, 1996), por se tratarem de variáveis paramétricas e que seguem uma distribuição normal. Quando foram observados valores significativos, ou seja, se os fatores principais admitem que a variância tem significado estatístico, efetuou-se o teste ANOVA, para um nível de significância superior a 5%, de forma a comparar as médias calculadas. Estes testes tiveram como objetivo identificar qual a concentração de sacarose que melhor se adequa à propagação *in vitro* de *C. lusitanica* e qual a melhor condição de enraizamento *ex vitro* para esta espécie (sendo que as letras diferentes, nas figuras ou gráficos, indicam a existência de diferenças significativas entre os tratamentos; $p > 0,05$).

Para as variáveis dos restantes pontos, que não seguem uma distribuição normal, foi efetuada uma análise de variáveis não-paramétricas. Neste contexto, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (recorrendo ao *Software* STATISTICA, versão 12.0) (Duncan, 1955; Zar, 1996), que serviu para comparar as médias, de forma a avaliar a existência de diferenças significativas, quanto às testagens efetuadas (sendo que as letras diferentes, nas figuras ou gráficos, indicam a existência de diferenças significativas entre os tratamentos; $p > 0,05$).

3. Resultados e discussão

Decorridos os tempos necessários a cada fase descrita no capítulo anterior, fez-se a recolha dos dados e o devido tratamento, que são apresentados de seguida.

3.1. Desinfecção e estabelecimento *in vitro*

Após 6 semanas de se ter efetuado o estabelecimento dos explantes de *C. lusitanica*, fez-se a recolha dos dados (**Figura 21**), em que se contabilizaram o número de explantes infetados (fungos ou bactérias) e contabilizou-se também o número de explantes necróticos. Além disso, efetuou-se o registo do número de rebentos obtidos por explante, o comprimento do maior rebento e a taxa de multiplicação.

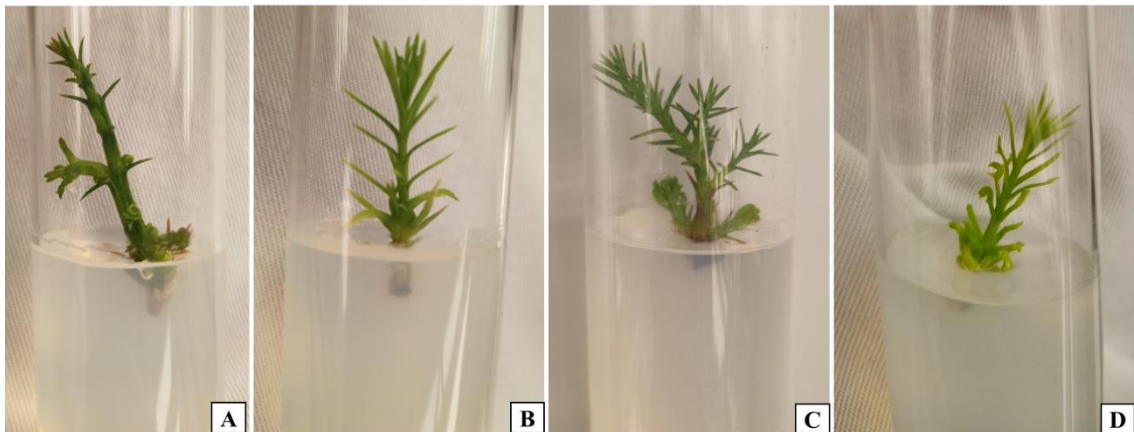


Figura 21: Registos fotográficos dos explantes, após 6 semanas do estabelecimento. (A) Explante sujeito a 10 minutos de desinfecção, com a concentração de 1:3, em meio DKW. (B) Explante sujeito a 30 minutos de desinfecção, com a concentração de 1:4, em meio DKW. (C) Explante sujeito a 10 minutos de desinfecção, com a concentração de 1:4, em meio MS. (D) Explante sujeito a 15 minutos de desinfecção, com a concentração de 1:4, em meio MS.

Relativamente aos dados obtidos para a percentagem de infeções, necrose e sobrevivência, apresenta-se a **Figura 22**, para interpretação dos resultados e o **Anexo - Tabela 1**, com os dados.

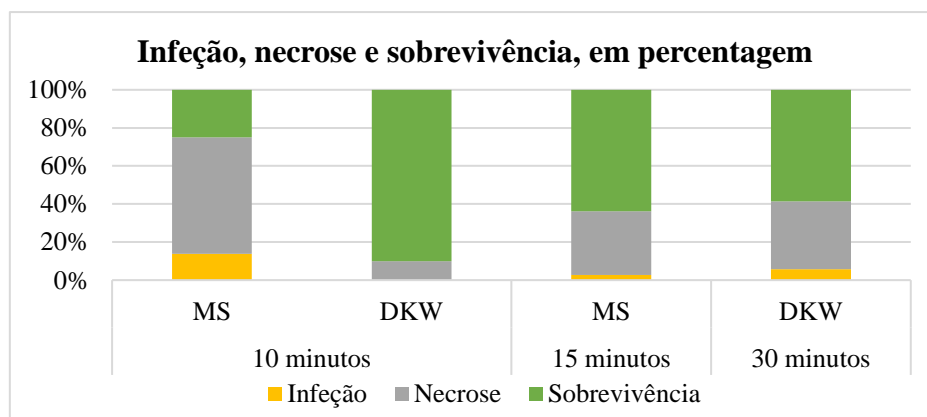


Figura 22: Percentagem de infeções, mortes e sobrevivência dos explantes, de acordo com os tempos de desinfecção e meio de cultura.

Assim, verifica-se que os explantes que estiveram em meio MS, com o tempo de desinfecção de 10 minutos e com a concentração mais baixa de NaClO, foram os que apresentaram maior percentagem de explantes infetados e de necrose, fazendo assim com que a percentagem de sobrevivência fosse a mais baixa. Relativamente aos resultados que apresentaram os valores mais elevados de sobrevivência, foram os explantes que estiveram em meio DKW, com 10 minutos de tempo de desinfecção, com a concentração mais elevada de NaClO, fazendo assim uma taxa de sobrevivência de 90%, sem apresentar qualquer infeção.

Através da recolha dos dados referentes à taxa de multiplicação, à qualidade dos rebentos, ao comprimento do rebento maior e à taxa de vitrificação, fizeram-se as análises estatísticas. Começou-se por verificar se a taxa de multiplicação e o comprimento médio dos rebentos maiores seguiam uma distribuição normal (**Anexo - Figura 1** e **Anexo - Figura 2**) e como não seguiam, passou-se à análise não paramétrica, através do teste de Kruskal-Wallis (**Anexo - Figura 3**, **Anexo - Figura 4** e **Anexo - Figura 5**).

A **Figura 23** mostra os resultados da multiplicação dos rebentos com qualidade, na interação dos meios de cultura (MS e DKW), com os tempos de desinfecção (10 min, 15 min e 30 min), com a concentração de NaClO (1:3 e 1:4).

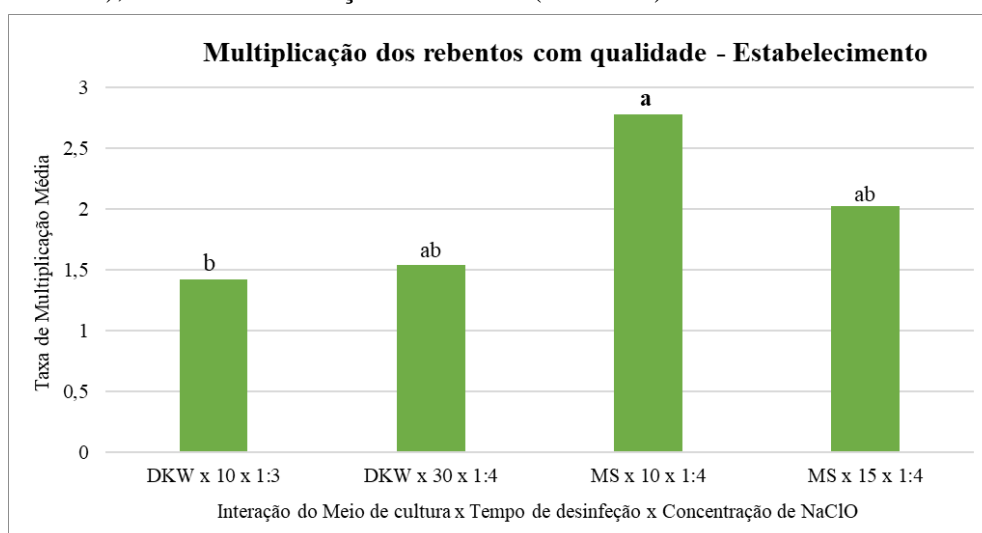


Figura 23: Taxa de multiplicação dos rebentos com qualidade, na interação de meio de cultura, com o tempo de desinfecção, com a concentração de NaClO.

Relativamente à análise da percentagem de infeções e necroses, é possível verificar que os explantes que estiveram sujeitos ao tempo de desinfecção de 10 minutos, à concentração de NaClO de 1:4 e em meio de cultura MS, apesar de terem apresentado uma percentagem de sobrevivência inferior, comparativamente com as restantes condições de estabelecimento, foram os que apresentaram melhor taxa de multiplicação, com os rebentos de qualidade (**Anexo - Tabela 2**). Isto pode dever-se ao facto da permanência dos explantes em NaClO menos concentrado e menor tempo, danificar menos os tecidos vegetais, promovendo melhor o seu desenvolvimento.

No **Anexo - Tabela 2** estão indicados os dados obtidos relativamente à interação do meio de cultura, com o tempo de desinfecção e com a concentração de NaClO e no **Anexo - Tabela 3** os resultados obtidos relativamente à influência dos meios de cultura no estabelecimento.

Como mostra o **Anexo - Tabela 2**, a taxa de multiplicação e a qualidade dos rebentos apresentou melhores resultados nos explantes que estiveram em meio de cultura MS, com o tempo de desinfecção de 10 minutos e com a concentração de NaClO de 1:4, sendo que os resultados foram piores nos rebentos que estiveram em meio DKW, com igual tempo de desinfecção e com a concentração de 1:3 de NaClO. Apesar disso, o parâmetro do comprimento do maior rebento apresentou melhores resultados para os rebentos em que estiveram em meio DKW x 10 minutos x 1:3 de NaClO, com média de 2,5 cm e comprimentos mais reduzidos para os rebentos que estiveram em meio MS x 10 minutos x 1:4 de NaClO, com média de 1,39 cm.

Através do **Anexo - Tabela 3**, é possível verificar que a taxa de multiplicação e a qualidade dos rebentos nesta fase, apresentou valores mais elevados nos rebentos que estiveram em meio de cultura MS, quando comparados com o meio de cultura DKW, assim como a taxa de vitrificação, em que o meio DKW mostrou maior quantidade de rebentos vitrificados. No entanto, o único parâmetro em que o meio de cultura DKW apresentou resultados melhores foi no comprimento do maior rebento, que teve a capacidade de fazer os rebentos alongar mais.

Assim, pode constatar-se que no presente estudo as melhores condições de desinfecção para a espécie *C. lusitanica* foram com o tempo de desinfecção de 10 minutos e com a concentração de 1:3 de NaClO, não apresentando infecções e uma percentagem de necrose reduzida. A qualidade dos rebentos e a taxa de multiplicação teve melhores resultados nos rebentos que estiveram em meio de cultura MS (**Figura 23**). Assim, no futuro poder-se-á testar um novo estabelecimento com o mesmo tempo de desinfecção e com a mesma concentração de NaClO, sendo que os rebentos ficarão em meio de cultura MS, uma vez que não foi uma condição testada.

Segundo Borsoi (2009), o excesso de tempo em NaClO, ou a sua concentração excessiva, pode provocar intoxicação dos tecidos vegetais, podendo causar necrose ou retardar no desenvolvimento dos explantes. Isto pode ser o motivo pela qual as condições de estabelecimento superiores a 10 minutos, com a concentração de 1:4 de NaClO, terem apresentado maior percentagem de rebentos necrosados. A concentração de 1:3 de NaClO também poderá ter sido excessiva, tendo apresentado uma taxa de multiplicação mais reduzida nesses rebentos.

3.2. Ensaio de multiplicação *in vitro*

A recolha dos resultados dos ensaios de multiplicação *in vitro* realizou-se após 5 semanas do início do ciclo de multiplicação. Os parâmetros utilizados para quantificar os resultados foram o número de rebentos obtidos que cada explante gerou, o comprimento do maior e do menor rebento e, o número de novos explantes que os rebentos originaram.

3.2.1. Multiplicação em meio semissólido

Como mencionado anteriormente, os ensaios de multiplicação em meio semissólido pretenderam testar o efeito de diferentes concentrações de sacarose e testar diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento.

No que diz respeito ao ensaio da concentração de sacarose (**Figura 24**), os rebentos foram analisados conforme os parâmetros de avaliação, em que se verificou que a taxa de multiplicação não segue uma distribuição normal (**Anexo - Figura 6**) e o comprimento médio dos rebentos maiores segue uma distribuição normal (**Anexo - Figura 7**). Para as variáveis de avaliação em que se verificou que não seguem uma distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (**Anexo - Figura 8** e **Anexo - Figura 10**) e, na variável que segue uma distribuição normal, utilizou-se o teste de Tukey (**Anexo - Figura 9**).



Figura 24: Ensaio da concentração de sacarose. Da esquerda para a direita: 10 g/L, 20 g/L e 30 g/L.

Os resultados da taxa de multiplicação, no ensaio de sacarose, apresentam-se na **Figura 25**. O **Anexo - Tabela 4**, mostra os resultados dos parâmetros de avaliação utilizados: taxa de multiplicação; qualidade dos rebentos qualificada de 1-2, em que 1 representou os rebentos necrosados e vitrificados e 2 os rebentos em bom estado fisiológico; comprimento do maior rebento, medido em centímetros; e taxa de sobrevivência, em percentagem.

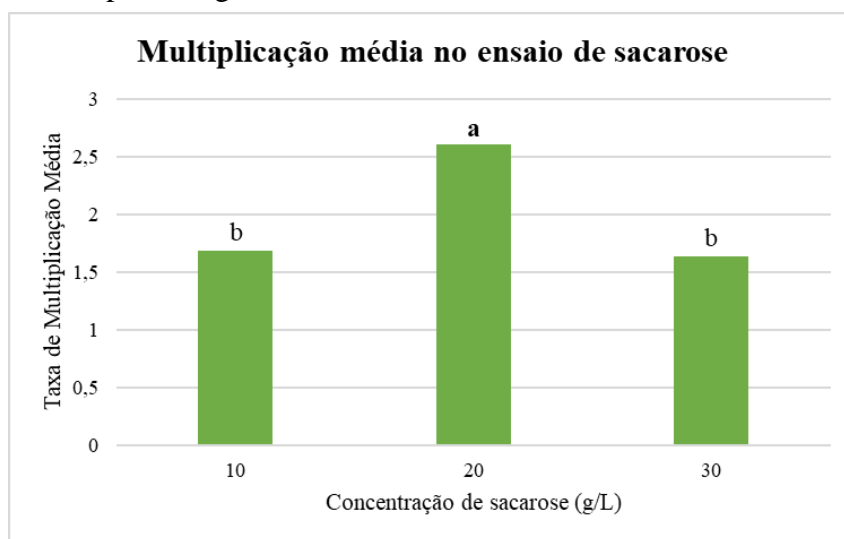


Figura 25: Taxa de multiplicação com diferentes concentrações de sacarose de rebentos de *C. lusitânica*.

Conforme se verifica nos resultados obtidos, a concentração de sacarose mais favorável para o alongamento dos rebentos e consequente taxa de multiplicação, foram as 20 g/L, sendo que apresentaram valores mais elevados e com maior nível de significância, em comparação com as restantes concentrações. Em média, os rebentos provenientes do meio de cultura com 20 g/L, multiplicaram para mais do que dois novos explantes, tendo valores de 2,6. As restantes duas concentrações, 10 g/L e 30 g/L não apresentaram diferenças significativas entre si, tendo valores de taxa de multiplicação muito próximos.

A qualidade dos rebentos e a taxa de sobrevivência não apresentaram diferenças significativas entre as 3 concentrações e têm valores aproximados entre si, o que significa que em termos de surgimento de rebentos necrosados ou vitrificados houve uma uniformidade nos testes, o que pode expressar que as diferentes concentrações de sacarose influenciam de forma semelhante nestes aspetos.

Relativamente aos ensaios de concentração de reguladores de crescimento, a **Figura 26** mostra os resultados obtidos nas diferentes concentrações testadas no ensaio. Para o tratamento estatístico dos dados, verificou-se a normalidade da taxa de multiplicação (**Anexo - Figura 11**) e do comprimento médio dos rebentos maiores (**Anexo - Figura 12**), que comprovou que não seguem uma distribuição normal. Assim, os restantes dados foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis (**Anexo - Figura 13, Anexo - Figura 14, Anexo - Figura 15 e Anexo - Figura 16**).

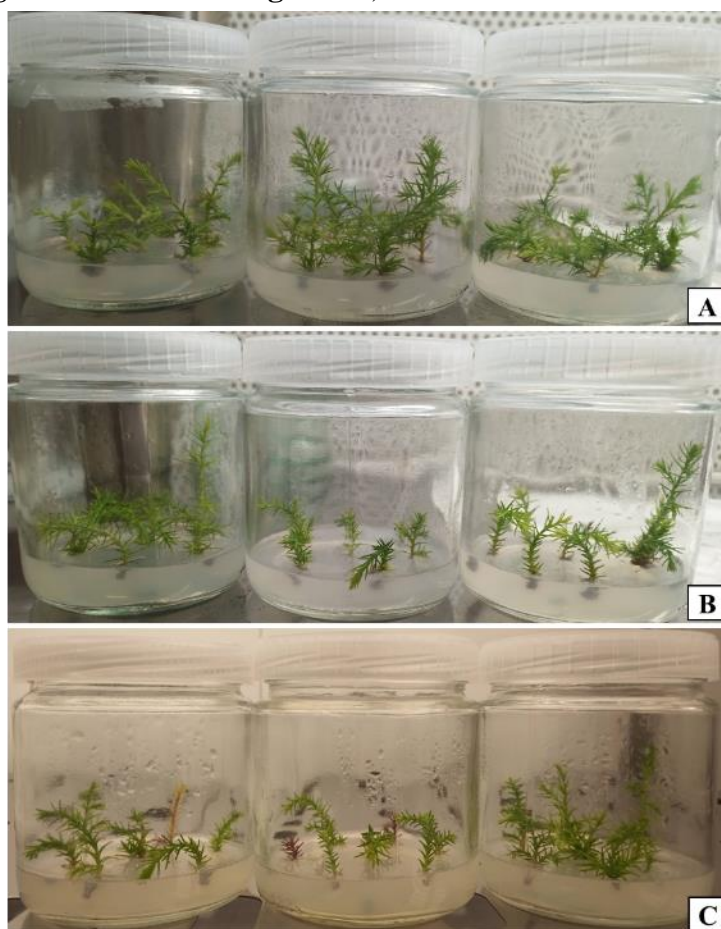


Figura 26: Rebentos obtidos no ensaio da concentração de reguladores de crescimento. Da esquerda para a direita: 0,5 mg/L, 1 mg/L e 2 mg/L. (A) Utilização do regulador de crescimento 2-iP. (B) Utilização do regulador de crescimento BAP. (C) Utilização do regulador de crescimento KIN.

De seguida, apresenta-se a **Figura 27**, com os dados relativamente à taxa de multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento, com as respetivas concentrações.

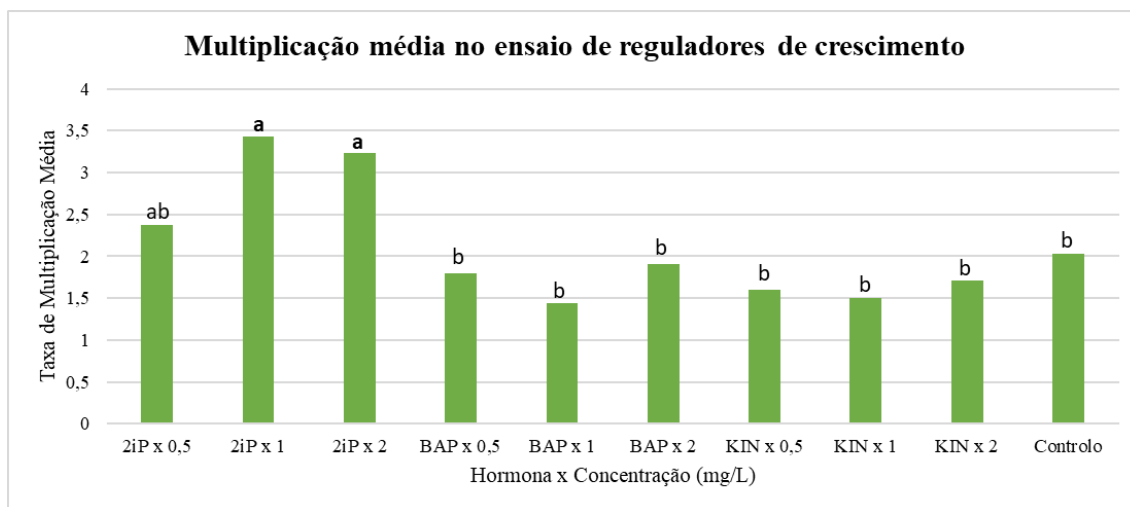


Figura 27: Taxa de multiplicação dos rebentos, no ensaio de multiplicação, com diferentes concentrações de reguladores de crescimento, de rebentos de *C. lusitanica*.

O **Anexo - Tabela 5**, mostra os resultados dos rebentos que tiveram como parâmetros de avaliação os mesmos utilizados nos testes de sacarose: taxa de multiplicação; qualidade dos rebentos qualificada de 1-2, em que 1 representou os rebentos necrosados e vitrificados e 2 os rebentos em bom estado fisiológico; comprimento do maior rebento, medido em centímetros; e a taxa de sobrevivência, em percentagem.

Os dados mostram que a taxa de multiplicação foi superior nos rebentos que estiveram em meio de cultura com 2iP, sendo que a concentração de 1 mg/L e 2 mg/L não apresentaram diferenças significativas entre si, nem entre a concentração de 0,5 mg/L, que por sua vez também não apresentou diferenças significativas entre os restantes reguladores de crescimento e devidas concentrações, assim como com o controlo. Os restantes reguladores de crescimento e respetivas concentrações, não apresentaram diferenças significativas. Assim, é de referir que o regulador de crescimento 2iP com a concentração de 1 mg/L apresentou o valor mais elevado, sendo que cada rebento multiplica em média superior a 3 explantes novos, em que obteve o valor de 3,43.

Quanto ao comprimento do maior rebento não se verificaram diferenças significativas para qualquer concentração de 2iP, nem para as concentrações de 0,5 mg/L e 2 mg/L de BAP, sendo que mais uma vez o melhor resultado foi obtido nos rebentos que estiveram em meio de cultura com 1 mg/L de 2iP, com um comprimento médio de 3,58 cm. De acordo com os dados de 0,5 mg/L e 2 mg/L de KIN, estes não apresentaram diferenças significativas para os melhores resultados já mencionados, nem para os restantes resultados.

Relativamente à qualidade dos rebentos e à taxa de sobrevivência não existiram diferenças significativas entre os reguladores de crescimento testados e as devidas concentrações, sendo que tiveram valores muito próximos em ambos os parâmetros de avaliação. Ainda assim, é de salientar que os rebentos que estiveram em meio de cultura

com a 2iP, independentemente da concentração, obtiveram uma taxa de sobrevivência de 100%.

Sobre um estudo realizado por Capuana et al. (1991), em que testaram 4 substâncias diferentes (BAP, KIN, 2iP e ZEA), em *C. sempervirens*, verificaram que para essa espécie, o regulador de crescimento 2iP, na concentração mais elevada, foi a que apresentou melhores resultados comparativamente com as restantes. Seguiram-se os reguladores de crescimento BAP e ZEA, sendo que os piores resultados foram nos rebentos que estiveram em KIN. Apesar de se tratarem de diferentes espécies de *Cupressus*, verificou-se uma semelhança com o presente estudo, uma vez que a ordem pela qual os resultados se apresentaram foi igual, com exceção da ZEA, que não foi utilizada neste trabalho.

À semelhança do estudo feito por Gupta & Durzan (1985), com *Pseudotsuga menziesii* e *Pinus lambertiana*, em que testaram diferentes concentrações de BAP e KIN, em dois meios de cultura diferentes (MS e WPM), obtiveram melhores resultados nos rebentos que estiveram em BAP, do que em KIN. Neste caso, verificou-se algo semelhante, quando se compara o comprimento do rebento maior em ambos reguladores de crescimento, sendo que os rebentos que estiveram em KIN apresentaram rebentos mais pequenos, fazendo assim com que a taxa de multiplicação também fosse mais reduzida.

3.2.2. Multiplicação em biorreatores de imersão temporária

Devido a falhas técnicas no sistema informático de controlo do programa de imersão dos biorreatores de imersão temporária, não foi possível obter dados fidedignos.

3.3. Ensaio de enraizamento e aclimatização

Alguns rebentos provenientes da população stock, foram utilizados para o ensaio do enraizamento *in vitro*. Como já mencionado no capítulo anterior, foram colocados explantes em meio de cultura DKW e foram testadas 3 concentrações diferentes de AIB.

Segue-se a **Figura 28**, que mostra a presença de uma raiz num rebento, no ensaio de enraizamento *in vitro*.



Figura 28: Rebroto com uma raiz, na concentração de 3 mg/L de AIB.

A **Figura 29**, mostra a percentagem de rebentos enraizados *in vitro*, para as diferentes concentrações de AIB.

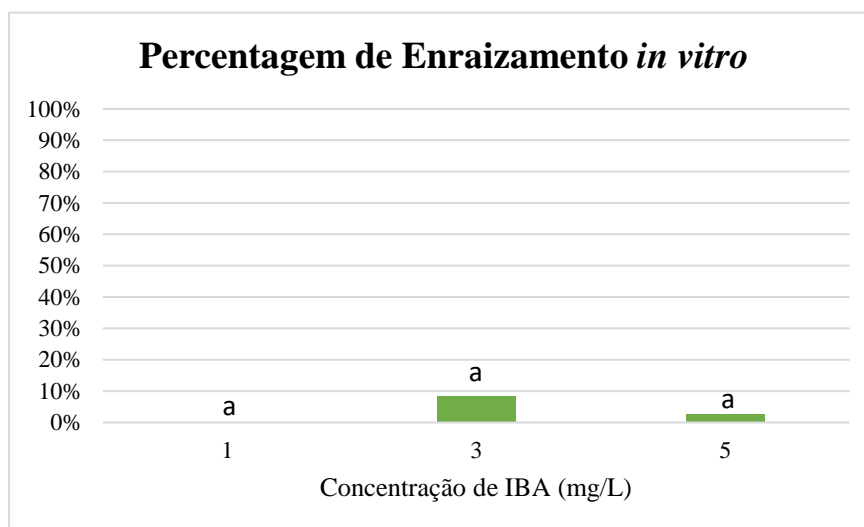


Figura 29: Percentagem de enraizamento *in vitro* de rebentos de *C. lusitanica*.

Os resultados obtidos relativamente à taxa de enraizamento e à presença de *callus*, são os que se apresentam no **Anexo - Tabela 6**.

Os resultados mostram que os rebentos não apresentaram capacidade rizogénica *in vitro*, nas condições em que se estabeleceram os ensaios. Os rebentos sujeitos a uma concentração de 1 mg/L de AIB não apresentaram raízes. Dos rebentos que estiveram em meio de cultura com 3 mg/L de concentração de AIB, apenas cerca de 8,6% apresentaram raízes e dos que estiveram em meio com 5 mg/L de AIB, a capacidade rizogénica nos rebentos estabelecidos no ensaio, foi inferior a 3%. Assim, conclui-se que a metodologia utilizada neste ensaio não foi apropriada, pois a taxa de enraizamento em todas as concentrações não apresentou percentagens consideráveis, sendo que foram todas inferiores a 10%. Não se deve também deixar de referir a possibilidade desta espécie ser recalcitrante aos tratamentos indutores nas condições testadas.

Segundo os autores Khamushi et al. (2019), num estudo que realizou com rebentos de *Cupressus sempervirens*, em que se avaliou a capacidade rizogénica, recorrendo à utilização do regulador de crescimento AIB, mostrou que os rebentos não tiveram capacidade de criar raízes *in vitro*. O mesmo se verificou no presente estudo, realizado com os rebentos de *C. lusitanica*. No entanto, no estudo realizado por esses autores, 10% dos rebentos de *C. sempervirens* apresentaram raízes, quando se utilizou como meio de cultura Woody Plant Medium (WPM) (McCown & Lloyd, 1981), com KIN e AIB, no final de 3 meses de cultura.

A presença de *callus* em 100% dos rebentos, em todas as concentrações de AIB, pode ser justificada pela utilização da auxina, que é um regulador de crescimento que pode promover a indução de *callus*. Segundo Canhoto (2010), as hormonas e reguladores de crescimento que normalmente se utilizam para fazer enraizamento *in vitro* são ANA e AIB, no entanto, quando as plantas estão expostas a concentrações muito elevadas destas auxinas ou durante muito tempo, existe a formação de *callus* e posteriormente podem aparecer raízes, porém, estas raízes muitas vezes apresentam deficiências fisiológicas, em

particular ao nível da conexão vascular com os tecidos condutores do caule, inviabilizando, muitas vezes, a sobrevivência das microplantas durante a fase de aclimatização.

No caso em estudo, a baixa percentagem de raízes, em que houve presença de *callus* em 100% das plântulas, significa que o enraizamento *in vitro* fica impossibilitado de se realizar com a utilização deste regulador de crescimento. Contudo, num estudo futuro, poder-se-á estudar a utilização de ANA.

No caso de plantas herbáceas, a presente metodologia, em que se passou do meio de cultura de multiplicação para um meio com adição de reguladores de crescimento de enraizamento, poderia ter resultado (Canhoto, 2010). Neste caso, tratando-se de uma planta lenhosa, os resultados mostraram que a metodologia foi inviável. Possivelmente, teria sido necessário fazer um ciclo de repicagem em meio DKW, sem adição de reguladores de crescimento, antes de se estabelecer o ensaio de enraizamento. Por outro lado, também se poderia adicionar carvão ativado com o intuito de promover a adsorção do regulador de crescimento utilizado anteriormente (Costa et al., 2006). Além disso, o carvão ativado em algumas espécies ajuda na capacidade rizogénica, auxiliando no aparecimento de raízes, como por exemplo no estudo realizado por Rathore et al. (2004), com plantas lenhosas.

Em relação ao ensaio de enraizamento *ex vitro*, tiraram-se os dados após 4 semanas de se terem submetido as plântulas a dois tipos de substratos diferentes, – jiffys (**Figura 30**) e turfa com perlite – com o gel de enraizamento Clonex e, efetuou-se também, a testagem da presença de agulhas ou a ausência das mesmas.



Figura 30: Presença de raízes nas plântulas testadas com jiffys. (A) Plântula em que se removeram as agulhas da base. (B) Plântula em que não se removeram agulhas da base.

Fez-se a análise estatística deste tratamento de enraizamento, verificando e confirmando que o comprimento médio da raiz maior segue uma distribuição normal e, de seguida utilizou-se o teste de Tukey (**Anexo - Figura 19**). Os restantes parâmetros de avaliação, por serem não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (**Anexo - Figura 18 e Anexo - Figura 20**).

Os resultados obtidos quanto à taxa de enraizamento, realizado *ex vitro*, apresentam-se na **Figura 31**.

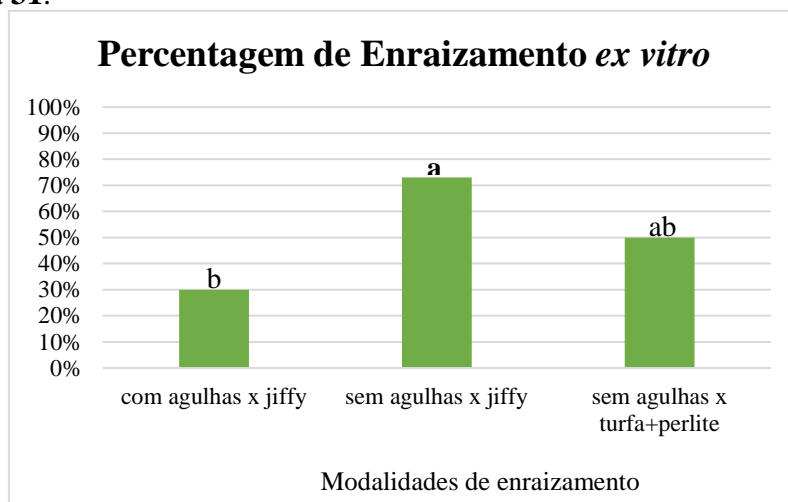


Figura 31: Percentagem de enraizamento *ex vitro* de rebentos de *C. lusitanica*.

Os resultados dos parâmetros da taxa de enraizamento, comprimento da raiz maior para cada plântula enraizada e a qualidade da plântula classificada de 1-3, em que 1 a plântula estava necrosada, 2 a plântula estava viva, mas não enraizada e 3 a plântula viva com raízes, estão representados no **Anexo - Tabela 7**.

A primeira análise a fazer é o efeito positivo da utilização desta substância comercial para induzir raízes nas microplantas de *C. lusitanica*, contrariamente ao que sucedeu com a utilização de auxinas puras em condições *in vitro*.

De acordo com os resultados obtidos, verificaram-se diferenças significativas na taxa de enraizamento, sendo que o melhor resultado foram nas plântulas em que se removeram as agulhas e que permaneceram em jiffys, apresentando uma percentagem de cerca de 73% de plântulas enraizadas. Seguiram-se as plântulas em que também se retiraram as agulhas da base e que foram colocadas na mistura de substrato de turfa com perlite, em que 50% das plântulas apresentaram raízes. No entanto, estas não apresentaram diferenças significativas entre o melhor resultado mencionado anteriormente, nem no pior resultado, as plântulas com agulhas na base colocadas em jiffys. Por último, as plântulas que apresentaram uma taxa de enraizamento mais reduzida, com 30%, foram as que não se retiraram as agulhas da base e que estiveram em jiffys. Estes resultados mostram que a remoção das agulhas na base das plântulas, apresentam uma maior superfície de contacto com o gel de enraizamento e que, possivelmente, aumenta o estímulo para o desenvolvimento de raízes.

Relativamente ao comprimento da raiz maior, não houve diferenças significativas entre as condições de enraizamento testadas. No entanto, pode-se verificar que as raízes

das plântulas sem agulhas que permaneceram em turfa com perlite foram as que apresentaram um comprimento ligeiramente maior, em comparação com as restantes, tendo em média 0,85 cm.

Quanto à qualidade da plântula, também não existiram diferenças significativas entre as condições de enraizamento testadas, o que significa que nesse sentido o número de plântulas necrosadas foi semelhante.

Da bibliografia consultada não foram encontrados resultados de experimentações de enraizamento *ex vitro* de rebentos, pelo que os resultados obtidos se podem considerar como pioneiros e, não tendo, assim, referências comparativas. De referir, contudo, de acordo com um estudo realizado por Pericleous & Eliades (2020), em que utilizaram estacas de *C. sempervirens*, para fazer macropropagação, através da técnica de estacaria, em que utilizaram como regulador de crescimento de enraizamento o AIB e como substrato mistura de turfa com perlite, verificaram que a qualidade das raízes era favorecida pelo uso desse substrato, uma vez que garantia uma boa porosidade e, conseqüentemente, um bom arejamento, fazendo com que houvesse maior disponibilidade de oxigénio, promovendo o desenvolvimento de raízes. Isto pode justificar no presente estudo, o facto das raízes que estiveram em turfa com perlite apresentarem raízes maiores, quando comparadas com a utilização de jiffys, apesar da percentagem de enraizamento ter sido mais reduzida.

Relativamente aos substratos utilizados nos ensaios de enraizamento *ex vitro*, em estudos futuros poder-se-á optar pela testagem de outros diferentes, tais como: vermiculite; vermiculite com perlite; diferentes granulometrias de perlite, com o objetivo de verificar se esses substratos favoreciam de alguma forma na indução das raízes, bem como a sua qualidade (Fernandes, et al., 2021).

4. Conclusão

O presente estudo pretendeu averiguar de que forma a espécie *C. lusitanica* se adapta às várias etapas da micropropagação, nomeadamente a procedimentos para o estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização.

Na fase de estabelecimento, em se que utilizaram dois meios de cultura diferentes, tempos de desinfeção diferentes e concentrações de NaClO diferentes, verificou-se que os explantes que estiveram em menor tempo de desinfeção (10 minutos) e com a concentração de NaClO mais elevada (1:3), foram os que não apresentaram infeções, assim como uma percentagem menor de necroses e mostrou-se mais eficiente no parâmetro do comprimento dos maiores rebentos, tendo estado em meio de cultura DKW. Por outro lado, a taxa de multiplicação mostrou-se mais elevada nos explantes que estiveram em 10 minutos de desinfeção, com a concentração de 1:4 de NaClO, em meio de cultura MS.

Realizaram-se dois ensaios na fase de multiplicação, o ensaio de concentração de sacarose e o ensaio de diferentes concentrações de 3 citocininas. No ensaio de multiplicação em meio semissólido, em que se testaram diferentes concentrações de sacarose, pode concluir-se que a espécie em estudo, adapta-se melhor à concentração de 20 g/L, quando comparada com as concentrações de 10 g/L e 30 g/L, uma vez que teve a capacidade de gerar maior número de rebentos, assim como um comprimento maior. No ensaio de multiplicação em meio semissólido, mas no teste de concentração de reguladores de crescimento verificou-se que a *C. lusitanica* propaga-se melhor *in vitro*, quando utilizado o regulador de crescimento 2iP, com a concentração de 1mg/L, pois obteve os melhores resultados tanto na taxa de multiplicação, como no comprimento do maior rebento.

Para a fase de enraizamento, foram realizados dois ensaios, um *in vitro* e o outro *ex vitro*. No ensaio de enraizamento *in vitro*, os resultados obtidos não foram suscetíveis de permitir definir uma metodologia eficiente para a rizogénese destes rebentos. Um dos motivos poderá ter sido a habituação dos rebentos às citocininas da fase de multiplicação que inibem a ação indutora rizogénica da auxina. Deste modo, no futuro poderá testar-se um ciclo de repicagem para o meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento, em que até pode ser utilizado carvão ativado, de forma a adsorver os reguladores de crescimento anteriores, auxiliando o enraizamento *in vitro*. Também se podem fazer ensaios com diferentes concentrações de ANA e verificar a capacidade de indução de raízes com essa substância. Quanto ao ensaio de enraizamento *ex vitro*, com a utilização da substância comercial Clonex, verificou-se que as plântulas de *C. lusitanica* têm maior capacidade rizogénica quando se removem as agulhas da base e se colocam em jiffys. Em estudos futuros, poder-se-á testar outras alternativas de substrato.

5. Bibliografia

- Borsoi, N. L. (2009). *Desinfecção de explantes e cultivo in vitro de Piretro da Dalmácia (Chrysanthemum cinerariaefolium Vis. cv. Vacaria)*. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Obtido em setembro de 2022
- Caetano, F., & Ramos, P. (fevereiro de 2009). Cancro cortical - Uma grave doença dos Ciprestes. *O mundo das plantas e jardinagem*, 28-29.
- Canhoto, J. (2009). Biotecnologia Vegetal - Plantas in vitro. (J. Mesquita, Ed.) *Rua Larga*(24), 33-36. Obtido em julho de 2022
- Canhoto, J. (2010). *Biotecnologia Vegetal da Clonagem de plantas à Transformação Genética*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra. Obtido em julho de 2022
- Capuana, M., Giannini, R., Lambardi, M., Leva, A., & Nicese, F. (1991). Micropropagation of mature plants of Cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Acta Horticulturae*, 289, 91-92. doi:10.17660/ActaHortic.1991.289.12
- Carapeto, A., Francisco, A., Pereira, P., & Porto, M. (2020). *Lista Vermelha da Flora Vascular de Portugal Continental*. Sociedade Portuguesa de Botânica, Associação Portuguesa de Ciência da Vegetação – PHYTOS e Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (coord.), Coleção «Botânica em Português», Volume 7. Lisboa: Imprensa Nacional.
- Carvalho, J. M., Pimentel, N. W., Aires, P. S., & Pimentel, L. W. (2006). Considerações Gerais Sobre Organogênese. *Embrapa*.
- Chaves, E., & Fonseca, W. (1991). *Ciprés (Cupressus lusitanica)*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba: Proyecto Cultivo de Árboles de Uso Múltiple, (MADELEÑA). Obtido de especies de árbol de uso múltiple en América Central.
- Correia, A. V., & Oliveira, Â. C. (2002). *Principais Espécies Florestais com interesse para Portugal - zonas de influência mediterrânica*. Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Engenharia Florestal. Lisboa: Direcção-Geral das Florestas.
- Costa, F. H., Pereira, J. E., Pereira, M. A., & Oliveira, J. P. (agosto de 2006). Efeito da interação entre carvão ativado e N6-Benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. grand naine (AAA). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(2), 280-283. Obtido em setembro de 2022, de <https://doi.org/10.1590/S0100-29452006000200028>
- Costa, J. C., Vasconcelos, M. T., Cunha, A. R., Forte, P., Capelo, J., & Neto, C. S. (2016). *Estado atual da flora do Convento dos Capuchos e vegetação climácica da envolvente*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia.

- Debergh, P. C., & Maene, L. J. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*.
- Direcção de Serviços de Valorização do Património Florestal. (2003). *Princípios de Boas Práticas Florestais*. Lisboa: Direcção-Geral das Florestas.
- Duncan, D. B. (março de 1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, *11*(1), 1-42. Obtido em setembro de 2022, de <https://doi.org/10.2307/3001478>
- Dutra, L. F., Wendling, I., & Brondani, G. E. (2010). A Micropropagação de Eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*(58), 49-59. Obtido em agosto de 2022, de <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/5>
- EcoCenter.pt. (s.d.). Obtido em agosto de 2022, de Jiffys para germinação e clones: <https://loja.ecocenter.pt/product/jiffys-para-germinac-o-e-clones>
- Expandindústria - Estudos Projectos e Gestão de Empresas, SA. (2015). *Estudo de Impacte Ambiental - Projeto de Reativação das Minas de Ferro de Moncorvo - Relatório Síntese - Volume II*. Torre de Moncorvo. Obtido de <https://siaia.apambiente.pt/AIADOC/AIA2828/eia%20abr%202015%20volume%20ii%20relat%C3%B3rio%20s%C3%ADntese2015826144218.pdf>
- Farjon, A. (1993). Nomenclature of the Mexican Cypress or "Cedar of Goa", *Cupressus lusitanica* Mill. (Cupressaceae). *Taxon*, *42*(1), 81-84. Obtido em 2022, de <https://doi.org/10.2307/1223306>
- Farjon, A. (2013). *The IUCN Red List of Threatened Species in 2013*. Obtido de Mexican Cypress - *Cupressus lusitanica*: <https://www.iucnredlist.org/species/42221/2962663>
- Fernandes, A. R., Silva, C. S., Ribeiro, D., Barbosa, J. N., Marques, P., & Carneiro, S. (2021). *Manual técnico para fornecedores de materiais florestais de reprodução - prevenção do cancro-resinoso-do-pinheiro (fusarium circinatum)*. Ficha técnica, Go +PrevCRP, Lisboa.
- Figueiredo, J. M. (2019). *Sistemas de propagação in vitro e análise de compostos da Salicornia spp. utilizando técnicas cromatográficas*. Universidade da Beira Interior, Ciências. Obtido em setembro de 2022
- Floresta Comum. (2014). *A importância ambiental e ecológica*. Obtido em agosto de 2022, de Floresta Autóctone: <https://www.florestacomum.org/floresta-autoctone/a-importancia-ambiental-e-ecologica/>
- Floresta Comum. (2014). *História da Floresta Portuguesa*. Obtido em agosto de 2022, de Floresta Autóctone: <https://www.florestacomum.org/floresta-autoctone/historia-da-floresta-portuguesa/>
- florestas.pt. (28 de outubro de 2020). *À descoberta da Serra da Lousã*. Obtido de florestas.pt: <https://florestas.pt/descobrir/a-descoberta-da-serra-da-lousa/>
- florestas.pt. (2021). *Solo, a "pele" do planeta que a floresta protege*. Obtido em agosto de 2022, de Conhecer: <https://florestas.pt/conhecer/solo-a-pele-do-planeta-que-a-floresta-protege/>

- florestas.pt. (2022). *Floresta portuguesa ocupa mais de um terço do país*. Obtido em agosto de 2022, de Conhecer: <https://florestas.pt/conhecer/floresta-portuguesa-ocupa-mais-de-um-terco-do-pais/>
- FSC. (2020). *Tipos de Certificado*. Obtido de Forest Stewardship Council: <https://pt.fsc.org/pt-pt/tipos-de-certificado/projeto>
- Fundação Mata do Bussaco. (2017). *Flora*. Obtido de Património Natural: <https://fmb.pt/a-mata/sobre-a-mata/patrimonio-natural/flora/>
- George, E. F. (2008). Plant Tissue Culture Procedure - Background. Em E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. D. Klerk, *Plant Propagation by Tissue Culture* (Vol. 1, pp. 1-28). Springer. doi:<https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Gomes, M. F. (2011). *Strategies for the improvement of Arbutus unedo L. (strawberry tree): in vitro propagation, mycorrhization and diversity analysis*. (Tese de Doutoramento), Universidade de Coimbra, Departamento de Ciências da Vida. Obtido em julho de 2022, de <http://hdl.handle.net/10316/17964>
- GroHo. (s.d.). *Perlite vs vermiculite: qual é a diferença?* Obtido em julho de 2022, de GroHo: <https://www.groho.pt/post/perlite-vs-vermiculite-qual-e-a-diferenca>
- Guiomar, N., Palheiro, P., Loureiro, C., Carvalho, C. R., Salgueiro, A., Tomé, J., & Fernandes, J. P. (2011). MANUAL DE BOAS PRÁTICAS DE GESTÃO DOS ESPAÇOS FLORESTAIS NA BACIA DRENANTE DA ALBUFEIRA DE CASTELO DO BODE. 5. Obtido em outubro de 2022
- Gupta, P. K., & Durzan, D. J. (1985). Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*, 4, 177-179. doi:10.1007/bf00269282
- Husqvarna. (s.d.). *Turfa, um dos materiais mais usados para cultivar plantas*. Obtido em julho de 2022, de Husqvarna: <https://lojahusqvarna.com/blog/dicas-jardinagem/turfa/>
- ICNF. (2019). *IFN6 – Principais resultados – relatório sumário [pdf]*. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, Lisboa. Obtido em agosto de 2022
- ICNF. (2022). *Espécies arbóreas florestais utilizáveis em Portugal*. Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. Obtido de <https://www.icnf.pt/florestas/plantasesementes/especiesarboreas>
- inovep. (2019). Obtido de Plantas aromáticas e medicinais: <https://inovep.pt/plantas-aromaticas-medicinais/index.php/projeto/plantas-e-suas-caracteristicas/>
- Khamushi, M., Dehestani-Ardakani, M., Zarei, A., & Aliabad, K. K. (2019). An efficient protocol for micropropagation of old cypress of Abarkuh (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* [Mill.]) under in vitro condition. *Journal of Plant Biotechnology*, 597-601. doi:<https://doi.org/10.1007/s11240-019-01645-z>
- Kratz, D., & Wendling, I. (2007). Indução de brotações em cepas de *Cupressus lusitanica* Mill. de diferentes idades. *Embrapa Florestas*, 22. Obtido de

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/313957/inducacao-de-brotacoes-em-cepas-de-cupressus-lusitanica-mill-de-diferentes-idades>

- Martins, D. C. (2015). *Análise do efeito de vários tipos de compostos na micropropagação de medronheiro (Arbutus unedo L.)*. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Departamento de Ciências da Vida. Obtido em agosto de 2022, de <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/32151/1/An%C3%A1lise%20do%20efeito%20de%20v%C3%A1rios%20tipos%20de%20compostos%20na%20micropropaga%C3%A7%C3%A3o%20de%20medronheiro%20%28Arbutus%20unedo%20L.%29.pdf>
- McCown, B., & Lloyd, G. (1981). Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. *HortScience*, 16, 453.
- Melo, N. F. (2002). *Introdução aos os hormônios e reguladores de crescimento vegetal*. Embrapa Semiárido. Obtido em junho de 2022
- Melo, N., Sarreira, P., Telo, C., & Torres, S. (2019). *Cupressus lusitanica*. (P. Plant@Eselx, Editor) Obtido de Escola Superior de Educação de Lisboa: <https://www.eselx.ipl.pt/plantas-eselx/20>
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*.
- Okino, E. Y., Santana, M. A., Alves, M. V., Melo, J. E., Coradin, V. T., Souza, M. R., . . . Sousa, M. E. (2010). *Technological Characterization of Cupressus spp. Wood*. Serviço Florestal Brasileiro - SFB, Laboratório de Produtos Florestais - LPF. Floram - Floresta e Ambiente.
- Pereira, F. B., & Peres, F. (2016). Nutrição e enraizamento adventício de plantas lenhosas. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 36(87), 319-326.
- Pereira, J. C., & Higa, R. C. (2003). *Propriedades da Madeira de Cupressus lusitanica Mill.* Comunicado Técnico, Colombo (Brasil). Obtido de https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/35567/1/Com_tec107.pdf
- Pereira, R. A. (2014). *Efeito do pH e da fonte de azoto na cultura in vitro de medronheiro (Arbutus unedo L.)*. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Departamento de Ciências da Vida. Obtido em agosto de 2022, de https://www.uc.pt/uid/medronheiro/Publicacoes/Tese_Mestrado_Rui_Pereira
- Pericleous, C., & Eliades, N.-G. H. (2020). An approach for the mass propagation of *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae), for quality propagule production. *Research Ideas and Outcomes*. doi:10.3897/rio.6.e52947
- Planeta Huerto*. (19 de dezembro de 2019). Obtido em agosto de 2022, de O que é o musgo Sphagnum e como usá-lo?: https://www.planetahuerto.pt/revista/o-que-e-o-musgo-sphagnum-e-como-usa-lo_00665

- Presidência do Conselho de Ministros. (2015). *Resolução do Conselho de Ministros n.º 6-B/2015*. Diário da República, Lisboa. Obtido em setembro de 2022
- Presidência do Conselho de Ministros. (2019). *Decreto-Lei n.º 92/2019 de 10 de julho*. Diário da República, 1ª série - n.º 130, Lisboa. Obtido de <https://files.dre.pt/1s/2019/07/13000/0342803442.pdf>
- Rathore, J., Rathore, V., Shekhawat, N., Singh, R., Liler, G., Phulwaria, M., & Dagla, H. (2004). Micropropagation of Woody Plants. Em P. Srivastava, A. Narula, & S. Srivastava (Edits.), *Plant Biotechnology and Molecular Markers* (pp. 195-205). Obtido em setembro de 2022
- Scheid, G. N., Arakaki, A. H., Chimilovsk, J. S., Portella, A. C., Spier, M. R., Woiciechowsk, A. L., . . . Soccol, C. R. (2009). Utilization of the Biorreactor of Imersion by Bubbles at the Micropropagation of Ananas comosus L. Merrill. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 37-43.
- SERRALVES. (2022). *Flora no parque*. Obtido de Cupressus lusitanica Mill.: <http://sig.serralves.pt/pt/flora/detalhe.php?id=29>
- Shimizu, J. Y., Júnior, J. E., & Ribatski, G. (1995). *Cipreste para madeira: alto incremento volumétrico com material genético apropriado*. Boletim de Pesquisa Florestal, Embrapa Florestas, Colombo.
- Sidhu, Y. (2011). In vitro micropropagation of medicinal plants by tissue culture. *The Plymouth Student Scientist*, 4(1), 432-449. Obtido em junho de 2022, de <https://pearl.plymouth.ac.uk/>
- Teke, G. N., Elisée, K. N., & Roger, K. J. (2013). Chemical composition, antimicrobial properties and toxicity evaluation of the essential oil of Cupressus lusitanica Mill. leaves from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Obtido de <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/130>
- UTAD. (2004). *Cupressus lusitanica Mill.* Jardim Botânico da UTAD. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Obtido em julho de 2022, de https://jb.utad.pt/especie/Cupressus_lusitanica
- Vasconcelos, T., Soares, A. L., Cunha, A. R., Forte, P., & Arsénio, P. (2018). *Cupressus lusitanica Mill.* Universidade de Lisboa, Parque Botânico da Tapada da Ajuda. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia. Obtido de http://www.isa.ulisboa.pt/files/pbta/img/colecao-botanica/cupressus-lusitanica/14_Cupressus_lusitanica_2.pdf
- Yildiz, M. (2012). The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. Em *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (pp. 63-90). IntechOpen. doi:10.5772/52760
- Zar, H. J. (1996). *Biostatistical Analysis*, 3rd edn. Obtido em setembro de 2022
- Zavattieri, A. (2002). *Biotecnologia Vegetal I*. Universidade de Évora. Obtido em agosto de 2022

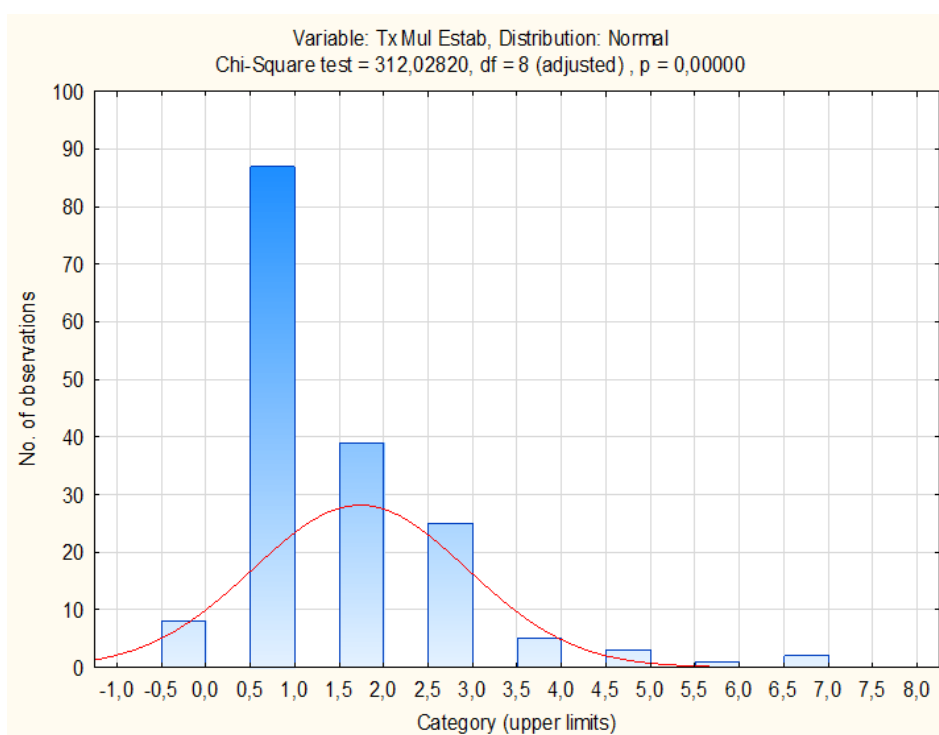
Zavattieri, A. (2002). *Métodos e Técnicas Laboratoriais em Biologia*. Universidade de Évora, Biotecnologia Vegetal. Obtido em setembro de 2022

Anexos

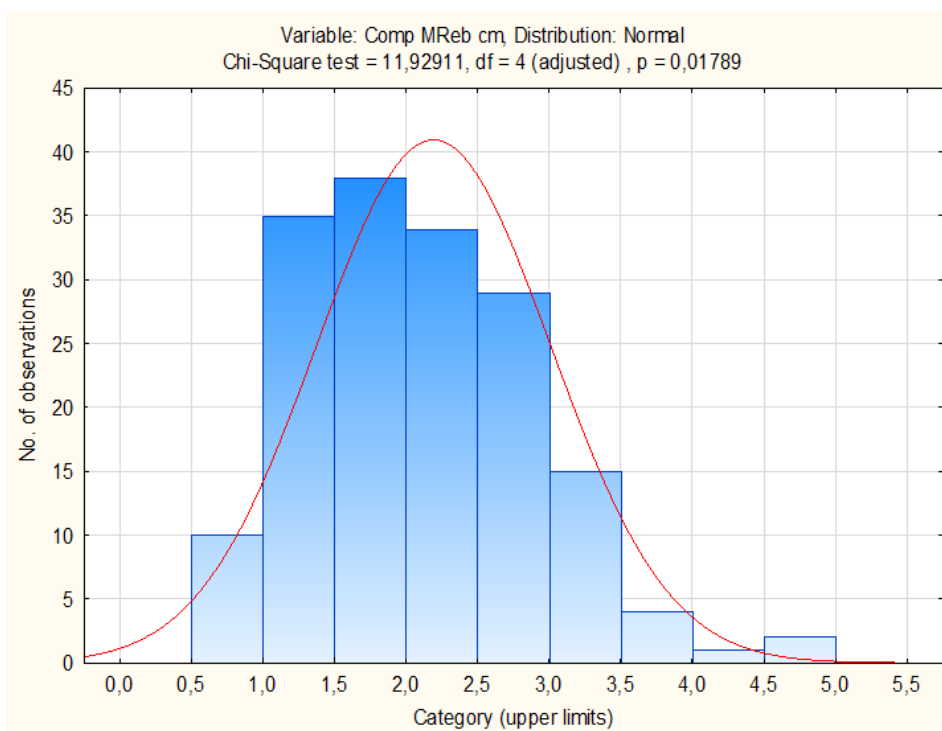
Anexo - Tabela 1: Dados obtidos referentes ao estabelecimento de *C. lusitanica*.

Tempo de desinfecção	Concentração de NaClO*	Meio de cultura	N	Infeção (%)	Necrose (%)	Sobrevivência (%)
10 min	1:4	MS	72	13,9%	61,1%	25%
	1:3	DKW	80	0%	10%	90%
15 min	1:4	MS	72	2,8%	33,3%	63,9%
30 min	1:4	DKW	70	5,7%	35,7%	58,6%

Nota: N refere-se ao número de explantes; concentração de NaClO v:v (NaClO : água)



Anexo - Figura 1: Representação gráfica que comprova que a taxa de multiplicação na fase do estabelecimento não segue uma distribuição normal.



Anexo - Figura 2: Representação gráfica que comprova que o comprimento médio dos maiores rebentos, na fase do estabelecimento não segue uma distribuição normal.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Tx Mul Estab (Estabelecimento.st Independent (grouping) variable: Int Meio x Temp x Conc Kruskal-Wallis test: H (3, N= 170) =12,73478 p =,0052				
Depend.: Tx Mul Estab	MS x 10 x 1:4 R:115,14	DKW x 10 x 1:3 R:75,451	MS x 15 x 1:4 R:93,549	DKW x 30 x 1:4 R:81,910
MS x 10 x 1:4		0,013286	0,724828	0,106944
DKW x 10 x 1:3	0,013286		0,361197	1,000000
MS x 15 x 1:4	0,724828	0,361197		1,000000
DKW x 30 x 1:4	0,106944	1,000000	1,000000	

Anexo - Figura 3: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da taxa de multiplicação, na fase do estabelecimento.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Qualid Reb. (Estabelecimento.sta)				
Independent (grouping) variable: Int Meio x Temp x Conc				
Kruskal-Wallis test: H (3, N= 177) =7,533868 p =,0567				
Depend.: Qualid Reb.	MS x 10 x 1:4 R:91,333	DKW x 10 x 1:3 R:80,271	MS x 15 x 1:4 R:91,761	DKW x 30 x 1:4 R:100,21
MS x 10 x 1:4		1,000000	1,000000	1,000000
DKW x 10 x 1:3	1,000000		1,000000	0,280430
MS x 15 x 1:4	1,000000	1,000000		1,000000
DKW x 30 x 1:4	1,000000	0,280430	1,000000	

Anexo - Figura 4: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da qualidade dos rebentos, na fase do estabelecimento.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Comp MReb cm (Estabelecimento.sta)				
Independent (grouping) variable: Int Meio x Temp x Conc				
Kruskal-Wallis test: H (3, N= 168) =37,68558 p =,0000				
Depend.: Comp MReb cm	MS x 10 x 1:4 R:33,833	DKW x 10 x 1:3 R:102,74	MS x 15 x 1:4 R:92,893	DKW x 30 x 1:4 R:63,569
MS x 10 x 1:4		0,000000	0,000098	0,205195
DKW x 10 x 1:3	0,000000		1,000000	0,000479
MS x 15 x 1:4	0,000098	1,000000		0,047696
DKW x 30 x 1:4	0,205195	0,000479	0,047696	

Anexo - Figura 5: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados do comprimento médio dos rebentos maiores, na fase do estabelecimento.

Anexo - Tabela 2: Resultados obtidos através dos dados retirados da fase do estabelecimento, em função da interação do meio de cultura, com o tempo de desinfecção, com a concentração do NaClO.

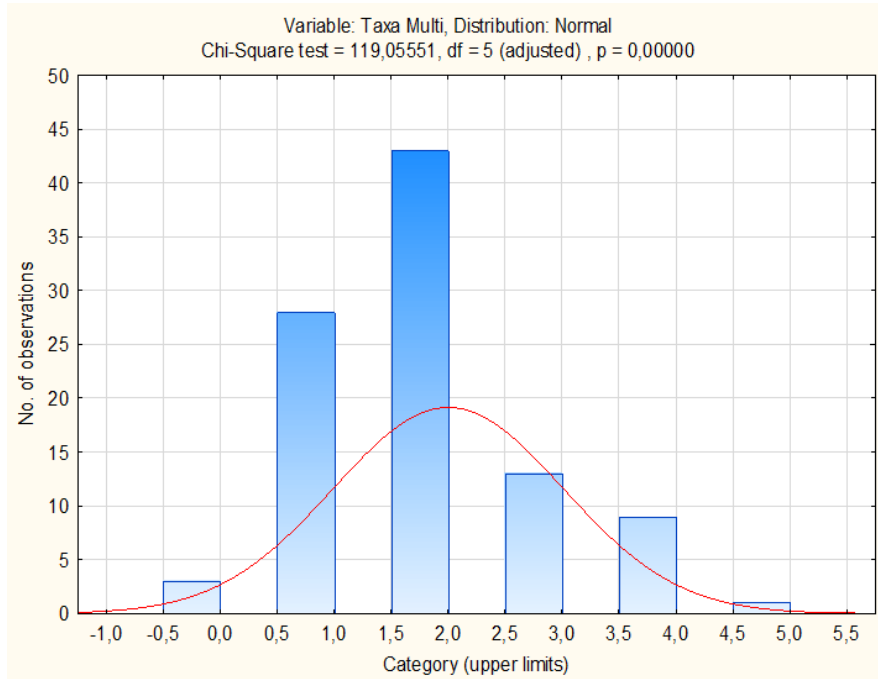
Interação entre o Meio de cultura x Tempo x Concentração	Taxa de Multiplicação do Estabelecimento		Qualidade dos Rebentos (1-2)		Comprimento do Maior Rebento (cm)	Tx Mult. Estab. vs Qualidade do Rebento	
	N	Média ± SE	N	Média ± SE	Média ± SE	N	Média ± SE
DKW x 10 x 1:3	72	1,42 ± 0,09 ^b	72	1,65 ± 0,06 ^a	2,50 ± 0,10^a	47	1,62 ± 0,12
DKW x 30 x 1:4	39	1,54 ± 0,14 ^{ab}	41	1,88 ± 0,05 ^a	1,84 ± 0,08 ^b	36	1,67 ± 0,13
MS x 10 x 1:4	18	2,78 ± 0,43^a	18	1,78 ± 0,10 ^a	1,39 ± 0,15 ^b	14	2,36 ± 0,41
MS x 15 x 1:4	41	2,02 ± 0,23 ^{ab}	46	1,78 ± 0,06 ^a	2,30 ± 0,12^a	35	2,17 ± 0,25

Nota: Os valores representam a média ± erro-padrão; foi realizada uma análise qualitativa para o parâmetro da Qualidade dos Rebentos; letras diferentes mostram diferenças significativas para o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

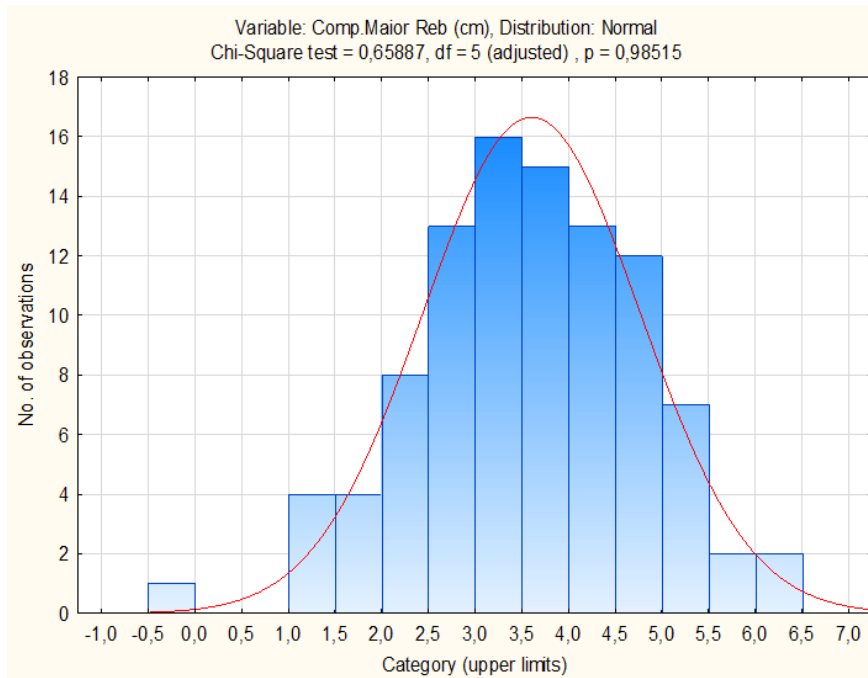
Anexo - Tabela 3: Resultados obtidos através dos dados retirados da fase do estabelecimento, em função do meio de cultura.

Meio de cultura	Taxa de Multiplicação do Estabelecimento		Qualidade dos Rebentos (1-2)		Comprimento do Maior Rebento (cm)	Tx Mult. Estab. vs Qualidade do Rebento		Taxa de vitrificação
	N	Média ± SE	N	Média ± SE	Média ± SE	N	Média ± SE	
DKW	111	1,46 ± 0,08	113	1,73 ± 0,04	2,28 ± 0,08	83	1,64 ± 0,09	25,23
MS	59	2,25 ± 0,21	64	1,78 ± 0,05	2,03 ± 0,11	49	2,22 ± 0,21	16,95

Nota: Os valores representam a média ± erro-padrão; foi realizada uma análise qualitativa para o parâmetro da Qualidade dos Rebentos.



Anexo - Figura 6: Representação gráfica que comprova que a taxa de multiplicação na fase da multiplicação, no ensaio da sacarose, não segue uma distribuição normal.



Anexo - Figura 7: Representação gráfica que comprova que o comprimento médio dos rebentos maiores, na fase da multiplicação, no ensaio da sacarose, segue uma distribuição normal.

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Reb Qualidade (Mult Sacarose.sta)		
		Independent (grouping) variable: Concentração sacarose		
		Kruskal-Wallis test: H (2, N= 102) =6,973810 p =,0306		
Depend.:		10 g/l	20 g/l	30 g/l
Reb Qualidade		R:54,500	R:53,043	R:47,214
10 g/l			1,000000	0,942185
20 g/l		1,000000		1,000000
30 g/l		0,942185	1,000000	

Anexo - Figura 8: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da qualidade dos rebentos, na fase da multiplicação, no ensaio da sacarose.

Tukey HSD test; variable compM (Spreadsheet1)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 1,0032, df = 94,000				
Cell No.	Treatments	{1}	{2}	{3}
1	1		0,000106	0,254933
2	2	0,000106		0,000440
3	3	0,254933	0,000440	

Anexo - Figura 9: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados do comprimento médio dos rebentos maiores, na fase da multiplicação, no ensaio da sacarose. (Nota: na coluna "Cell No", 1 refere-se a 10 g/L, 2 a 20 g/L e 3 a 30 g/L).

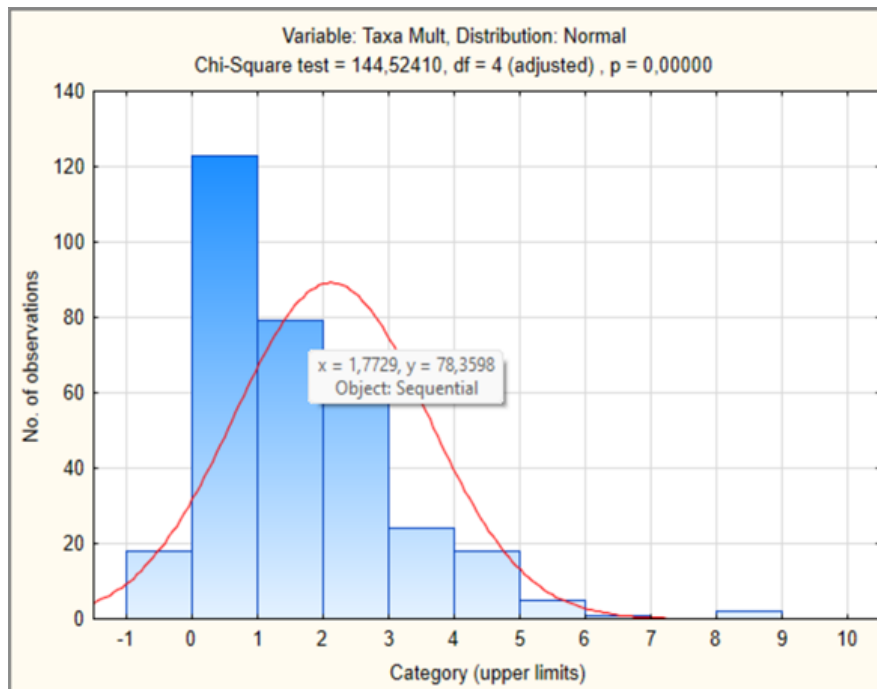
		Multiple Comparisons p values (2-tailed); Ta Morta (Mult Sacarose.sta)		
		Independent (grouping) variable: Concentração sacarose		
		Kruskal-Wallis test: H (2, N= 102) =6,973810 p =,0306		
Depend.:		10 g/l	20 g/l	30 g/l
Ta Morta		R:48,500	R:49,957	R:55,786
10 g/l			1,000000	0,942185
20 g/l		1,000000		1,000000
30 g/l		0,942185	1,000000	

Anexo - Figura 10: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da taxa de mortalidade, na fase da multiplicação, no ensaio da sacarose.

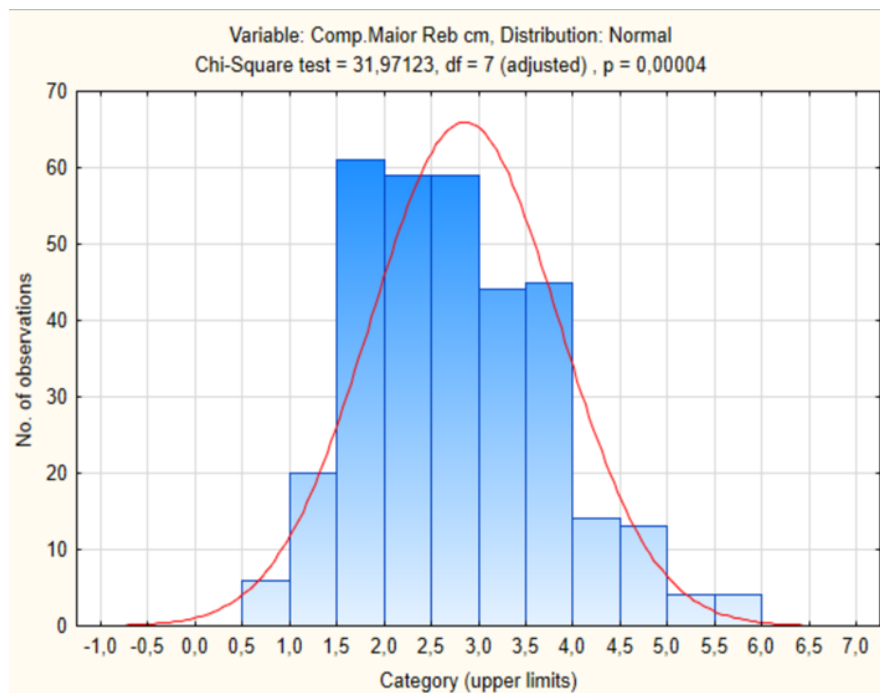
Anexo - Tabela 4: Efeito das diferentes concentrações de sacarose na fase de multiplicação *in vitro* de *C. lusitanica*.

Concentração de sacarose (g/L)	Taxa de Multiplicação		Qualidade dos Rebentos (1-2)		Comprimento do Maior Rebento (cm)	Taxa de Sobrevivência (%)	
	N	Média ± SE	N	Média ± SE	Média ± SE	N	Média ± SE
10	32	1,69 ± 0,17 ^b	32	2,00 ± 0,00 ^a	2,97 ± 0,15 ^b	32	100,00 ± 0,00 ^a
20	35	2,60 ± 0,18 ^a	35	1,97 ± 0,03 ^a	4,38 ± 0,20 ^a	35	97,14 ± 0,03 ^a
30	30	1,63 ± 0,10 ^b	35	1,86 ± 0,06 ^a	3,38 ± 0,16 ^b	35	85,71 ± 0,06 ^a

Nota: Os valores representam a média ± erro-padrão; foi realizada uma análise qualitativa para o parâmetro da Qualidade dos Rebentos (1-2); no parâmetro do Comprimento do Maior Rebento, letras diferentes mostram diferenças significativas para o teste paramétrico ANOVA; nos restantes parâmetros, letras diferentes mostram diferenças significativas para o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.



Anexo - Figura 11: Representação gráfica que comprova que a taxa de multiplicação na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento, não segue uma distribuição normal.



Anexo - Figura 12: Representação gráfica que comprova que o comprimento médio dos rebentos maiores, na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento, não segue uma distribuição normal.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Taxa Mult (Mult PGR sta)										
Independent (grouping) variable: PGR X conentra										
Kruskal-Wallis test: H (9, N= 329) =69.44770 p =,0000										
Depend.:	1: Controlo x 0	BAP x 0,5	BAP x 1	BAP x 2	2iP x 0,5	2iP x 1	2iP x 2	KIN x 0,5	KIN x 1	KIN x 2
Taxa Mult	R:152,61	R:144,62	R:119,34	R:145,65	R:191,31	R:237,97	R:237,64	R:136,50	R:127,25	R:142,10
1: Controlo x 0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,012339	0,013027	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 0,5	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,004181	0,004426	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 1	1,000000	1,000000		1,000000	0,075385	0,000010	0,000011	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 2	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,002850	0,003026	1,000000	1,000000	1,000000
2iP x 0,5	1,000000	1,000000	0,075385	1,000000		1,000000	1,000000	0,789675	0,305516	1,000000
2iP x 1	0,012339	0,004181	0,000010	0,002850	1,000000		1,000000	0,000495	0,000130	0,001280
2iP x 2	0,013027	0,004426	0,000011	0,003026	1,000000	1,000000		0,000528	0,000139	0,001363
KIN x 0,5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,789675	0,000495	0,000528		1,000000	1,000000
KIN x 1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,305516	0,000130	0,000139	1,000000		1,000000
KIN x 2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,001280	0,001363	1,000000	1,000000	

Anexo - Figura 13: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da taxa de multiplicação, na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Reben Qualida (Mult PGR sta)										
Independent (grouping) variable: PGR X conentra										
Kruskal-Wallis test: H (9, N= 350) =21,67043 p =,0100										
Depend.:	1: Controlo x 0	BAP x 0,5	BAP x 1	BAP x 2	2iP x 0,5	2iP x 1	2iP x 2	KIN x 0,5	KIN x 1	KIN x 2
Reben Qualida	R:166,00	R:156,00	R:181,00	R:176,00	R:186,00	R:186,00	R:186,00	R:176,00	R:161,00	R:181,00
1: Controlo x 0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 0,5	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 1	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 2	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2iP x 0,5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2iP x 1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2iP x 2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
KIN x 0,5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
KIN x 1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
KIN x 2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Anexo - Figura 14: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da qualidade dos rebentos, na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Comp.Maior Reb cm (Mult PGR sta)										
Independent (grouping) variable: PGR X conentra										
Kruskal-Wallis test: H (9, N= 329) =40,03083 p =,0000										
Depend.:	1: Controlo x 0	BAP x 0,5	BAP x 1	BAP x 2	2iP x 0,5	2iP x 1	2iP x 2	KIN x 0,5	KIN x 1	KIN x 2
Comp.Maior Reb cm	R:110,84	R:160,29	R:131,75	R:165,02	R:170,50	R:227,80	R:208,90	R:163,12	R:135,85	R:163,68
1: Controlo x 0		1,000000	1,000000	1,000000	0,494367	0,000028	0,001312	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 0,5	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,211864	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 1	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,001236	0,034026	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 2	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,293445	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2iP x 0,5	0,494367	1,000000	1,000000	1,000000		0,528020	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2iP x 1	0,000028	0,211864	0,001236	0,293445	0,528020		1,000000	0,228240	0,004599	0,230219
2iP x 2	0,001312	1,000000	0,034026	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,091077	1,000000
KIN x 0,5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,228240	1,000000		1,000000	1,000000
KIN x 1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,004599	0,091077	1,000000		1,000000
KIN x 2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,230219	1,000000	1,000000	1,000000	

Anexo - Figura 15: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados do comprimento médio dos rebentos maiores, na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Taxa Sobrev (Mult PGR sta)										
Independent (grouping) variable: PGR X conentra										
Kruskal-Wallis test: H (9, N= 350) =21,67043 p =,0100										
Depend.:	1: Controlo x 0	BAP x 0,5	BAP x 1	BAP x 2	2iP x 0,5	2iP x 1	2iP x 2	KIN x 0,5	KIN x 1	KIN x 2
Taxa Sobrev	R:166,00	R:156,00	R:181,00	R:176,00	R:186,00	R:186,00	R:186,00	R:176,00	R:161,00	R:181,00
1: Controlo x 0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 0,5	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 1	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
BAP x 2	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2iP x 0,5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2iP x 1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2iP x 2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
KIN x 0,5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
KIN x 1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
KIN x 2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Anexo - Figura 16: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da taxa de sobrevivência, na fase da multiplicação, no ensaio de reguladores de crescimento.

Anexo - Tabela 5: Efeito das diferentes citocininas e concentrações, na multiplicação *in vitro* de *C. lusitanica*.

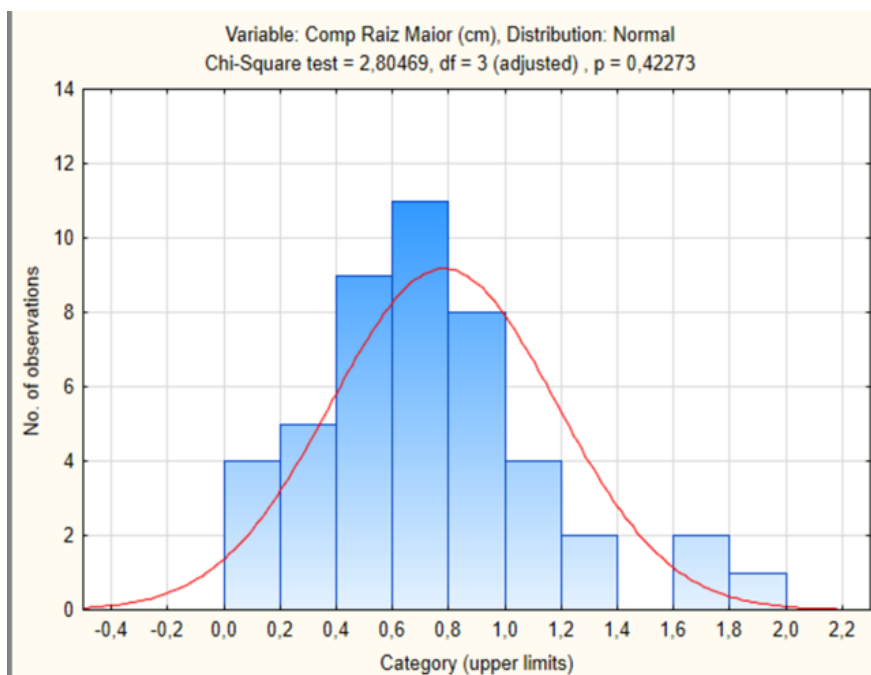
RC (Tipo x Conc. (mg/l))	Taxa de Multiplicação		Qualidade dos Rebentos (1-2)		Comprimento do Maior Rebento (cm)	Taxa de Sobrevivência (%)	
	N	Média ± SE	N	Média ± SE	Média ± SE	N	Média ± SE
2iP x 0,5	35	2,37 ± 0,21 ^{ab}	35	2,00 ± 0,00 ^a	2,87 ± 0,14^a	35	100,00 ± 0,00 ^a
2iP x 1	35	3,43 ± 0,32^a	35	2,00 ± 0,00 ^a	3,58 ± 0,20^a	35	100,00 ± 0,00 ^a
2iP x 2	35	3,23 ± 0,24^a	35	2,00 ± 0,00 ^a	3,31 ± 0,17^a	35	100,00 ± 0,00 ^a
BAP x 0,5	29	1,79 ± 0,23 ^b	35	1,83 ± 0,06 ^a	2,85 ± 0,25^a	35	82,86 ± 0,06 ^a
BAP x 1	34	1,44 ± 0,18 ^b	35	1,97 ± 0,03 ^a	2,48 ± 0,16 ^b	35	97,14 ± 0,03 ^a
BAP x 2	33	1,91 ± 0,26 ^b	35	1,94 ± 0,04 ^a	2,86 ± 0,18^a	35	94,29 ± 0,04 ^a
KIN x 0,5	33	1,61 ± 0,13 ^b	35	1,94 ± 0,04 ^a	2,79 ± 0,13 ^{ab}	35	94,29 ± 0,04 ^a
KIN x 1	30	1,50 ± 0,14 ^b	35	1,86 ± 0,06 ^a	2,53 ± 0,14 ^b	35	85,71 ± 0,06 ^a
KIN x 2	34	1,71 ± 0,17 ^b	35	1,97 ± 0,03 ^a	2,78 ± 0,12 ^{ab}	35	97,14 ± 0,03 ^a
Controlo	31	2,03 ± 0,33 ^b	35	1,89 ± 0,05 ^a	2,35 ± 0,12 ^b	35	88,57 ± 0,05 ^a

Nota: Os valores representam a média ± erro-padrão; foi realizada uma análise qualitativa para o parâmetro da Qualidade dos Rebentos (1-2); letras diferentes mostram diferenças significativas para o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Anexo - Tabela 6: Efeito das diferentes concentrações de AIB no enraizamento *in vitro* de rebentos de *C. lusitanica*.

AIB (mg/L)	Taxa Enraiz. <i>In vitro</i>		Presença <i>callus</i> (%)	
	N	Média ± SE	N	Média ± SE
1	35	0,00 ± 0,00 ^a	31	100,0 ± 0,00 ^a
3	35	8,57 ± 0,05 ^a	30	100,0 ± 0,00 ^a
5	35	2,86 ± 0,03 ^a	29	100,0 ± 0,00 ^a

Nota: Os valores representam a média ± erro-padrão; letras iguais mostram a ausência de diferenças significativas.



Anexo - Figura 17: Representação gráfica que comprova que o comprimento médio da raiz maior, na fase do enraizamento, segue uma distribuição normal.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Enraizamento ex vitro (Spreadsheet1)			
Independent (grouping) variable: Condição x substrato			
Kruskal-Wallis test: H (2, N= 90) =11,16897 p =,0038			
Depend.:	com agulhas x jiffy	sem agulhas x jiffy	sem agulhas x turf.perl.
Enraizamento ex vitro	R:36,000	R:55,500	R:45,000
com agulhas x jiffy		0,011525	0,546367
sem agulhas x jiffy	0,011525		0,358680
sem agulhas x turf.perl.	0,546367	0,358680	

Anexo - Figura 18: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da taxa do enraizamento *ex vitro*.

Univariate Tests of Significance for Comp Raiz Maior (cm) (Spreadsheet1)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	23,28695	1	23,28695	144,3406	0,000000
Condição x substrato	0,26875	2	0,13438	0,8329	0,441673
Error	6,93733	43	0,16133		

Anexo - Figura 19: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados do comprimento da raiz maior, para o enraizamento *ex vitro*.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Qualidade Plantula (1-3) (Spreadsheet1)			
Independent (grouping) variable: Condição x substrato			
Kruskal-Wallis test: H (2, N= 90) =5,829856 p =,0542			
Depend.:			
Qualidade Plantula (1-3)	com agulhas x jiffy R:37,900	sem agulhas x jiffy R:52,767	sem agulhas x turf.perl. R:45,833
com agulhas x jiffy		0,082577	0,718646
sem agulhas x jiffy	0,082577		0,912039
sem agulhas x turf.perl.	0,718646	0,912039	

Anexo - Figura 20: Output do software Statistica versão 12, relativo ao tratamento estatístico para os dados da qualidade das plântulas, para o enraizamento *ex vitro*.

Anexo - Tabela 7: Efeito da presença/ausência de agulhas basais e do tipo de substrato, na fase do enraizamento *ex vitro*, em rebentos de *C. lusitanica*.

Condições de enraizamento	Taxa de enraizamento <i>ex vitro</i> (%)		Comprimento da raiz maior (cm)		Qualidade da plântula (1-3)	
	N	Média ± SE	N	Média ± SE	N	Média ± SE
com agulhas x jiffy	30	30,00 ± 0,09 ^b	9	0,63 ± 0,19 ^a	30	2,10 ± 0,13 ^a
sem agulhas x jiffy	30	73,33 ± 0,08^a	22	0,80 ± 0,06 ^a	30	2,50 ± 0,16 ^a
sem agulhas x turf.perl.	30	50,00 ± 0,09 ^{ab}	15	0,85 ± 0,12 ^a	30	2,33 ± 0,14 ^a

Nota: Os valores representam a média ± erro-padrão; foi realizada uma análise qualitativa para o parâmetro da qualidade das plântulas (1-3); no parâmetro do comprimento da raiz maior, letras iguais mostram a ausência de diferenças significativas para o teste paramétrico ANOVA; nos restantes parâmetros, letras diferentes mostram diferenças significativas para o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.