

## MESTRADO EM ENGENHARIA AGRO PECUÁRIA

Inês Ricardo Ramos

### Propagação de Alfarrobeira

*(Ceratonia siliqua L.)*

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em ENGENHARIA AGRO-PECUÁRIA

Orientador interno: Kiril Bahcevandziev

Orientador Externo: Fábio Castro

Local: GreenClon, Lda

Coimbra, 2024

## Resumo

Este estudo tem como objetivo a propagação da alfarrobeira em laboratório por duas vertentes, pela técnica assexuada (a micropropagação), e pela técnica sexuada (germinação de sementes).

O material vegetativo utilizado neste trabalho originou plantas cedidas por um produtor da região do Algarve. Tratou-se de material jovem e vigoroso, que posteriormente foi sujeito a uma desinfecção e sendo estabelecido em tubos de ensaio. Nesta etapa foram avaliados dois meios de cultura, com diferentes concentrações de reguladores de crescimento (BAP 0,5 mg/L e 1,0 mg/L), de modo a avaliar o que obtinha um maior número de crescimentos/rebentações, presença de calos e lenticelas, aspeto visual mais saudável, contaminações e possíveis mortes.

Neste ensaio, o meio de cultura com a concentração de BAP mais elevada (1 mg/L), demonstrou resultados insatisfatórios, uma vez que apresentaram um maior número de calos e lenticelas, sintomas de necrose e um aspeto visual menos saudável, comparativamente ao meio de cultura com uma concentração de BAP menor (0,5 mg/L).

Para a o teste de germinação foram utilizados quatro tratamentos diferentes, o tratamento A que correspondia à imersão das sementes em água destilada esterilizada a 100°C durante 10 minutos seguindo da sua imersão em água destilada esterilizada, à temperatura ambiente, durante 48H; o tratamento B, confere à imersão das sementes em GA<sub>3</sub> (25 mg/L) por 24H, o tratamento C que correspondia à imersão das sementes em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (37%) por 30 minutos e por último o tratamento D, que corresponde ao controlo do ensaio, a imersão das sementes em água destilada esterilizada à temperatura ambiente durante 48H.

Os resultados mais favoráveis obtidos neste protocolo de germinação, foram do tratamento C, que conduziu a uma rutura do tegumento que, por conseguinte, demonstrou uma germinação do embrião mais favorável.

Palavras-chave: Alfarrobeira, micropropagação, germinação, reguladores de crescimento, sementes.

## Abstract

The aim of this study is to propagate the carob tree in the laboratory in two ways: using the asexual technique (micropropagation) and the sexual technique (seed germination).

The vegetative material used in this work originated from plants provided by a producer in the Algarve region. This was young and vigorous material, which was subsequently subjected to disinfection and established in test tubes. At this stage, two culture media were evaluated, with different concentrations of growth regulators (BAP 0.5 mg/L and 1.0 mg/L), in order to assess which one obtained a greater number of growths/shoots, presence of calluses and lenticels, healthier visual appearance, contamination and possible deaths. In this test, the culture medium with the highest BAP concentration (1 mg/L) showed unsatisfactory results, as it presented a greater number of calluses and lenticels, symptoms of necrosis and a less healthy visual appearance, compared to the culture medium with a lower BAP concentration (0.5 mg/L).

Four different treatments were used for the germination test: treatment A, which consisted of immersing the seeds in sterilized distilled water at 100°C for 10 minutes, followed by immersion in sterilized distilled water at room temperature for 48 hours; treatment B, which consisted of immersing the seeds in GA3 (25 mg/L) for 24 hours; treatment C, which consisted of immersing the seeds in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (37%) for 30 minutes; and finally, treatment D, which was the test control, immersing the seeds in sterilized distilled water at room temperature for 48 hours.

The most favorable results obtained in this germination protocol were from treatment C, which led to a rupture of the tegument, which consequently demonstrated a more favorable germination of the embryo.

Key-words: Carob tree, micropropagation, germination, growth regulators, seeds.

## Índice

Resumo.....	ii
Abstract .....	iii
Índice.....	iv
Índice de Figuras .....	v
Índice de Tabelas .....	vi
Índice de Esquemas .....	vi
Índice de Gráficos .....	vi
Introdução .....	1
<i>Ceratonia siliqua</i> L. ....	1
Distribuição geográfica.....	1
Ecologia.....	2
Morfologia .....	3
Variedades .....	8
Propriedades da alfarroba .....	9
Produção de alfarroba .....	12
Importância da Alfarroba.....	15
Produção de plantas de alfarrobeira.....	17
Micropropagação <i>in vitro</i> .....	20
A) Reguladores de crescimento.....	23
Objetivos.....	24
Material e métodos.....	25
1. Micropropagação de material vegetal <i>in vitro</i> - estabelecimento: .....	25
2. Germinação de sementes:.....	29
Análise de dados e tratamento estatístico .....	34
Resultados e Discussão .....	35
1. Micropropagação de material vegetal <i>in vitro</i> : .....	35
2. Germinação de sementes:.....	41
Conclusão e perspectivas futuras.....	49
Bibliografia.....	51
Anexos .....	54

Anexo II - Análise estatística do referente ao primeiro ensaio de material vegetal <i>in vitro</i> .....	55
Anexo III - Análise estatística do referente ao segundo ensaio de material vegetal <i>in vitro</i> .....	57
Anexo IV - Análise estatística do referente à taxa de germinação nos diferentes tratamentos .....	58

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Distribuição mundial da alfarrobeira. ....	2
<b>Figura 2:</b> Características da alfarrobeira. ....	3
<b>Figura 3:</b> Folhas de alfarrobeira. ....	4
<b>Figura 4:</b> Inflorescências femininas da alfarrobeira. ....	5
<b>Figura 5:</b> Inflorescências masculinas da alfarrobeira. ....	6
<b>Figura 6:</b> Vagem da alfarrobeira imatura. ....	7
<b>Figura 7:</b> Fases de desenvolvimento da vagem de alfarroba. ....	7
<b>Figura 8:</b> Representação da semente de alfarroba. ....	9
<b>Figura 9:</b> Estrutura química da goma de alfarroba (LBG) .....	11
<b>Figura 10:</b> Principais países produtores de alfarroba no mundo na última década (2012-2021). Fonte: (Mahdad & Gaouar, 2023).....	14
<b>Figura 11:</b> Porta-enxerto enxertado em viveiro. ....	19
<b>Figura 12:</b> Processo da técnica de micropropagação. ....	21
<b>Figura 13:</b> Método de enraizamento/aclimatização de plantas. ....	22
<b>Figura 14:</b> Vaso com uma das alfarrobeiras da variedade Mulata localizadas na GreenClon.....	25
<b>Figura 15:</b> Rebentos colhidos para o ensaio. ....	26
<b>Figura 16:</b> Segmentos de alfarrobeira, após o procedimento de estabelecimento. ....	29
<b>Figura 17:</b> Sementes de alfarroba, variedade Mulata. ....	29
<b>Figura 18:</b> Placas de Petri com os meios de cultura, 1 e 2.....	32
<b>Figura 19:</b> Placas de Petri com as sementes, após o procedimento de desinfeção. ....	32
<b>Figura 20:</b> Tabuleiros com perlitado ensaio <i>ex vitro</i> . ....	33
<b>Figura 21:</b> Semente de alfarroba a iniciar a germinação. ....	33
<b>Figura 22:</b> Segmento de alfarrobeira com lenticelas no meio 2. ....	36
<b>Figura 23:</b> Comparação da coloração dos segmentos no meio 1 (à esquerda) e no meio 2 (à direita). ....	37
<b>Figura 24:</b> Segmentos no meio de cultura 1. Na imagem da esquerda e da direita é possível verificar que os segmentos apresentam uma coloração verde mais clara e um crescimento maior, comparativamente ao meio de cultura 2. ....	39
<b>Figura 25:</b> Segmentos no meio de cultura 2. Os segmentos apresentam uma coloração verde mais escura e um crescimento menor. Na imagem à esquerda encontra-se um segmento com uma elevada quantidade de calo na base. Na imagem à direita encontra-se um segmento com crescimento, mas com lenticelas espelhas ao longo do caule. ..	40

**Figura 26:** Contaminações por bactéria, no tratamento A, in vitro e ex vitro, respetivamente..... 42

## Índice de Tabelas

**Tabela 1:** Descrição taxonómica da alfarrobeira. Fonte: (UTAD - Jardim Botânico, 2024). ..... 1

**Tabela 2:** Características das variedades mais cultivadas. Adaptado de (Costa & Rosa, 2020). ..... 9

**Tabela 3:** Composição média da polpa de alfarroba. Adaptado de Puhan & Wieling (1996). ..... 10

**Tabela 4:** Composição do embrião da alfarroba. Fonte: (CyberColloids Ltd., s.d.; Laaraj, et al., 2023). ..... 11

**Tabela 5:** Composição de aminoácidos do germe da semente de alfarroba. Adaptado de (Laaraj, et al., 2023) ..... 12

**Tabela 6:** Área cultivada, produção e rendimento dos principais países produtores de alfarroba nos últimos anos (2012-2021). Fonte: FAO; MAPA; ISTAT. Adaptado de: (Mahdad & Gaouar, 2023) ..... 13

**Tabela 7:** Produção nacional de alfarroba e comercio internacional. Fonte: (SIMA, Semana 13 - 2024). ..... 14

**Tabela 8:** Meios de cultura utilizados. .... 28

**Tabela 9:** Número de sementes germinadas por tratamento em cada ensaio. .... 43

## Índice de Esquemas

**Esquema 1:** Procedimento utilizado na germinação de sementes na vertente in vitro. 30

**Esquema 2:** Procedimento utilizado na germinação de sementes na vertente ex vitro. .... 31

## Índice de Gráficos

**Gráfico 1:** Primeiro ensaio de estabelecimento de alfarroba. .... 35

**Gráfico 2:** Segundo ensaio de estabelecimento de alfarroba. .... 38

**Gráfico 3:** Resultados da análise estatística ANOVA aos resultados dos estabelecimentos in vitro. .... 40

**Gráfico 4:** Taxa de germinação - Segundo ensaio. .... 45

**Gráfico 5:** Taxa de germinação - Primeiro ensaio. .... 45

**Gráfico 6:** Resultados da análise estatística ANOVA à taxa de germinação por tratamento. .... 47

## Introdução

O presente trabalho consiste na apresentação da alfarrobeira (*Ceratonía síliqua* L.), apresentando a sua distribuição geográfica, a sua caracterização botânica e variedades, as propriedades do seu fruto, produções e importância da espécie, aplicações e por último a contextualização do processo de micropropagação *in vitro*.

### *Ceratonía síliqua* L..

A alfarrobeira (*Ceratonía síliqua* L.) é uma espécie xerófita e esclerófita, da família das leguminosas (*Fabaceae*; Tabela 1), característica da vegetação dos ecossistemas mediterrânicos e cultivada desde épocas remotas nos países do litoral mediterrânico, tendo sido reconhecido o seu valor pelos povos da Grécia antiga.

É uma árvore rústica, capaz de se desenvolver e frutificar em condições adversas, como por exemplo, em sequeiro (Loução & Carvalho, 1989; Batlle & Tous, 1997; Correia, Guerreiro, & Bouça, 2017). Devido a esta característica, a espécie foi reconhecida pelos agricultores da região mediterrânica como um valioso substituto dos cereais em tempos de seca.

**Tabela 1:** Descrição taxonómica da alfarrobeira. Fonte: (UTAD - Jardim Botânico, 2024).

<b>Ordem</b>	<i>Rosales</i>
<b>Família</b>	<i>Fabaceae</i>
<b>Subfamília</b>	<i>Caesalpinoidea</i>
<b>Género</b>	<i>Ceratonía</i>
<b>Espécie</b>	<i>Ceratonía síliqua</i>

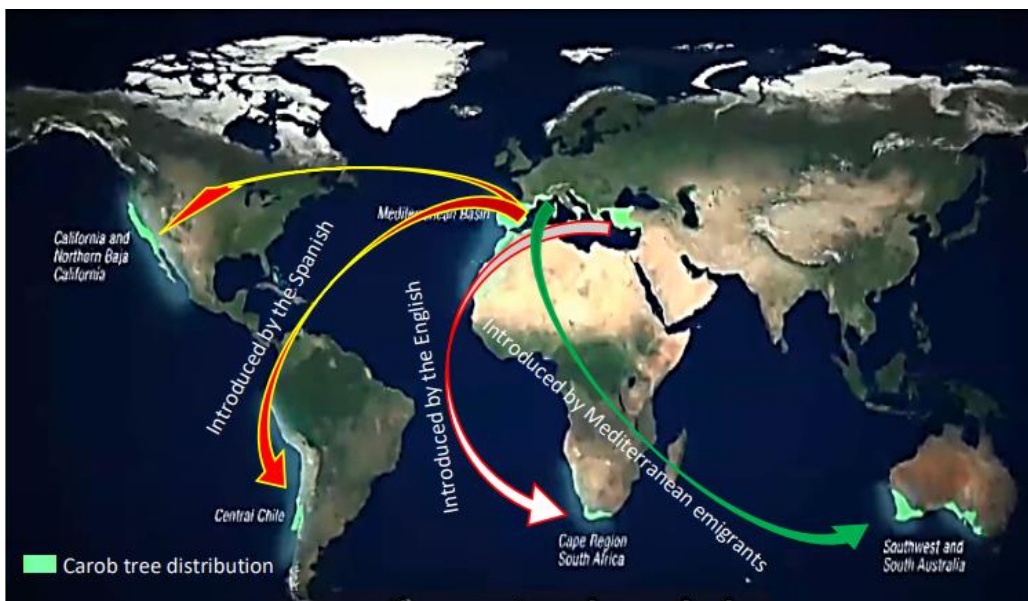
### Distribuição geográfica

A cultura distribui-se ao longo da região Mediterrânica, desde o Egipto à Grécia, sul da Europa. Em Portugal Continental, localiza-se essencialmente no sul do território, Alentejo e, sobretudo, no Algarve, região onde é largamente cultivada. Foi também introduzida no arquipélago da Madeira (Florestas.pt, 2020).

O período em que a alfarroba foi cultivada pela primeira vez permanece obscuro, mas algumas evidências arqueológicas sugerem que os egípcios podem ter sido os primeiros povos a explorar os potenciais da espécie. Na antiguidade,

também são descritos factos sobre a utilização da madeira da alfarroba, para construção de templos no antigo Egipto (Batlle & Tous, 2013).

Segundo alguns dados históricos, a cultura de alfarroba foi disseminada pelos povos da Grécia até à Itália, tendo posteriormente os árabes transportado a cultura para o norte de África, para o leste de Espanha e para o sul de Portugal. Recentemente a cultura espalhou-se para outras regiões de clima semelhante ao mediterrânico (Figura 1), como a Califórnia, México, Chile e Argentina, e foi introduzida na Austrália por indivíduos do mediterrâneo e em África do Sul e na Índia pelos britânicos (Batlle & Tous, 1997; Mahdad & Gaouar, 2023).



**Figura 1:** Distribuição mundial da alfarrobeira.

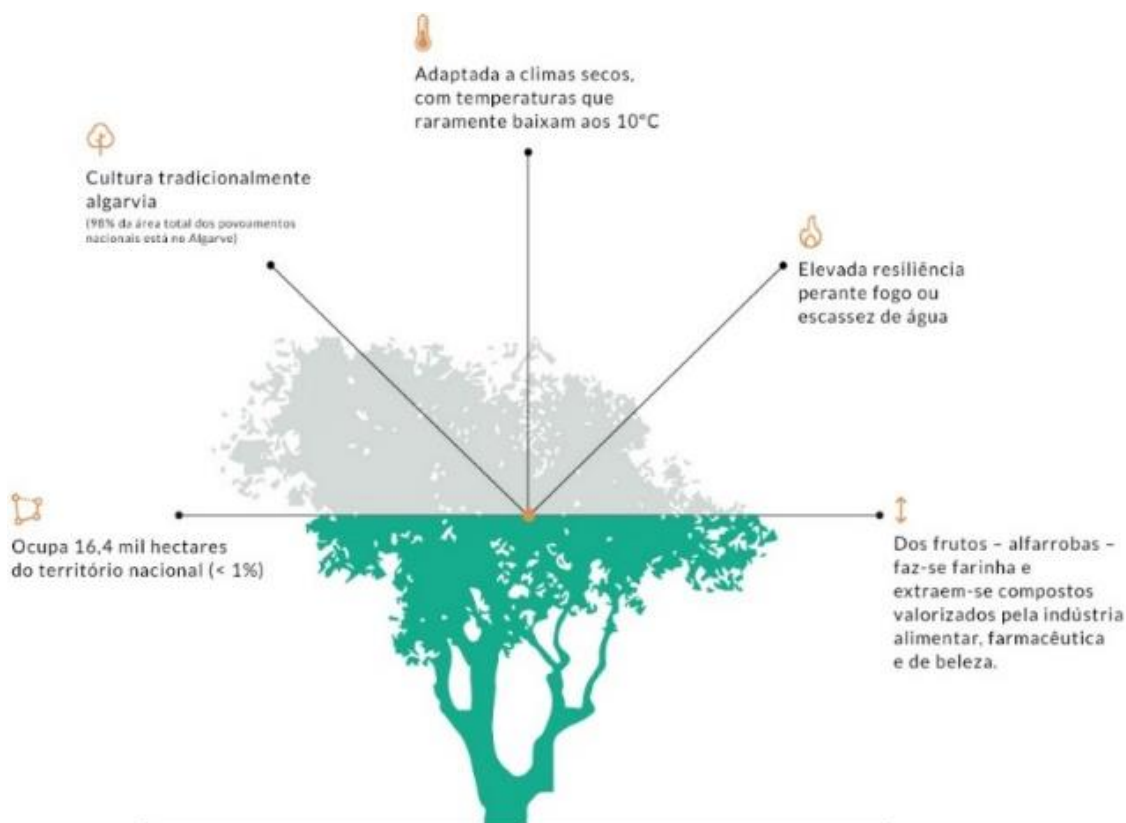
Fonte: (Mahdad & Gaouar, 2023)

## Ecologia

A alfarroba é uma espécie que cresce em zonas subtropicais quentes e temperadas, tolerando condições quentes e húmidas. Sendo uma planta xerófita, está adaptada às condições ecológicas da região mediterrânica, devido à sua eficiência na regulação hídrica por ajustamento estomático e também à sua estrutura e anatomia foliar (Batlle & Tous, 2013). Os principais períodos de crescimento da espécie, ocorrem na primavera e no outono, havendo, contudo, uma dormência ligeira nos meses mais frios. No entanto, em locais, sem invernos frios, a espécie não apresenta dormência, mantendo-se sempre ativa, reduzindo apenas a taxa de atividade no mês de janeiro. As alfarrobeiras conseguem sobreviver a ambientes secos com uma precipitação média

anual entre os 250 e 500 mm por ano, desenvolvendo alguns mecanismos de resistência e tolerância à seca (Batlle & Tous, 1997; Batlle & Tous, 2013; Correia, Guerreiro, & Bouça, 2017).

As alfarrobeiras são cultivadas em solos com características muito diversas (Figura 2), desde solos pobres e arenosos, encostas rochosas e até solos profundos. No entanto, os solos mais favoráveis são franco-arenosos e bem drenados, com um pH alcalino ou neutro e com um alto teor de calcário (Batlle & Tous, 2013).



**Figura 2:** Características da alfarrobeira.  
Fonte: (Florestas.pt, 2020)

### Morfologia

A alfarrobeira é uma espécie que, dependendo as condições ambientais, pode atingir uma altura de 10 a 20 metros, com copa larga e semiesférica. Tem um crescimento lento, no entanto apresenta uma grande longevidade, podendo viver centenas de anos (Batlle & Tous, 1997; Loução & Carvalho, 1989). A árvore tem um crescimento vegetativo cíclico, sendo o fluxo de crescimento maior na primavera e no outono, este último é mais fraco comparativamente à primavera. A temperaturas baixas

(abaixo dos  $-10^{\circ}$ ), o crescimento vegetativo é muito reduzido, no entanto na primavera quando ocorre o aumento da intensidade de crescimento dos rebentos, pode ser influenciado pelo estado da planta (UTAD - Jardim Botânico, 2024).

As raízes são profundas e preparadas para suportar uma copa de grandes dimensões, devido à profundidade das raízes a planta vai buscar a água de que necessita, preferencialmente, às reservas hídricas do subsolo (Batlle & Tous, 2013).

Apresenta folhagem persistente, com um comprimento variável de 10 a 20 centímetros, sendo formada por folhas compostas, pinuladas com folíolos coriáceos (Figura 3) (Batlle & Tous, 2013).



**Figura 3:** Folhas de alfarrobeira.  
Fonte: [Ceratonia siliqua](#) | Flora-On

A alfarrobeira é uma espécie de árvore mediterrânica que apresenta a floração principal no final do verão e no outono, sendo semelhante a muitas plantas tropicais e raro para plantas da região mediterrânica (Batlle & Tous, 2013). É uma espécie descrita normalmente, como dioica, apresentando flores femininas e masculinas em indivíduos distintos, podendo raramente ser poligâmica apresentando também flores hermafroditas. (Batlle & Tous, 1997).

As inflorescências são pequenas e imperfeitas, apresentando apenas estames ou carpelos, e nascem nos nós dos ramos com uma idade de três a cinco anos, em zonas desprovidas de folhas, surgindo entre os meses de julho e dezembro, com pico de floração em outubro (Batlle & Tous, 1997).

As flores (Figura 5) são de cor vermelha-esverdeada e apresentam uma simetria pentâmera com o cálice (Batlle & Tous, 1997).

As flores femininas (Figura 4) apresentam um pistilo, com uma dimensão variável entre os 6 a 8,5 mm, um disco e estames rudimentares, rodeados por 5 sépalas peludas. O ovário é curvo, constituído por dois carpelos com vários óvulos, apresentando um estigma com 2 lóbulos (Batlle & Tous, 1997)



**Figura 4:** Inflorescências femininas da alfarrobeira.

Fonte: [Ceratonia siliqua | Flora-On](#)

As flores masculinas são constituídas por um disco nectário com 5 estames com delicados filamentos rodeados por sépalas peludas, apresentando no centro do disco um pistilo rudimentar (Figura 5). Em comparação, as flores hermafroditas são uma combinação dos dois tipos, apresentando um pistilo e um complemento de 5 estames (Batlle & Tous, 1997)



**Figura 5:** Inflorescências masculinas da alfarrobeira.  
Fonte: [Ceratonia siliqua](#) | Flora-On

A polinização decorre essencialmente nos meses de setembro a outubro, e é sobretudo realizada por insetos (polinização entomófila), no entanto a polinização anemófila (mediada pelo vento) também pode ocorrer, promovendo o transporte do pólen (Batlle & Tous, 1997; Loução & Carvalho, 1989).

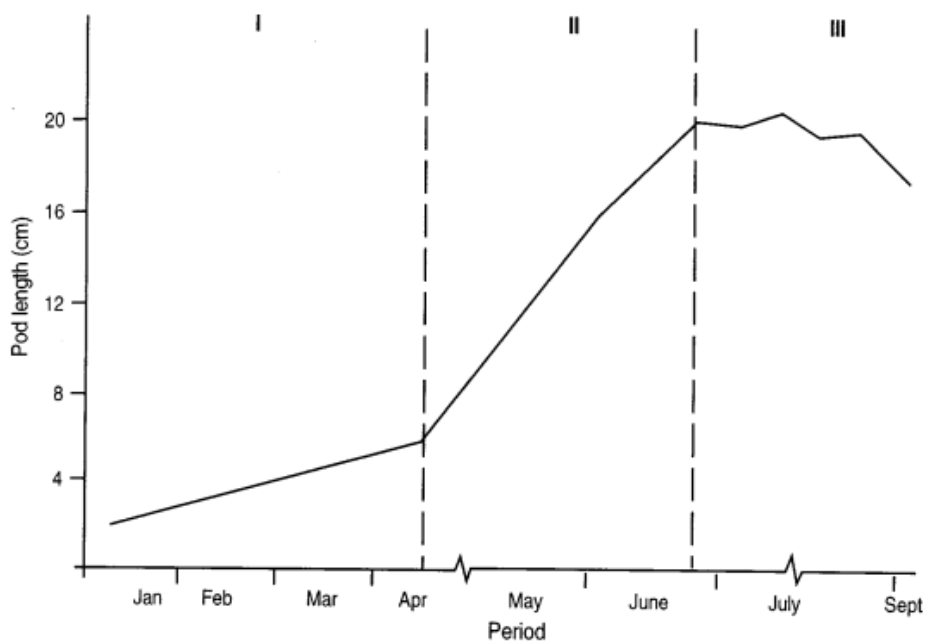
A floração ocorre de forma escalonada, tendo uma duração superior a 4 meses. Contudo, as plantas com flores masculinas possuem uma fenologia floral mais alargado, podendo apresentar variações consoante a variedade (Batlle & Tous, 1997).

O fruto, é uma vagem indeiscente denominada de alfarroba (Figura 6), apresenta uma forma alongada, espalmada e coriácea, com cerca de 10 a 22 centímetros de comprimento e 2 a 3 centímetros de largura. Quando o fruto é jovem, a sua coloração é verde, sendo gradualmente alterada para castanho-escuro à medida, que atinge o seu tamanho máximo e maturidade, no mês de setembro do ano seguinte. A maturação do fruto é indicada pelo escurecimento completo do pedicelo pouco antes do desprendimento natural do ramo e neste período o fruto atinge também o seu nível máximo de açúcar (Batlle & Tous, 1997; Batlle & Tous, 2013; Loução & Carvalho, 1989).



**Figura 6:** Vagem da alfarrobeira imatura.  
Fonte: Ceratonia siliqua | Flora-On

A fase de crescimento e maturação do fruto demora cerca de 10 a 11 meses, ocorrendo a sobreposição de alfarrobas maduras, com o crescimento inicial das inflorescências. O crescimento da vagem da alfarroba é representado por uma curva sigmoide e pode ser dividida em 3 fases (Figura 7) (Batlle & Tous, 1997; Batlle & Tous, 2013; Loução & Carvalho, 1989).



**Figura 7:** Fases de desenvolvimento da vagem de alfarroba.  
Fonte: (Batlle & Tous, 1997)

Na fase I, ocorre um crescimento lento da vagem, influenciado pelas baixas temperaturas sentidas durante o outono e inverno, já na fase II, despoletada pelo início da primavera, a vagem aumenta muito a sua massa e tamanho, entrando no período mais ativo do seu crescimento, entre os meses de abril a junho. Por último, na fase III, a vagem cresce lentamente e começa o amadurecimento, onde esta muda de cor: passa de uma cor verde para ter uma cor castanha, havendo neste processo também a libertação de água (Batlle & Tous, 1997).

As sementes ou grãos, provenientes do interior da vagem, apresentam uma forma oval, plana de 9 a 10 milímetros de comprimento e 7 a 8 milímetros de largura. As sementes são lisas, duras e com uma coloração lustrosa acastanhada (Batlle & Tous, 1997; Correia, Guerreiro, & Bouça, 2017). As sementes de variedades enxertadas compreendem geralmente 8 – 12% da massa da vagem e 16-20% para os tipos não enxertados.

## Variedades

A tradição da cultura da alfarrobeira ao longo dos anos, levou à existência de uma grande diversidade varietal. Em 1998, no Centro de Experimentação Agrária de Tavira (CEAT) foi instalada uma coleção de 14 variedades de alfarrobeiras. À posteriori, entre os anos de 2011 e 2014, com o desenvolvimento do projeto FRUTALG, foi possível a identificação e instalação de cerca de 44 variedades, aumentando a coleção que atualmente apresenta um elevado valor cultural e genético. A identificação das variedades foi elaborada com base nos seguintes parâmetros (Costa & Rosa, 2020):

- Planta – Porte, vigor, densidade de folhagem, produção;
- Folha – Nº e forma de folíolos, tamanho, cor;
- Inflorescência – comprimento, cor, época de floração;
- Fruto – maturação, forma, cor, tamanho, peso médio;
- Semente – forma, cor, tamanho, peso médio, relação polpa/semente, rendimento.

Das 44 variedades identificadas, as mais cultivadas são a Mulata, a Galhosa e a Canela (Costa & Rosa, 2020). As diferenças das características das vagens e do fruto das

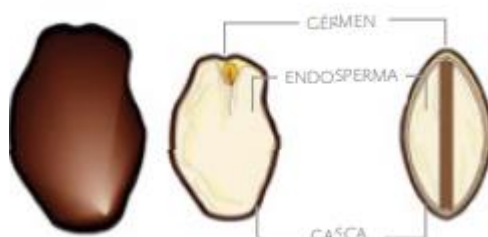
variedades mais cultivadas e com mais interesse, encontram-se apresentadas na seguinte Tabela 2.

**Tabela 2:** Características das variedades mais cultivadas. Adaptado de (Costa & Rosa, 2020).

Mulata	Galhosa	Canela
		
Variedade vigorosa, de porte aberto, caído, com forte densidade de folhagem.	Variedade vigorosa, de porte ereto, aberto, com abundante folhagem.	Variedade vigorosa, de porte ereto, aberto, com fraca a média densidade de folhagem.
Fruto castanho-escuro, direito, tamanho médio.	Fruto acastanhado, direito com ligeira curvatura, tamanho médio.	Fruto acastanhado a castanho-escuro, direito, tamanho pequeno a médio.
Semente oval elíptica, castanho avermelhada, de peso médio.	Semente oval elíptica, castanha, pesada.	Semente elíptica, castanha, peso mediano.
Semi precoce, de média produtividade, rendimento em semente elevado, média relação polpa/semente.	Tardia, de produtividade média, rendimento em semente elevado, média relação polpa / semente.	Semi precoce, muito pouco produtiva, rendimento em semente elevado, baixa relação polpa/semente.

### Propriedades da alfarroba

A vagem da alfarroba é dividida em 2 componentes, a polpa que representa cerca de 90% da vagem e pela semente que fica com os restantes 10%. Contudo, a semente de alfarroba é dividida em três partes, casca (30-35%), endosperma (40-50%) e germe ou embrião (20-25%), como descrito na Figura 8 (Laaraj, et al., 2023; Mendonça, et al., 2023).



**Figura 8:** Representação da semente de alfarroba.  
Fonte: (Mendonça, et al., 2023)

Em relação à composição química da polpa, esta pode variar consoante a variedade, época de colheita e a origem. Contudo, a polpa da alfarroba é rica em açúcares totais (48 – 56%), essencialmente sacarose (Tabela 3). A polpa apresenta também 18% de celulose e hemicelulose (polissacarídeos não amiláceos). Segundo Puhan & Wieling (1996), em termos de composição mineral a polpa apresenta:

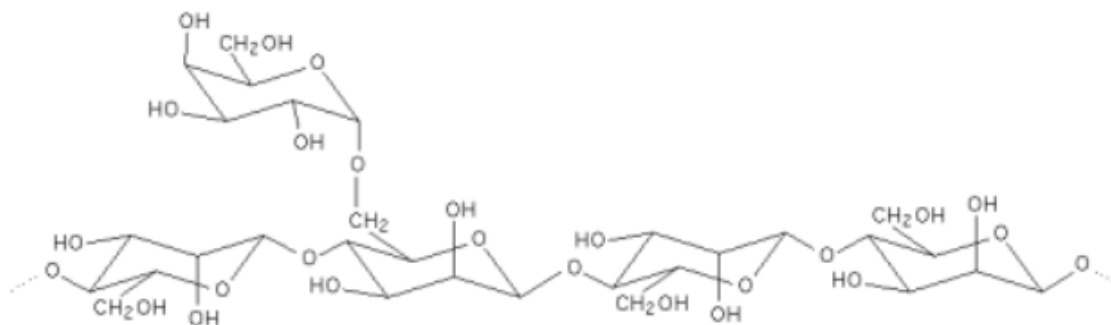
- K = 1100 mg/100g de polpa
- Ca= 307 mg/100g de polpa
- Mg = 42 mg/100g de polpa
- Na= 13 mg/100g de polpa
- Cu = 0,23 mg/100g de polpa
- Fe = 104 mg/100g de polpa
- Mn = 0,4 mg/100g de polpa
- Zn = 0,59 mg/100g de polpa

**Tabela 3:** Composição média da polpa de alfarroba. Adaptado de Puhan & Wieling (1996).

Constituintes	%
<b>Açúcares totais</b>	48-56
<b>Sacarose</b>	32-38
<b>Glicose</b>	5-6
<b>Frutose</b>	5-7
<b>Pinitol</b>	5-7
<b>Taninos condensados</b>	18-20
<b>Polissacarídeos não amiláceos</b>	18
<b>Cinzas</b>	2-3
<b>Gordura</b>	0,2-0,6

O endosperma da semente de alfarroba é branco e translúcido, contém um alto teor em antioxidantes e contém um polissacarídeo conhecido como goma de alfarroba (*Locust bean gum* - LBG) ou E410.

A goma de alfarroba (LBG) é um polissacarídeo composta por unidades de manose e galactose, numa proporção de 4:1 (Figura 9). A sua principal característica é a alta viscosidade e a elevada capacidade de se ligar à água para formar soluções estáveis (CyberColloids Ltd., s.d.; Laaraj, et al., 2023).



**Figura 9:** Estrutura química da goma de alfarroba (LBG)

Fonte: (CyberColloids Ltd., s.d.)

O germe ou embrião é constituído por cerca de 52% de proteína e o nível de LBG é usado como um indicador de qualidade (Tabela 4). O germe é composto por cerca de 8% de lípidos e 27% de hidratos de carbono (Batlle & Tous, 1997; CyberColloids Ltd., s.d.; Laaraj, et al., 2023).

**Tabela 4:** Composição do embrião da alfarroba. Fonte: (CyberColloids Ltd., s.d.; Laaraj, et al., 2023).

Constituintes	%
Água	7
Lípidos (neutro)	8
Cinzas	6
Proteína bruta	52
Hidratos de carbono	27

Contudo, de acordo com as diretrizes da FAO/OMS, o germe apresenta quantidades significativas de aminoácidos essenciais, como a lisina, leucina, fenilalanina e treonina e quantidades relativamente menores de isoleucina, valina, histidina e triptofano (Tabela 5). Em relação aos aminoácidos não essenciais, o germe é composto por arginina e alanina (Laaraj, et al., 2023).

**Tabela 5:** Composição de aminoácidos do germe da semente de alfarroba. Adaptado de (Laaraj, et al., 2023)

<b>Aminoácidos</b>	<b>g/100 g de proteína</b>
Asp + Glu	40.015
Arg	13.521
Leu	7.375
Lys	7.002
Phe + Tyr	7.591
His	2.962
Phe	3.984
Thr	4.177
Gly	5.301
Ser	5.368
Val	3.743
Ile	3.422
Tyr	3.607
Ala	4.825
Pro	4.315
Trp	1.676
Met + Cys	1.462
Cys	1.290
Met	0.172

### Produção de alfarroba

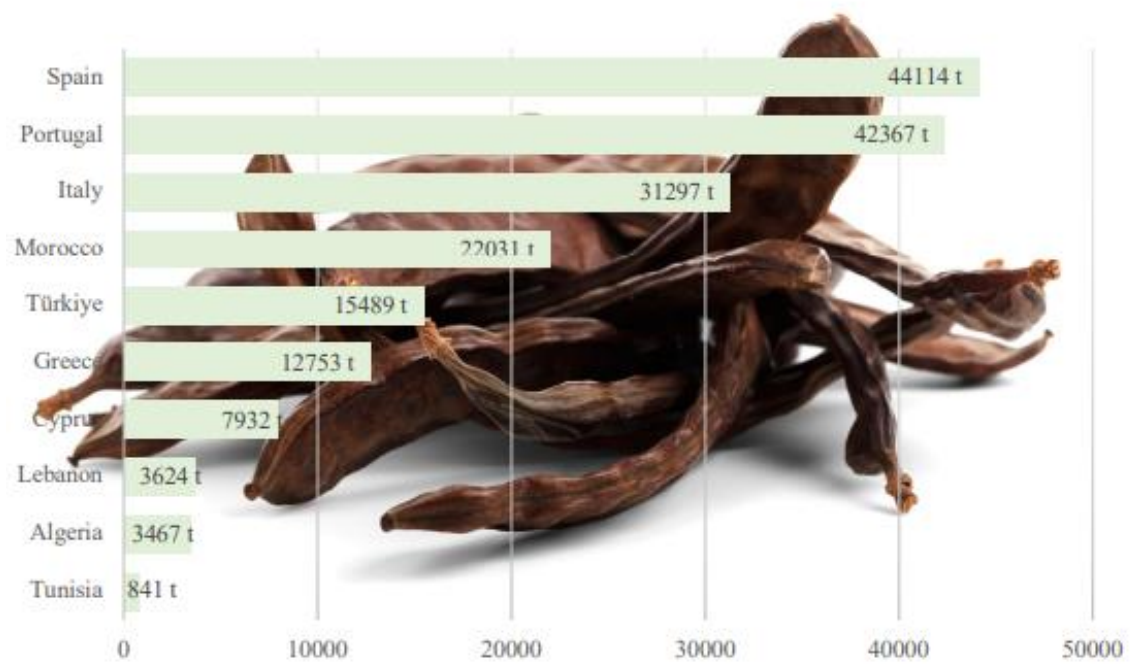
A produção de alfarroba concentra-se essencialmente nos países com clima mediterrâneo e semiárido, sendo utilizada tradicionalmente para a alimentação animal. A área com alfarrobal, bem como a sua produção tem vindo a diminuir drasticamente ao longo dos anos, sendo que nos últimos 70 anos a produção mundial é superior a 600 mil toneladas. Atualmente, no ano de 2020 a produção ronda as 200 mil toneladas com uma ocupação de cerca de 80 mil hectares (Florestas.pt, 2020; Mahdad & Gaouar, 2023). Esta queda considerável, deve-se principalmente ao envelhecimento dos pomares na bacia do mediterrâneo, mas também á ausência de programas de renovação e à instalação de novas plantações (Mahdad & Gaouar, 2023).

Segundo os dados da FAO (Tabela 6), a área total de alfarroba no mundo na última década (2012-2021) é estimada em 74229 hectares, dos quais 66944 hectares (90,18%) estão distribuídos entre Espanha, Portugal, Marrocos e Itália (Mahdad & Gaouar, 2023).

**Tabela 6:** Área cultivada, produção e rendimento dos principais países produtores de alfarroba nos últimos anos (2012-2021). Fonte: FAO; MAPA; ISTAT. Adaptado de: (Mahdad & Gaouar, 2023)

País	Área cultivada (ha)	Produção (t)	Rendimento (t/ha)
Espanha	37330	44114	1,18
Portugal	13599	42367	3,12
Itália	5599	31297	5,59
Marrocos	10415	22031	2,12
Turquia	1911	15489	8,11
Grécia	2580	12753	4,94
Chipre	1254	7932	6,33
Líbano	348	3624	10,41
Argélia	781	3467	4,44
Tunísia	412	841	2,04
<b>Total</b>	<b>74229</b>	<b>183915</b>	<b>2,48</b>

A produção média mundial de alfarroba entre 2012 e 2021 é estimada em 183915 toneladas, e concentra-se principalmente em Espanha (Figura 10), sendo o principal país produtor com 44114 toneladas. Portugal é o segundo maior produtor com 23% da produção mundial, Itália com 17% e Marrocos com 22031 toneladas, 12% da produção mundial.



**Figura 10:** Principais países produtores de alfarroba no mundo na última década (2012-2021). Fonte: (Mahdad & Gaouar, 2023)

A principal região produtora encontra-se na região sul de Portugal, o Algarve, no entanto nos últimos anos a região alentejana tem verificado um acréscimo de área para a produção de alfarroba.

Segundo os dados publicados pelo Sistema de Informação de Mercados Agrícolas (SIMA), a produção de alfarroba nacional, destina-se maioritariamente para exportação, sendo mais procurada sobre a forma de derivados (Tabela 7).

**Tabela 7:** Produção nacional de alfarroba e comercio internacional. Fonte: (SIMA, Semana 13 - 2024).

Ano	2023		2024	
	Importações	Exportações	Importações	Exportações
Alfarroba	tonelada		tonelada	
<b>Inteira</b>	0,3	385,5	238,3	415,2
<b>Derivados de semente</b>	1,9	403,3	2,1	1252,7
<b>Sementes inteiras c/casca</b>	0,0	203,5	1,2	147,9

O preço da alfarroba tem vindo a aumentar ao longo dos anos, contudo têm-se mantido entre os 4,00 e 5,50 euros por cada arroba, que corresponde a 15 quilos. Segundo publicações mais recentes do Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral, o preço médio da alfarroba inteira foi de 1,508 €/kg, no ano de 2023 (Mendonça, et al., 2023).

## Importância da Alfarroba

A alfarrobeira é uma cultura integrante de um pomar tradicional de sequeiro que apresenta resultados positivos, comparando com outras espécies. É uma cultura que revela um elevado potencial ecológico e económico, sendo o fruto muito procurado por indústrias internacionais para utilizações na indústria alimentar e farmacêutica (Loução & Carvalho, 1989).

A transformação da vagem da alfarroba, em produtos comercialmente interessantes é um processo que pode ser dividido em várias etapas.

Primeiramente, a alfarroba é sujeita a um processo de trituração onde a polpa (cerca de 90% do fruto) é separada da semente (10%). Após o processo de trituração, o produto final é peneirado de modo a separar as sementes da polpa/triturado, uma vez que se destinam a processos de transformação diferenciados. Os produtos obtidos são triados de acordo com o tamanho e tipo e classificados de triturado grosso (>2cm), triturado fino/farinha (<1cm) ou as sementes, que é o produto com mais valor comercial.

Dada a diferente aplicabilidade e morfologia da semente face à polpa, a transformação de cada um destes produtos será apresentada, de seguida, separadamente.

### **1. Transformação da semente:**

Do processamento da semente são obtidos dois produtos diferentes: a goma de semente de alfarroba e o gérmen de semente de alfarroba (Mendonça, et al., 2023).

A goma de semente de alfarroba é hidrocoloide espessante natural, largamente conhecido como um aditivo alimentar, E410. É uma farinha branca, com elevada viscosidade, solúvel em água. Este produto é permitido em praticamente todos os alimentos, utilizado em vários produtos alimentares como gelados, sobremesas lácteas,

molhos, coberturas, produtos de panificação e pastelaria, produtos farmacêuticos, xaropes e cosmética, e mesmo em alimentos destinados a alimentação de bebés. Os grãos também podem ser utilizados na indústria alimentar, nas rações de animais, na indústria química (Mendonça, et al., 2023).

O gérmen de semente de alfarroba é uma fração embrionária da semente, rica em proteína (>50%) e por isso um ingrediente altamente nutritivo. É utilizado sobretudo como fonte de proteína vegetal, uma vez que contém aminoácidos essenciais e alguns minerais. O gérmen é utilizado essencialmente na produção de massas alimentares, produtos de pastelaria e padaria sem glúten, produção de aminoácidos para suplementos alimentares e até a produção de produtos vegan. É rico em beta caroteno, pode conferir a cor amarelada, sendo em alguns casos utilizado como substituto do ovo. A indústria das rações animais utiliza os subprodutos do gérmen como fonte de proteína e fibra nas formulações (Mendonça, et al., 2023).

No processo de transformação das sementes de alfarroba, é necessário a purificação da goma de semente de alfarroba. Neste processo são removidas todas as impurezas (casca, gérmen e outros). Após solubilização e filtração da goma, obtendo-se um produto mais transparente e puro. Depois de purificado é sobretudo utilizado no fabrico de algumas especialidades gastronómicas e produtos farmacêuticos e cosméticos (Mendonça, et al., 2023).

## **2. Transformação da polpa/triturado:**

A polpa de alfarroba ou triturados são utilizados nas seguintes indústrias:

Indústrias de rações de animais: é o setor com maior consumo deste produto, devido ao seu elevado teor nutricional. É um alimento rico em açúcares e fibra, sendo utilizado como ingrediente nas rações de desmame de bovinos, suínos e equídeos. Em animais adultos é usado para formulações de misturas *premium*, sobretudo nos equídeos. Nos roedores é utilizado como ingrediente nas rações e como guloseima pelo seu sabor adocicado (Mendonça, et al., 2023).

Indústrias de produção de farinha de polpa de alfarroba torrada: a farinha de polpa de alfarroba torrada é obtida através da torrefação e moagem da polpa. Apresenta uma coloração castanha e um cheiro e sabor, semelhante ao cacau. Esta farinha foi o primeiro produto a ser produzido pela *Indústria Fareense*, em 1940, tendo

sido produzido para substituir o cacau, uma vez que nesta época a importação de cacau não era possível devido à II Guerra Mundial. Atualmente, o consumo de farinha de alfarroba torrada tem vindo a aumentar, devido ao aumento da procura de produtos de origem vegetal para alimentação humana. É utilizada essencialmente na panificação, pastelaria, fabrico de chocolate, recheios e barrinhas e suplementos para desportistas (Mendonça, et al., 2023).

Indústrias de produção de extrato de polpa de alfarroba ou melaço de alfarroba:  
o extrato ou melaço é um produto obtido por extração aquosa e concentração dos açúcares da polpa de alfarroba. Contém uma elevada concentração de açúcares (>50%), sobretudo sacarose, mas também glucose, frutose e pinitol. É um produto muito consumido em países árabes, pelo seu elevado teor calórico (sobretudo durante o Ramadão). Em Portugal, é utilizado como um dos auxiliares da torrefação do café, uma vez que ajuda a conferir um sabor mais agradável e a formar espuma mais cremosa. O extrato também pode ser utilizado em bebidas (licores, cerveja) e na produção de alguns produtos de elevado valor comercial para a indústria farmacêutica (como o Pinitol) (Mendonça, et al., 2023).

### Produção de plantas de alfarrobeira

A alfarroba pode ser propagada por sementes, enxertia (estacas) e por micropropagação. Contudo, a forma mais comum de obter plantas de alfarrobeira é através da germinação da semente ou por enxertia. Todavia, os indivíduos obtidos por germinação de semente têm uma variabilidade morfológica muito elevada, uma vez que são geneticamente diferentes da planta mãe e resultam da recombinação genética do progenitor feminino e masculino (Correia, Guerreiro, & Bouça, 2017).

Para o processo de germinação é necessário retirar as sementes das vagens maduras e fazer uma sementeira, preferencialmente no início da primavera. As sementes apresentam tegumentos muitos duros e para que consigam germinar, requerem escarificação (processos mecânicos, água quente, ácidos, reguladores de crescimento, entre outros) de modo a se tornarem mais permeáveis para que o embrião se consiga desenvolver (Batlle & Tous, 1997).

Segundo, os ensaios realizados por Batlle e Tous (1997), as sementes devem ser imersas em água à temperatura ambiente por 15 dias, ou em água a ferver durante 10

minutos, ou em ácido sulfúrico ou em ácido giberélico. Após esse tratamento devem ser semeadas em tabuleiros ou em vasos e mantidas a uma temperatura entre os 20°C a 30°C, sendo a temperatura ótima de germinação de 25°C - 27°C. Os tabuleiros ou vasos devem geralmente conter solo, húmus, perlite e turfa em várias proporções e são geralmente corrigidos com areia para melhorar a drenagem e a estrutura (Batlle & Tous, 1997).

Contudo, a maior parte das plantas provenientes do processo de germinação são plantas com flor masculina, também designados de “bravos” ou de “franco”. Em relação às plantas femininas de origem seminal, estas são menos frequentes e apresentam uma produção de fruto de péssima qualidade. As árvores masculinas, só são passíveis de ser identificadas quando surgem as primeiras inflorescências, na qual é possível identificar o género pela coloração da mesma. (Correia, Guerreiro, & Bouça, 2017).

Tendo em conta todos estes constrangimentos, a enxertia tem sido amplamente utilizada, com o intuito de obter plantas produtoras de alfarroba de boa qualidade. Assim, as plantas masculinas, devem ser enxertadas com variedades femininas. Estas enxertias podem ser realizadas no campo ou em viveiro, de modo a obter plantas produtoras (Correia, Guerreiro, & Bouça, 2017).

As árvores produtoras são enxertadas deixando-se 5% de indivíduos masculinos (alfarrobeirões) regularmente distribuídos no terreno, sendo determinantes no sucesso da polinização. A enxertia é efetuada em porta-enxertos com diâmetros de 2 a 5 cm, na Primavera ou no fim do Verão/princípio do Outono e à razão de 3 a 4 enxertos/árvore, bem distribuídos pela copa e provenientes de plantas femininas. Uma correta enxertia é um ponto chave para a rápida produção dos pomares, assim deve-se escolher o período do ano mais adequado para a sua realização, de preferência na primavera, nos meses entre maio e junho. Trata-se de uma operação a realizar entre os 1.º e o 4.º ano de idade da cultura. A alfarrobeira frutifica em ramos com mais de três anos de idade (UTAD - Jardim Botânico, 2024).

Atualmente, vários viveiristas vendem as plantas já enxertadas, facilitando o produtor, contudo, o seu custo é mais elevado. Normalmente, as técnicas de enxertia utilizadas são por borbulha ou chapa. Na Figura 11 encontra-se demonstrado um exemplo de uma enxertia por chapa.



**Figura 11:** Porta-enxerto enxertado em viveiro.  
Fonte: (Correia, Guerreiro, & Bouça, 2017)

A micropropagação da alfarroba utilizando tecidos jovens e adultos tem sido realizada por vários autores ao longo dos anos ( (Romano, Barros, & Martins-Loução, 2001) (Gonçalves, Correia, Martins-Loução, & Romano, 2004) (Custódio, Carneiro, & Romano, 2004) (Custódio, Martins-Loução, & Romano, 2004) (Brugaletta, Malfa, Gentile, Almeida, & Romano, 2009) (Hakim, Islam, Mamun, & Khan, 2010) (Nia, Abid, & Belkoura, 2021). O Instituto de Investigação e Tecnologias Agroalimentares da Catalunha (IRTA) comparou a performance de plantas micropropagadas com plantas provenientes de viveiros e instaladas em campo e comprovou que as plantas micropropagadas tiveram um período vegetativo mais prolongado, de 4 anos após a plantação com crescimento rápido, contudo, apresentaram um 1 ano de atraso na produção de vagem e no desenvolvimento do sistema radicular, necessitando da colocação de tutor, comparativamente a plantas oriundas de viveiros, e produzidas por via seminal (Batlle & Tous, 2013).

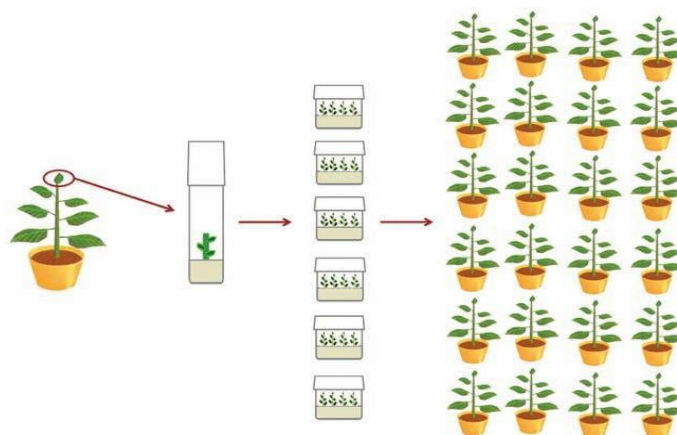
### Micropropagação *in vitro*

A micropropagação é um método de propagação vegetativa utilizado em diversas espécies vegetais. Consiste no cultivo de tecidos vegetais, extraídos de uma planta mãe, em boas condições fitossanitárias, para posteriormente serem cultivados *in vitro* sob condições assépticas (George, Hall, & Klerk, 2008). Um dos fatores decisivos para este método de propagação é a escolha do meio de cultura mais adequado. Este é constituído por sais minerais (macronutrientes e micronutrientes), fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento, que são responsáveis pela divisão celular da cultura (George, Hall, & Klerk, 2008).

Este método apresenta várias vantagens como a necessidade de pouca quantidade de material vegetativo, produção uniforme, mantendo as características genéticas da planta mãe, possibilidade de armazenagem por longos períodos, sendo realizado em condições assépticas e controladas. Contudo, a necessidade de mão-de-obra qualificada e a dificuldade da desinfeção das plantas, podem ser classificadas como desvantagens (George, Hall, & Klerk, 2008).

A micropropagação é utilizada com o intuito de produzir um elevado número de plantas com o mesmo genoma, com as características desejadas e isentas de infeções, produzindo plantas mais resistentes e mais fiáveis, preservando a espécie (Figura 12). Para a micropropagação desta espécie, normalmente, são utilizados meristemas ou ápices apicais, uma vez que permitem a regeneração de plantas completas e apresentam baixos níveis de variabilidade genética, garantindo estabilidade genotípica dos clones. As técnicas de micropropagação mais frequentes na propagação de plantas são a embriogénese somática, a organogénese e a proliferação de rebentos (George, Hall, & Klerk, 2008).

O processo de micropropagação é composto por cinco fases: seleção da planta mãe e preparação do segmento; estabelecimento da cultura em condições assépticas; multiplicação; enraizamento e aclimatização (George, Hall, & Klerk, 2008).



**Figura 12:** Processo da técnica de micropropagação.  
Adaptado de (Cançado, et al., s.d.)

**1. Fase 0 – Seleção da planta mãe e preparação do segmento:**

Nesta fase está envolvido todo o processo de manipulação do material vegetal, desde a recolha até ao estabelecimento *in vitro*. Nesta etapa estão incluídos os pré-tratamentos do material vegetal e a desinfeção, sendo fundamental o controlo da idade, estado fisiológico e sanitário da planta mãe, para que as seguintes fases ocorram com o maior sucesso.

**2. Fase 1 - Estabelecimento da cultura em condições assépticas:**

Nesta fase o objetivo é obter uma cultura asséptica do material anteriormente selecionado, livre de contaminantes e capaz de apresentar crescimento. Nesta fase são selecionados meios de cultura específicos para cada cultura, consoante o objetivo pretendido.

**3. Fase 2 – Multiplicação:**

O processo de multiplicação tem como objetivo conseguir propagar sem perder a estabilidade genética do material vegetativo. Nesta etapa é importante controlar as condições físicas e ambientais, como a luz e temperatura, às quais os rebentos vão estar expostos envolvidas na câmara de crescimento das plantas.

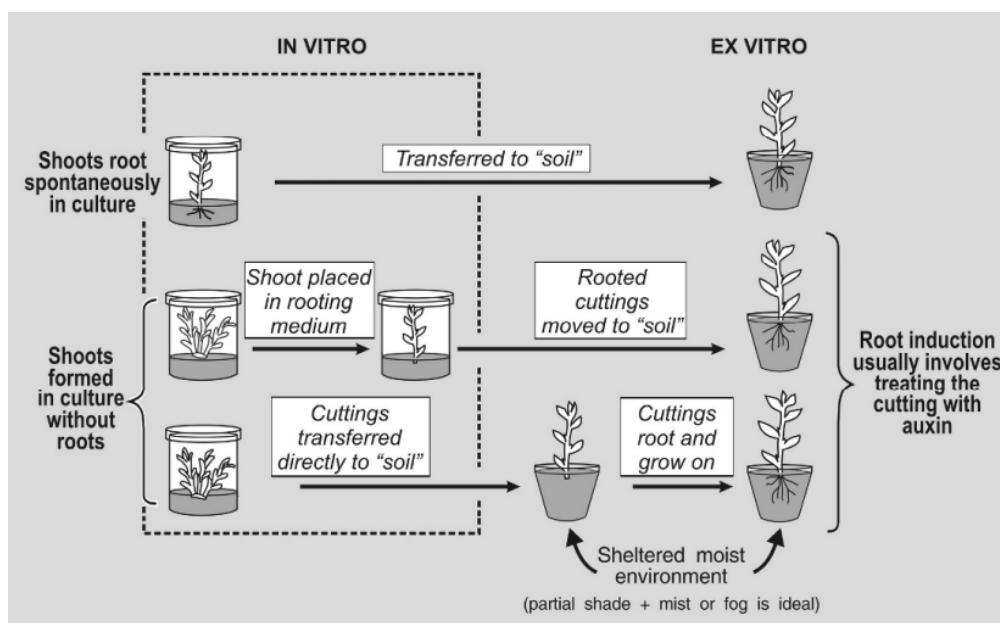
#### 4. Fase 3 – Enraizamento:

Os rebentos oriundos da fase de multiplicação, são pequenos, frágeis e incompletos, não sendo possível e eficaz a sua transferência direta para o solo ou para um substrato. Assim nesta fase, são efetuados alguns procedimentos para induzir a produção de raízes adventícias e também pode ocorrer o alongamento dos caules.

#### 5. Fase 4 – Aclimatização:

A aclimatização é um processo em que as plantas são transferidas da câmara de cultura, com o intuito de se adaptarem e sobreviverem em condições autotróficas. Nesta fase é importante controlar todos os fatores físicos, como a luz, humidade e temperatura, que devem ser gradualmente alterados a fim de permitir à planta a adaptação às condições naturais, garantindo a sua atividade fotossintética.

Todo o processo de micropropagação encontra-se apresentado na Figura 13.



## A) Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são compostos importantes, no crescimento e na qualidade do desenvolvimento dos sistemas de cultura de tecidos. Estes compostos podem ser naturalmente produzidos, em baixas quantidades, pelos tecidos vegetais de forma endógena, ou podem ser obtidos de forma sintética.

Estas substâncias apresentam um papel de reguladores no crescimento e desenvolvimento da planta. Existem várias substâncias de crescimento vegetal, podendo ser agrupadas em cinco grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Sendo o grupo das auxinas, as citocininas e as giberelinas os grupos de reguladores de crescimento mais utilizados e com mais aplicações (George, Hall, & Klerk, 2008).

As auxinas têm como principal função a indução do alongamento celular, diferenciação de raízes em culturas *in vitro* e o alongamento de entre nós. As auxinas usadas com maior frequência são: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indole-3-butírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4D) (George, Hall, & Klerk, 2008).

As citocininas constituem o grupo de reguladores determinantes para a divisão celular, a quebra de dominância apical, a indução e proliferação de gomos axilares e diferenciação de gomos adventícias. Os reguladores mais utilizados *in vitro* são: kinetina (KIN), zeatina (citocinina natural), 6-benzilaminopurina (BAP) e 6-(g,g- dimetilalimino) purina (2iP) (George, Hall, & Klerk, 2008).

As giberelinas agem no crescimento de órgãos, como o alongamento de caule e de raízes, assim como no desenvolvimento de embriões somáticos e no florescimento, a mais utilizada é o ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (George, Hall, & Klerk, 2008).

O ácido abscísico atua como inibidor de crescimento e indutor da maturação de embriões. E por fim o etileno, é um gás envolvido no amadurecimento dos frutos, na senescência e na abscisão das folhas. Este gás está presente na atmosfera em concentrações muito baixas e é produzido nos tecidos vegetais vivos (George, Hall, & Klerk, 2008).

## Objetivos

Tendo em conta o enquadramento bibliográfico apresentado, este trabalho teve como objetivos: 1) otimizar a micropropagação de alfarrobeira em dois meios de cultura, e 2) quantificar o sucesso diferentes tratamentos de pré-germinação e meios de cultura na germinação de sementes de alfarroba. Para isso foram quantificados o número de segmentos coletados da planta mãe, número de calos e lenticelas por segmento, número de rebentações por segmento, número de contaminações e coloração dos mesmos. Foi ainda quantificada a taxa de germinação das sementes de alfarroba nas diferentes condições.

## Material e métodos

Neste capítulo descreve-se como foi realizada a micropropagação *in vitro*, com referência ao método de desinfeção, meio de propagação utilizado e o procedimento de germinação das sementes.

### 1. Micropropagação de material vegetal *in vitro* - estabelecimento:

As plantas mãe selecionadas para este ensaio foram instaladas em vaso, na estufa da GreenClon, em Cantanhede, distrito de Coimbra. Contudo, este material genético foi cedido por um viveiro da região do Algarve, Viveiro Casa Branca, especializado na multiplicação e comercialização de árvores de alfarroba enxertadas com diversas variedades. Foi utilizada a variedade *Mulata*, (Figura 14), que apresenta uma boa produtividade e com importância comercial.



**Figura 14:** Vaso com uma das alfarrobeiras da variedade *Mulata* localizadas na *GreenClon*.

Antes de se iniciar a colheita do material genético as árvores foram tratadas com *TOCSIN WG*, um fungicida sistémico com atividade preventiva e curativa, com aplicação foliar a uma concentração de 1g/L. Após 48 horas desse tratamento, foram colhidos os rebentos mais juvenis existentes nas plantas (Figura 15), que foram colocados em frascos de colheita devidamente desinfetados e cheios com água destilada esterilizada com um antioxidante. O antioxidante utilizado é composto por uma solução de ácido cítrico (1g/L) com ácido ascórbico (1g/L), esterilizada. Esta solução foi utilizada numa proporção 50/50 com a água destilada esterilizada.



**Figura 15:** Rebentos colhidos para o ensaio.

Este ensaio foi realizado em duas datas diferentes, sendo a primeira colheita realizada no dia 18 de abril de 2024 e a segunda colheita no dia 18 de julho de 2024. Nestes dias a temperatura ambiente registada foi de 25°C e 30°C, respetivamente, com uma humidade relativa de 45% e 40%, respetivamente. A temperatura foi obtida com recurso a um medidor de temperatura e humidade instalado na estufa.

Posteriormente, foram aplicados os protocolos de desinfeção e estabelecimento *in vitro*. Para a realização do protocolo de desinfeção foram utilizadas duas soluções, álcool etílico a 70% e hipoclorito de sódio a 30% com duas gotas de detergente da loiça comercial, sendo efetuado o seguinte procedimento:

1. Os frascos de colheita com o material vegetal foram colocados na câmara de fluxo laminar (da marca BioBase);
2. A solução de água destilada esterilizada e antioxidante foi descartada dos frascos procedeu-se à lavagem do material com água destilada esterilizada. Este procedimento foi repetido três vezes;
3. Os frascos com o material vegetal foram cheios com a solução de álcool etílico a 70% e sujeitos a agitação, durante 1 minuto e 30 segundos;
4. Após o tempo decorrido, a solução foi descartada e efetuou-se a lavagem com água destilada esterilizada. Este procedimento foi repetido três vezes;
5. Os frascos foram cheios com a solução de hipoclorito de sódio a 30% com duas gotas de detergente, e agitados durante dois minutos;
6. Por fim, verteu-se a solução e lavou-se 3 vezes com água destilada esterilizada, terminando o procedimento de desinfeção.

Após o procedimento acima mencionado, os rebentos foram cortados, em segmentos, sendo colocados em tubos de ensaio (Figura 16) com meios de cultura. O segmento corresponde a um fragmento de tecido vegetal vivo ou órgão. Este fragmento pode ser proveniente de folhas, raiz, caule ou de qualquer tecido que responda às condições de indução no meio de cultura. Neste ensaio os segmentos utilizados foram rebentos apicais mais juvenis existentes nas plantas mãe (Figura 15).

Foram utilizados dois meios de cultura que diferiram na concentração de um dos reguladores de crescimento (6-Benzilaminopurina – BAP) como descrito na Tabela 8. O BAP é um regulador de crescimento pertencente ao grupo das citocininas, que influencia a divisão celular, a quebra de dominância apical, a indução e proliferação de gomos axilares. Neste ensaio foi utilizada uma concentração de 0,5 mg/L e de 1 mg/L. Em relação ao regulador de crescimento denominado de ácido naftalenoacético (ANA), este foi utilizado numa concentração igual nos dois meios de cultura em estudo (0,4 mg/L), tendo como principal função a indução do alongamento celular.

**Tabela 8:** Meios de cultura utilizados.

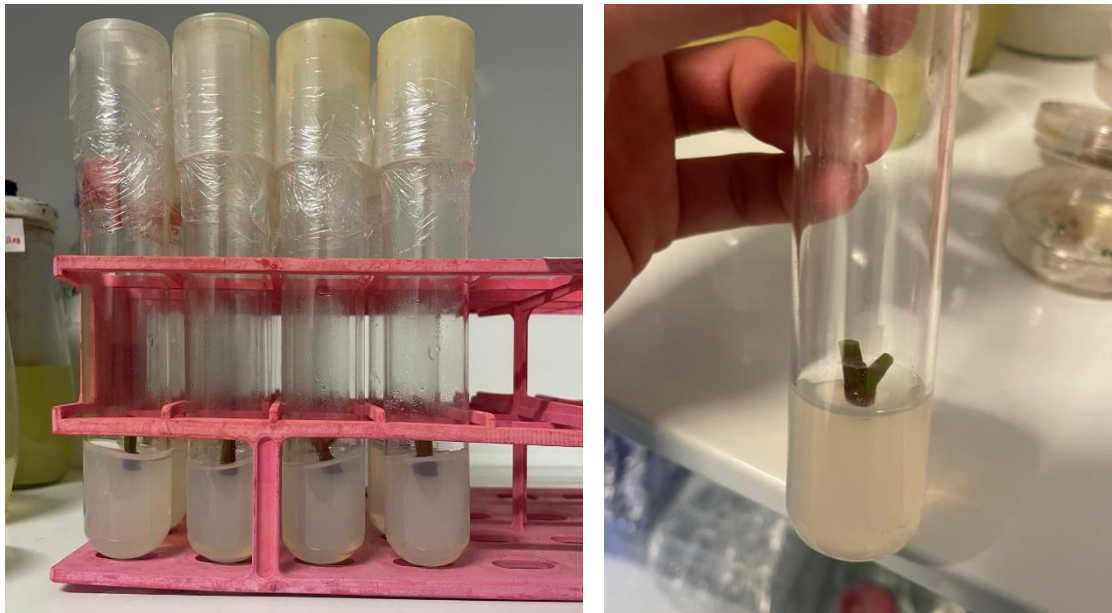
Tipo de Meio de cultura		<i>Meio 1</i>	<i>Meio 2</i>
		Murashige & Skoog (1962) - MS	Murashige & Skoog (1962) - MS
Hormonas	BAP	0,5 mg/L	1,0 mg/L
	ANA	0,4 mg/L	0,4 mg/L
Fonte de Carbono		Sacarose – 30 g/L	Sacarose – 30 g/L
pH		5,80	5,80

Em seguida, os segmentos ficaram em regime de obscuridade durante 8 dias, para reduzir possíveis libertações fenólicas. Após este período, foram colocados em regime de meia luz, por 15 dias e posteriormente sujeitos a um fotoperíodo 16H/8H (luz/escuro), a uma temperatura constante de 25° graus  $\pm$  1°C, ao longo de todo o procedimento.

A contabilização de crescimentos/rebentações, presença de calos e contaminações foram registadas assim que os segmentos foram movidos para a luz, em ambos os ensaios.

O calo é uma acumulação de células indiferenciadas com um crescimento desorganizado, que pode apresentar um grau de diferenciação. No ensaio, os calos localizaram-se unicamente na base do segmento, ou seja, na superfície que se encontrava em contacto com o meio de cultura. Em relação às lenticelas, são órgãos de arejamento encontrados nos caules, de formato poroso, encontravam-se localizadas ao longo de todo o segmento, sendo identificadas por acumulações de coloração branca.

As contaminações registadas tiveram origem em fungo, tendo sido os segmentos retirados do ensaio quando apresentavam crescimento de micélio.



**Figura 16:** Segmentos de alfarrobeira, após o procedimento de estabelecimento.

## 2. Germinação de sementes:

As sementes (Figura 17) utilizadas neste ensaio foram cedidas por um produtor da região do Algarve, tendo sido colhidas no ano de 2022, nesta mesma região. A variedade utilizada neste procedimento, foi também a *Mulata*.



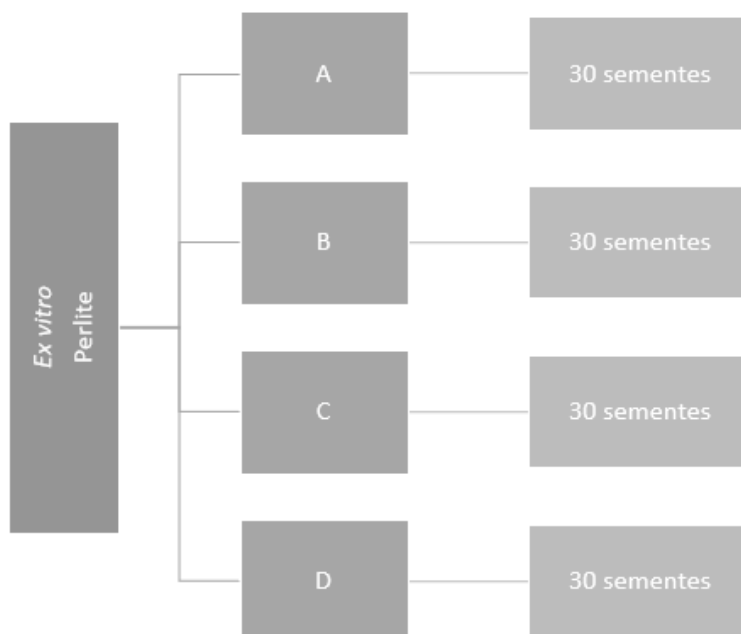
As sementes foram sujeitas a quatro tratamentos (A, B, C e D):

- A.** Imersão das sementes em água destilada esterilizada a uma temperatura de 100°C durante 10 minutos e com posterior imersão em água destilada esterilizada à temperatura ambiente por 48H.
- B.** Imersão das sementes em GA<sub>3</sub> (25 mg/L) por 24H.
- C.** Imersão das sementes em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (37%) por 30 minutos, com posterior lavagem com água corrente para retirar o ácido.
- D.** Controlo: imersão das sementes em água destilada esterilizada à temperatura ambiente durante 48H.

No Esquema 1 está representado o protocolo utilizado na vertente *in vitro* e no Esquema 2 *ex vitro*.



**Esquema 1:** Procedimento utilizado na germinação de sementes na vertente *in vitro*.



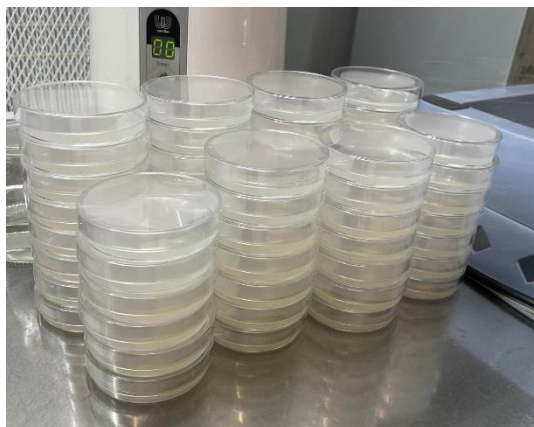
**Esquema 2:** Procedimento utilizado na germinação de sementes na vertente *ex vitro*.

Após a realização dos tratamentos (A, B, C e D), as sementes foram colocadas a germinar em três condições diferentes: *in vitro* com meio 1 ou meio 2 e *ex vitro* com perlite. Este desenho experimental foi repetido duas vezes, em datas diferentes. A primeira repetição foi realizada no dia 4 de abril de 2024 e a segunda repetição foi realizada no dia 4 de julho de 2024. Para cada repetição foram utilizadas 15 ou 30 sementes por tratamento, como representado no Esquema 1 e Esquema 2, sendo que no ensaio *in vitro*, as 30 sementes foram repartidas pelos dois meios de cultura utilizados (Tabela 8).

Para o ensaio *in vitro* as sementes após os tratamentos, acima mencionados, foram sujeitas a um procedimento de desinfeção. Primeiramente, foram colocadas numa câmara de fluxo laminar e seguidamente foram submersas em álcool a 70% por dois minutos, mantendo sempre a agitação, de forma que todas as superfícies entrassem em contacto com o álcool. Após o tempo decorrido, foi feita a lavagem com água destilada esterilizada, três vezes, e as sementes foram novamente submersas, mas desta vez com hipoclorito de sódio a 30%, durante dois minutos, mantendo também a

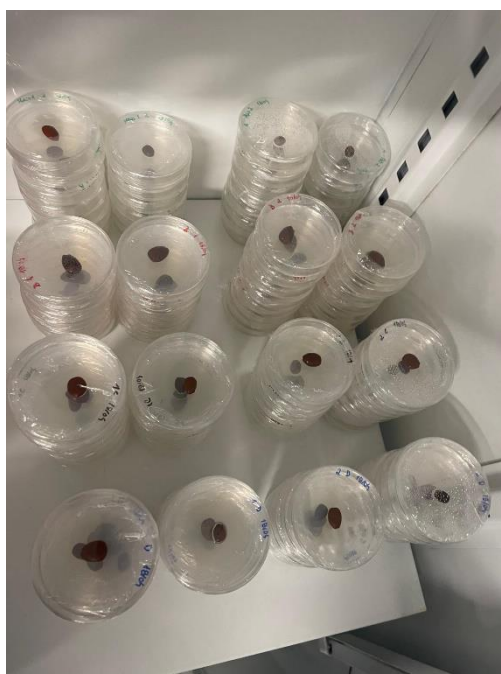
agitação. Por fim, as sementes foram lavadas com água destilada esterilizada, três vezes, finalizando o procedimento.

Após o procedimento de desinfecção, as sementes foram distribuídas em placas de *Petri* com 2 tipos de meio de cultura, meio 1 e 2 (Figura 18), referenciado anteriormente na Tabela 8.



**Figura 18:** Placas de *Petri* com os meios de cultura, 1 e 2.

Cada placa de *Petri* levou unicamente 1 semente, (Figura 19), tendo sido colocadas em regime de obscuridade com uma temperatura constante de 25° graus  $\pm$  1°C, até observar a germinação das sementes.



**Figura 19:** Placas de *Petri* com as sementes, após o procedimento de desinfecção.

No ensaio *ex vitro*, as sementes foram colocadas em recipientes plásticos com perlite (Figura 20). Neste ensaio não se efetuou a desinfeção acima mencionada, uma vez que a perlite e recipientes utilizados não se encontravam esterilizados.



**Figura 20:** Tabuleiros com perlite ensaio *ex vitro*.

Tal como nos tratamentos *in situ*, as sementes foram mantidas nos recipientes em regime de obscuridade com uma temperatura constante de 25° graus  $\pm$  1°C.

Para ambos os ensaios, *in vitro* e *ex vitro*, foram registadas diariamente o número de sementes germinadas. Considerou-se a semente como germinada, quando apresentava o primeiro crescimento da raiz (Figura 21).



**Figura 21:** Semente de alfarroba a iniciar a germinação.

## Análise de dados e tratamento estatístico

A análise estatística dos dados recolhidos foi realizada com recurso ao programa GraphPad Prism 9, com a expressão com a média  $\pm$  DP. Tendo sido submetido a análise de variâncias (ANOVA), seguida por um teste de comparações múltiplas, o teste de Tukey.

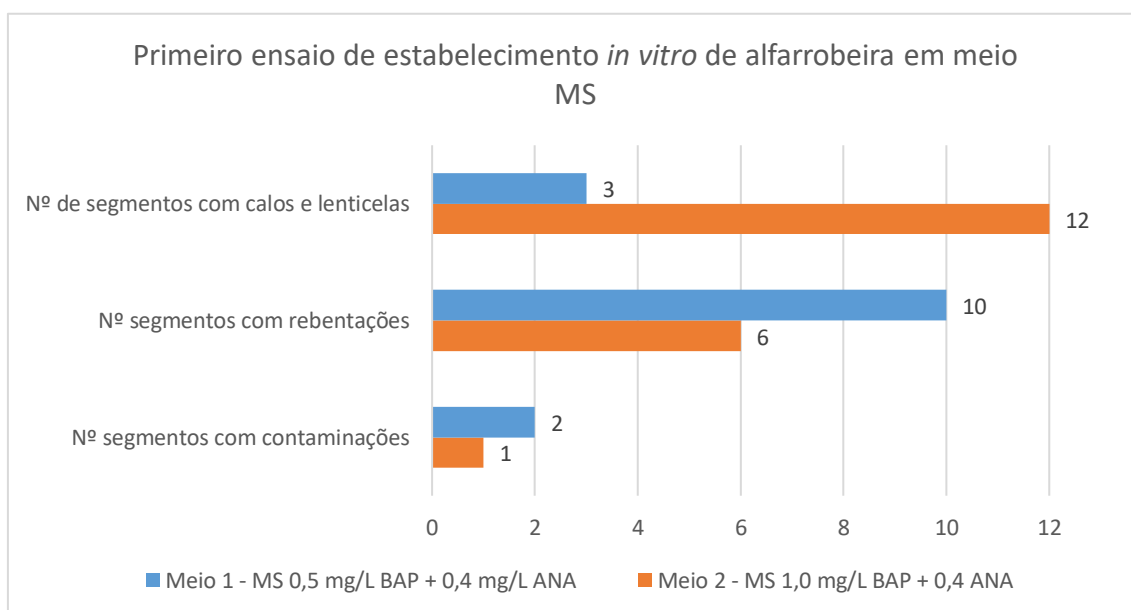
## Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. Dada a grande diferença dos dois métodos de propagação utilizados (*in vitro* e *ex vitro*) este capítulo encontra-se assim subdividido, para uma mais fácil compressão dos resultados.

### 1. Micropropagação de material vegetal *in vitro*:

O material vegetativo utilizado no ensaio foi recolhido das plantas localizadas na Empresa GreenClon, como descrito no capítulo material e métodos. Para o ensaio apenas foi utilizado uma variedade, *Mulata*, uma vez que não houve cedência de mais material vegetativo para diversificar o estudo. Visto que a alfarrobeira, é uma espécie com crescimento lento, apesar da recolha de material jovem e vigoroso, este tipo de crescimento por parte da planta foi um ponto negativo em todo o processo, reduzindo o número e desenvolvimento dos segmentos disponíveis para o ensaio.

O primeiro ensaio, foi realizado a 18 de abril de 2024, com uma temperatura ambiente de 25°C e uma humidade relativa de 45%. Após a desinfeção e corte dos rebentos, foi possível estabelecer em tubo de ensaio 26 segmentos, sendo 13 segmentos colocados no meio 1, e os restantes 13 no meio 2. Os resultados obtidos para o primeiro ensaio encontram-se apresentados no Gráfico 1.

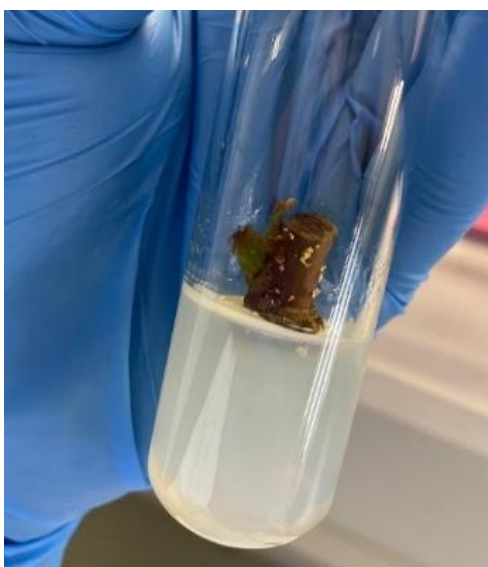


**Gráfico 1:** Primeiro ensaio de estabelecimento de alfarroba.

Analisando o Gráfico 1 pode-se afirmar que o processo de desinfecção foi eficaz dada a reduzida taxa de contaminação, que varia 15% e os 8%, para o meio 1 e para o meio 2, respetivamente. No entanto, o processo de desinfecção é possível de ser ajustado para reduzir essa taxa para valores próximos de 0%. Salieta-se que a taxa de contaminação, também pode estar associada às condições ambientais sentidas no dia da colheita.

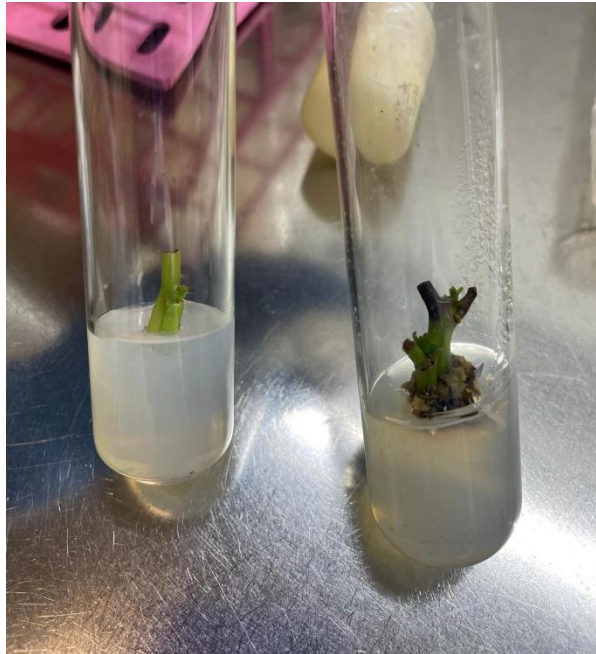
Em relação ao crescimento de rebentações, o meio 1 destaca-se, sendo o meio que apresenta um maior número de crescimentos e por conseguinte é o meio que apresenta menos calos e lenticelas nos segmentos em tubo de ensaio, enquanto o meio de cultura 2, apresentou em 12 dos segmentos a presença de calos e lenticelas (Figura 22). Isto deve-se ao facto de este meio de cultura ter uma concentração mais elevada de regulador de crescimento, BAP (6-Benzilaminopurina), a uma concentração de 1 mg/L, o que pode promover o aparecimento deste tipo de estruturas.

No entanto, o estudo publicado por Eid Mohamed et al. 2014, contrariam os resultados obtidos, neste caso os resultados com mais crescimentos por segmento foram o meio de cultura que apresentava uma concentração mais elevada de BAP (1,0 mg/L). Sendo que a concentração de BAP desencadeou a diminuição significativa no número de crescimentos e rebentações, contradizendo mais uma vez os resultados obtidos (Deen, El-Sayed, El-Rahman, El-Sayed, & Hegazi, 2014).



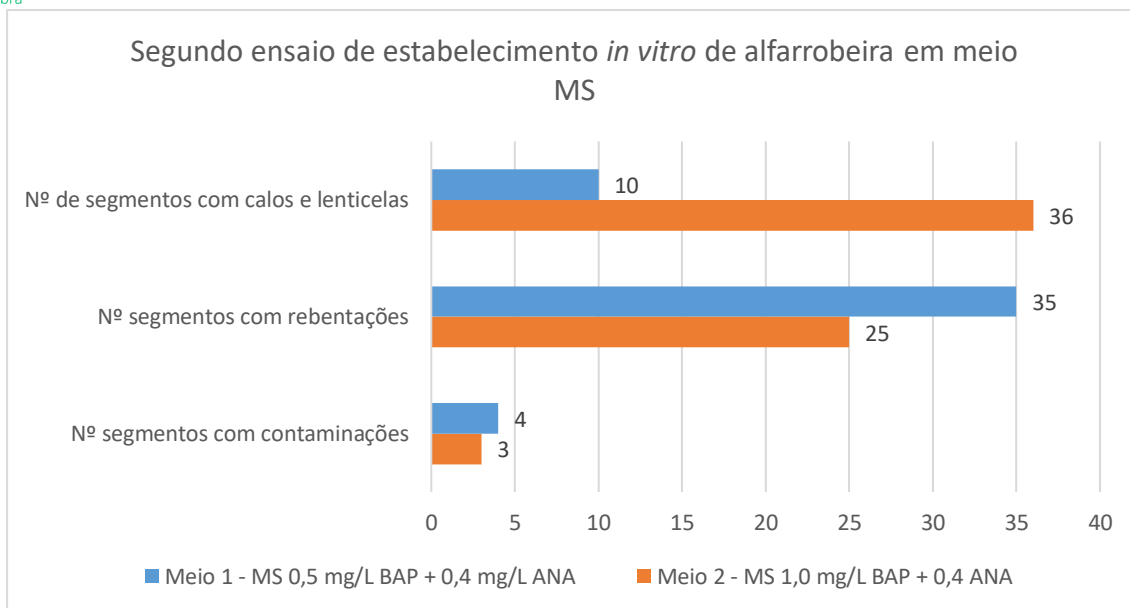
**Figura 22:** Segmento de alfarrobeira com lenticelas no meio 2.

Avaliando a cor dos segmentos colocados nos diferentes meios, também é possível afirmar que os segmentos do meio 1 apresentam uma coloração verde mais claro, aparentemente mais saudáveis, comparativamente aos segmentos presentes no meio 2 que parece apresentar algumas zonas necrosadas (Figura 23).



**Figura 23:** Comparação da coloração dos segmentos no meio 1 (à esquerda) e no meio 2 (à direita).

O segundo ensaio, foi realizado a 18 de julho de 2024, com uma temperatura ambiente de 30°C e uma humidade relativa de 40%. Neste ensaio foi possível obter mais segmentos após a desinfeção e corte, somando um total de 80 segmentos, sendo 40 segmentos colocados no meio 1, e os restantes 40 no meio 2. Os resultados obtidos para o primeiro ensaio encontram-se apresentados Gráfico 2.



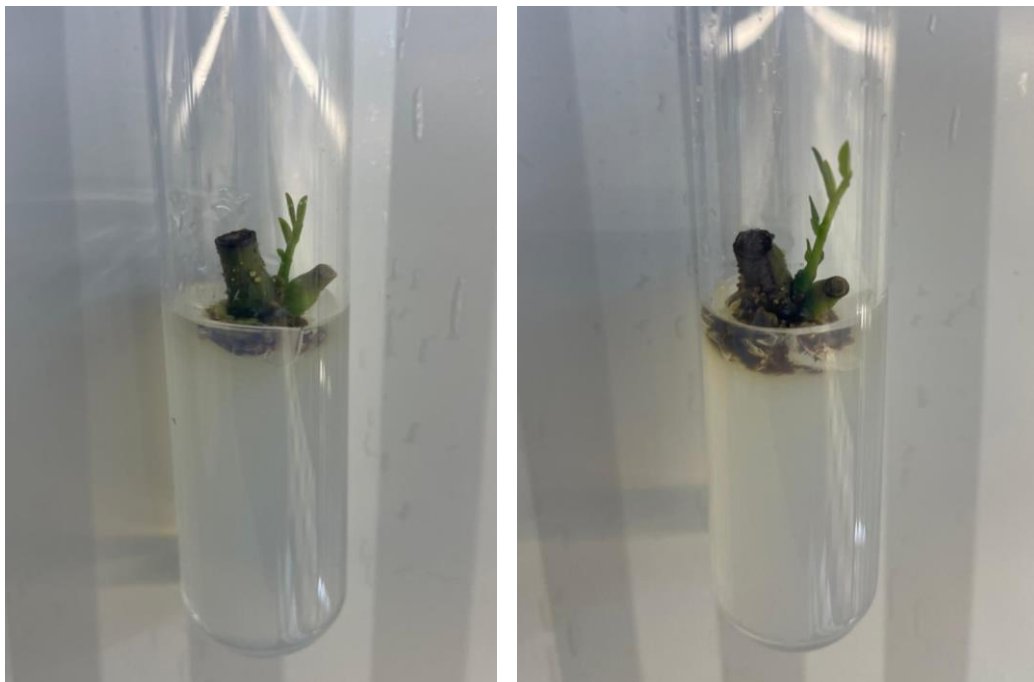
**Gráfico 2:** Segundo ensaio de estabelecimento de alfarroba.

No segundo ensaio de estabelecimento *in vitro*, a taxa de contaminação foi sensivelmente mais baixa, variando entre os 10% e os 8%, para o meio de cultura 1 e 2, respetivamente. Apesar de não tendo havido alteração do procedimento de desinfeção do primeiro ensaio para o segundo ensaio, as condições ambientais, no dia da colheita foram diferentes, sendo a humidade relativa mais baixa comparativamente ao primeiro ensaio. Desta forma fica clara a importância das condições meteorológicas no dia da colheita do material vegetal, sendo um fator a ter em conta. Além disso, o facto de se ter muito menos réplicas no primeiro dia de colheita também pode influenciar a ordem de grandeza desta taxa, o que mais uma vez reforça a importância do estado da planta mãe aquando da colheita (Batlle & Tous, 1997).

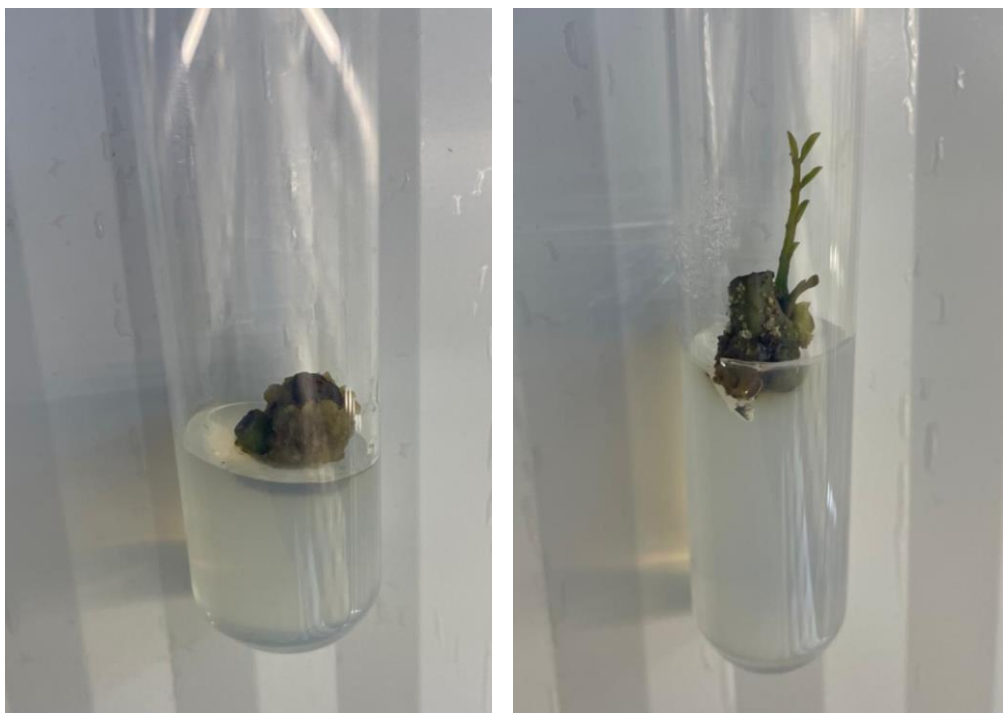
Em relação ao crescimento de rebentações, o padrão observado no primeiro ensaio mantém-se, com o meio 1 continuando a ser significativamente melhor comparativamente ao meio 2. Ainda assim, a proporção de rebentações por segmento é ligeiramente maior no segundo ensaio do que no primeiro (primeiro vs. segundo ensaio: Meio 1 – 90,9% vs. 97,2%; Meio 2 – 50,0% vs. 67,6%). Analisando os resultados do número de calos e lenticelas presentes nos segmentos, o meio 2 é mais uma vez onde se evidencia uma maior presença, sendo neste ensaio registado em 36 dos 40 segmentos totais. Contudo em termos de proporção temos, percentagens semelhantes

entre ensaios (primeiro vs. segundo ensaio: Meio 1 – 27,3 vs. 27,8%; Meio 2 – 100 vs. 97,3%).

Nas Figura 24 e Figura 25 é possível identificar a presença de calos e lenticelas apenas presentes no meio 2, comparativamente ao meio 1. Analisando a coloração, neste segundo ensaio o comportamento manteve-se semelhante ao primeiro. O meio 1 apresenta crescimentos com uma coloração verde mais claro, no crescimento novo, como no segmento inicial, aparentando estarem mais saudáveis.

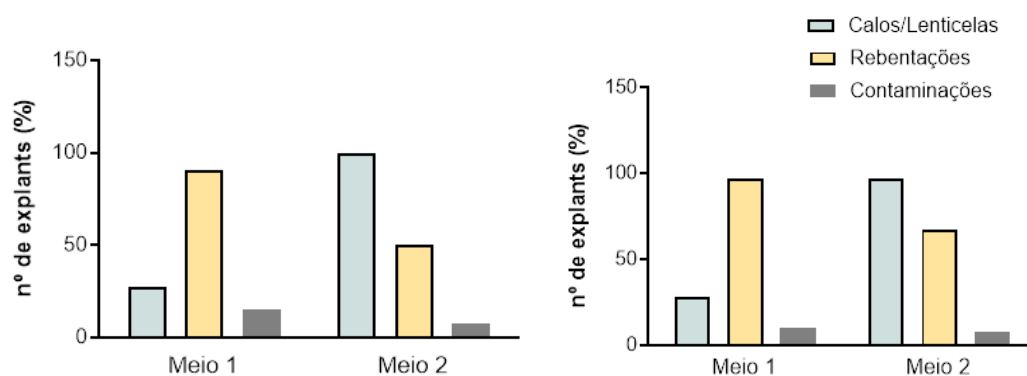


**Figura 24:** Segmentos no meio de cultura 1. Na imagem da esquerda e da direita é possível verificar que os segmentos apresentam uma coloração verde mais clara e um crescimento maior, comparativamente ao meio de cultura 2.



**Figura 25:** Segmentos no meio de cultura 2. Os segmentos apresentam uma coloração verde mais escura e um crescimento menor. Na imagem à esquerda encontra-se um segmento com uma elevada quantidade de calo na base. Na imagem à direita encontra-se um segmento com crescimento, mas com lenticelas espelhas ao longo do caule.

Recorrendo ao programa GraphPad 9 e aplicando o método de análise estatística ANOVA, foi possível retirar o Gráfico 3.



**Gráfico 3:** Resultados da análise estatística ANOVA aos resultados dos estabelecimentos *in vitro*. À direita, é referente ao primeiro ensaio e à esquerda encontra-se o segundo ensaio.

Analisando o Gráfico 3, não existem diferenças significativas entre os meios de cultura e as variáveis em estudo. Esta inexistência devesse à amostragem reduzida para a elaboração dos ensaios. Ressalvo, que as tabelas com os dados encontram-se no Anexo II - Análise estatística do referente ao primeiro ensaio de material vegetal *in vitro* e no

Anexo III - Análise estatística do referente ao *segundo ensaio de material vegetal in vitro*.

## 2. Germinação de sementes:

Os dados das germinações das sementes foram registados diariamente para todos os tratamentos (Tabela 9), exceto nos dias 6 e 7 de abril e 13 e 14 abril (fins de semana) e nos dias 6 e 7 de julho e 13 e 14 de julho (fins de semana).

No tratamento A (imersão das sementes em água a uma temperatura de 100°C durante 10 minutos e posterior imersão em água à temperatura ambiente por 48H) foram observadas apenas 2 germinações no primeiro ensaio, uma no meio 1 *in vitro* e outra no ensaio *ex vitro*. Em relação ao tempo de germinação, as sementes germinaram entre o 8º dia e o 9º dia do procedimento efetuado.

No segundo ensaio, observou-se que ocorreram três germinações, resultados muito semelhantes ao primeiro ensaio de germinação. Neste ensaio as sementes germinaram entre o sétimo dia (meio 1 *in vitro*) e o nono dia (*ex vitro*).

Ressalva-se, que neste tratamento as sementes foram contaminadas com bactéria, como demonstrado na Figura 26, observadas nas duas tipologias, *in vitro* e *ex vitro*.



**Figura 26:** Contaminações por bactéria, no tratamento A, *in vitro* e *ex vitro*, respetivamente.

No tratamento B (imersão das sementes em GA<sub>3</sub> (25 mg/L) durante 24 horas), no primeiro ensaio de germinação, observou-se que o número de germinações aumentou em relação ao tratamento A.

Neste tratamento, a germinação foi mais rápida, tendo sido registada no quinto dia após o início do ensaio. No ensaio *in vitro* (meio 1) foram registadas três germinações ao quinto dia, três germinações ao oitavo dia e a última germinação foi registada ao nono dia, perfazendo um total de sete sementes germinadas. No ensaio *in vitro* (meio 2) foi registada uma germinação ao sexto dia, duas germinações ao sétimo dia, uma germinação ao oitavo dia e a última germinação foi registada ao nono dia, perfazendo um total de cinco sementes germinadas. No ensaio *ex vitro*, a germinação ocorreu ao quinto dia com duas sementes, ao sexto dia germinaram duas sementes, ao oitavo dia ocorreram duas germinações e a última germinação deu-se ao nono dia, totalizando oito sementes germinadas. Neste ensaio, o meio 2 foi o que teve um número mais baixo de germinações, com cinco sementes, enquanto na tipologia *ex vitro* a taxa foi a mais elevada (oito germinações).

**Tabela 9:** Número de sementes germinadas por tratamento em cada ensaio.

	Data	Dia	Tratamento A			Tratamento B			Tratamento C			Tratamento D			
			<i>In vitro</i>		<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>		<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>		<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>		<i>Ex vitro</i>	
			Meio 1	Meio 2		Meio 1	Meio 2		Meio 1	Meio 2		Meio 1	Meio 2		
Primeiro ensaio – abril	04/abr	Dia 1	SEMENTEIRA												
	05/abr	Dia 2													
	06/abr	Dia 3													
	07/abr	Dia 4													
	08/abr	Dia 5				3		2	2	1	6	1			
	09/abr	Dia 6					1	2		3		1			
	10/abr	Dia 7					2		3		2	1	2	3	
	11/abr	Dia 8	1			3	1	2	8	7		1	1	1	
	12/abr	Dia 9			1	1		1	1	2	1			1	
	13/abr	Dia 10													
	14/abr	Dia 11													
	15/abr	Dia 12					1	1	1	2	4				
		<b>Total</b>		<b>1</b>		<b>1</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
Segundo ensaio – julho	04/jul	Dia 1	SEMENTEIRA												
	05/jul	Dia 2													
	06/jul	Dia 3													
	07/jul	Dia 4													
	08/jul	Dia 5				1		3	1	2	6	1			
	09/jul	Dia 6								1		2	1		
	10/jul	Dia 7	1	1		2	1	3	4	2	1		1	3	
	11/jul	Dia 8				3	2	1	8	8	2				
	12/jul	Dia 9			1		1	1		2	2	2	2	2	
	13/jul	Dia 10													
	14/jul	Dia 11													
	15/jul	Dia 12				2		1			1			2	
		<b>Total</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>7</b>

No segundo ensaio de germinação do tratamento B, observámos que o número de germinações foi muito semelhante ao primeiro ensaio, com um período de germinação que varia entre o quinto e o decimo segundos dias, e a tipologia *ex vitro* a apresentar um maior número de sementes germinadas.

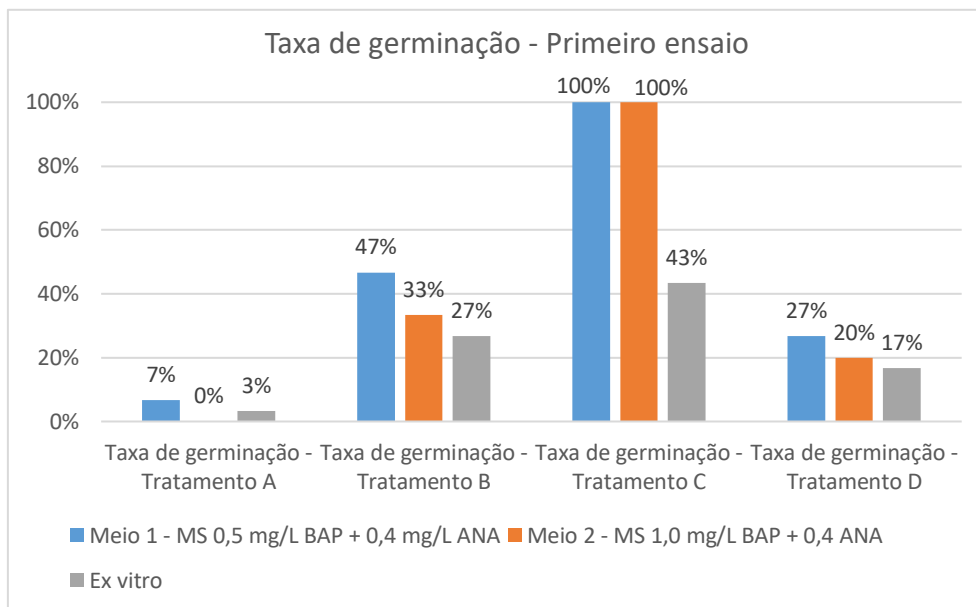
Em relação ao tratamento C (imersão das sementes de alfarroba em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por 30 minutos, com posterior lavagem com água corrente para retirar o ácido), nas diferentes datas dos ensaios, as primeiras germinações ocorreram ao quinto dia após o tratamento, sendo que foi nesse dia que ocorreu o pico de germinação do ensaio *ex vitro*. Para os ensaios correspondentes ao *in vitro*, o pico de germinação ocorreu ao oitavo dia, em ambos os meios. Este tratamento foi um tratamento em que houve um número mais elevado de sementes germinadas, independentemente dos meios de cultura ou tipologia (*in vitro* vs *ex vitro*).

Finalmente, no tratamento D (controlo – imersão das sementes em água à temperatura ambiente por 48 horas), as ocorreram germinações no quinto dia, em ambos os ensaios, contudo em números relativamente baixos.

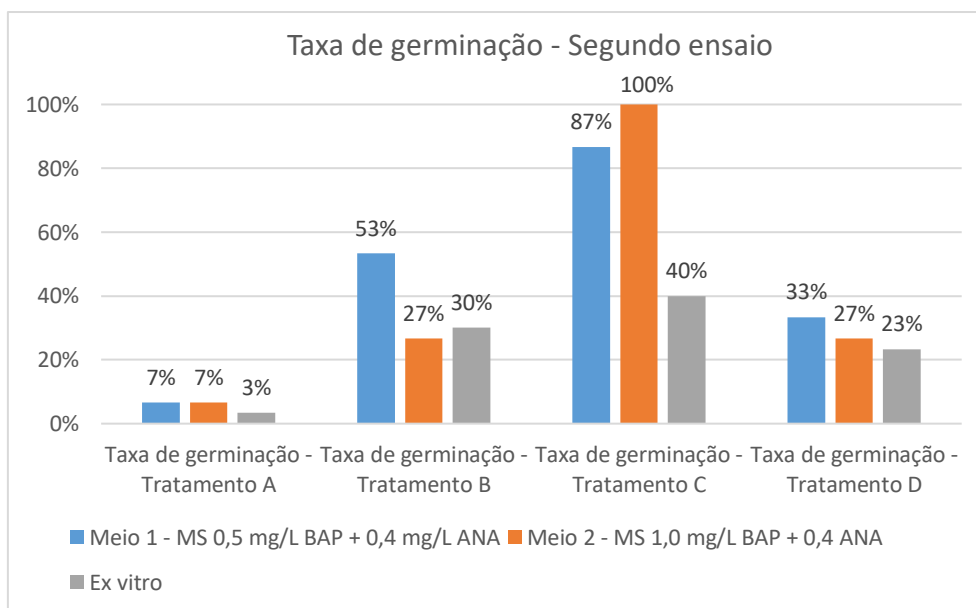
De um modo geral, em todos os tratamentos a germinação iniciou-se a partir do quinto dia, sendo que houve um atraso no tratamento A onde esta só começou ao sétimo dia.

Analisando os dados obtidos com o estudo realizado por Eid Mohamed et al. 2014, os tempos de germinação foram menores no tratamento onde foi utilizada a imersão das sementes em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ocorrendo após o sétimo dia, seguido da imersão em GA<sub>3</sub> (25 mg/L), em que a germinação ocorreu após o oitavo dia (Deen, El-Sayed, El-Rahman, El-Sayed, & Hegazi, 2014). De modo geral, os resultados obtidos coincidem, sendo que neste caso os tempos de germinação foram relativamente menores comparativamente a este estudo.

De forma a poder ser feita uma comparação entre tratamentos e meios/tipologia de cultura foi calculada a taxa de germinação por cada grupo, apresentados nos Gráfico 4 e Gráfico 5, primeiro e segundo ensaio, respetivamente.



**Gráfico 5:** Taxa de germinação - Primeiro ensaio.



**Gráfico 4:** Taxa de germinação - Segundo ensaio.

Em ambos os ensaios e independentemente da tipologia, a taxa de germinação foi mais elevada no tratamento C, que corresponde à imersão das sementes por 30 minutos em ácido sulfúrico, enquanto o tratamento menos eficaz para a germinação das sementes foi o tratamento A, imersão das sementes em água a uma temperatura de

100°C durante 10 minutos e posterior imersão em água à temperatura ambiente por 48H.

Analisando as tipologias separadamente, no *in vitro*, e de um modo geral, as taxas de germinação mais elevadas correspondem ao meio de cultura 1, seguindo a mesma linha de tendência obtida para o ensaio correspondente ao estabelecimento da cultura de alfarrobeira pela técnica de micropropagação (secção anterior), sendo o tratamento C o mais indicado para induzir a germinação das sementes de alfarroba. Na tipologia *ex vitro*, o tratamento com melhores resultados continua a ser o tratamento C, com uma taxa de germinação de 43% e de 40%, no primeiro e segundo ensaio, respetivamente, seguido do tratamento B, com uma taxa de germinação de 27% e 30%, no primeiro e segundo ensaio, respetivamente.

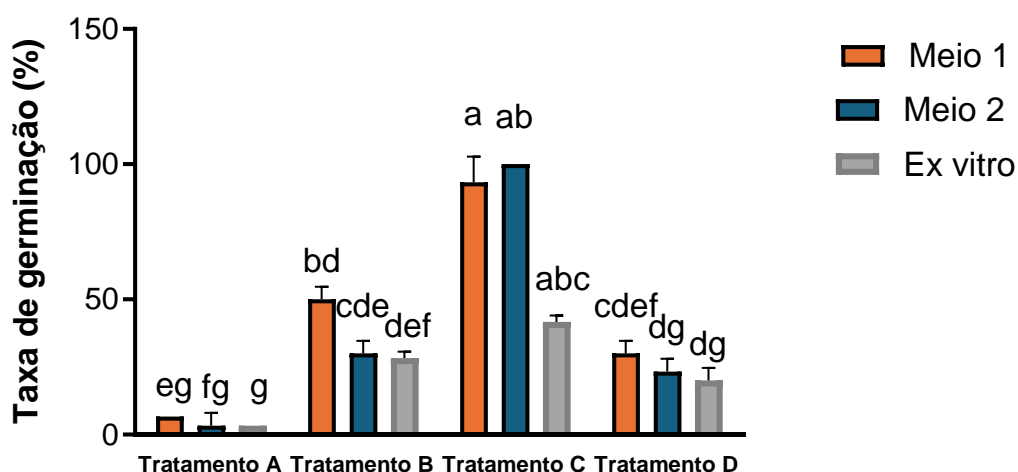
Estes resultados coincidem com o estudo publicado por Eid Mohamed et al. 2014, onde os melhores resultados de germinação ocorreram no tratamento de imersão de sementes em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a uma concentração de 60%, com uma percentagem de germinação entre 91,22% e 91,63%, variando as datas de germinação, abril e setembro, respetivamente. As sementes mergulhadas em GA<sub>3</sub> (25 mg/L), foram neste ensaio, o segundo tratamento com as taxas de germinação mais elevadas, apresentando 78,50% e 78,55% (Deen, El-Sayed, El-Rahman, El-Sayed, & Hegazi, 2014).

O tratamento D (definido como controlo), o mais comum e rotineiro na atividade dos viveiristas para obtenção de plantas por origem seminal – imersão das sementes em água por 48H à temperatura ambiente (definido como controlo) foi o segundo tratamento com os resultados com menor germinação. Contudo, este tratamento seria o expectável, uma vez que a semente não foi sujeita a nenhum tratamento térmico, químico ou mecânico.

Como referido anteriormente, o tratamento A, foi o que apresentou os resultados menos favoráveis, em todas as tipologias em estudo, sendo a taxa de germinação muito baixa comparativamente às restantes. Claramente, o pré-tratamento com água a 100°C teve um efeito negativo na germinação das sementes, não só pelo fato de as sementes sujeitas a este tratamento terem sido contaminadas por bactéria que formaram um invólucro em volta da semente, o que pode de alguma forma dificultar a germinação, mas também as elevadas temperaturas podem inviabilizar a

germinação do embrião. No entanto, mais estudos seriam necessários para testar esta hipótese.

Recorrendo ao programa GraphPad 9 e aplicando o método de análise estatística ANOVA seguida por um teste de comparações múltiplas, o teste de Tukey, foi possível retirar o Gráfico 6. No entanto, para efeitos estatísticos e como as condições dos dois ensaios eram semelhantes, embora a diferença temporal entre eles, assumiu-se que seriam duas repetições do mesmo ensaio. Ressalvo, que as tabelas com os dados encontram-se no Anexo IV - Análise estatística do referente à taxa de germinação nos diferentes tratamentos.



**Gráfico 6:** Resultados da análise estatística ANOVA à taxa de germinação por tratamento. As mesmas letras significam não houve diferenças significativas entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Assim, analisando o Gráfico 6, podemos observar que existem diferenças significativas entre os vários parâmetros analisados. Entre elas podemos ver que o tratamento C foi o que teve melhores resultados, com taxas de germinação próximas de 100% nos meios *in vitro*. Depois deste segue-se o tratamento B que é ligeiramente melhor que o tratamento C e por fim o tratamento A com taxas de germinação máxima de 7%. Também é possível ver que de forma geral o ambiente *ex vitro* é pior para a germinação de sementes e que o meio 1 é ligeiramente melhor (em alguns tratamentos de forma significativa) para a germinação das mesmas.

Estes dados propõem que o aumento da hormona BAP de 0,5 para 1mg/L pode ter um efeito benéfico na germinação da semente *in vitro*. Ao fazer o teste de Tukey de

comparações múltiplas podemos ver que no tratamento C, o meio 1 foi o que teve melhores resultados seguido do meio 2 e do ambiente *ex vitro*, não existindo nenhuma diferença estatística entre eles. Em seguida, o tratamento B não apresentou diferenças significativas entre os 2 últimos. Pelo contrário, o pior tratamento é o tratamento A independentemente do meio e estes não são estatisticamente diferentes do meio 2 e do ambiente *ex vitro* do tratamento D, o que sugere que não deverão ser adotados para tratamentos futuros.

## Conclusão e perspectivas futuras

Na micropropagação *in vitro* do material da alfarrobeira existem várias etapas a ter em conta para que o processo ocorra com sucesso. Primeiramente, a idade e estado de desenvolvimento da planta mãe é muito importante. Neste trabalho observou-se que a colheita de material vegetal para a micropropagação ligeiramente antes do início da floração torna possível a recolha que maior quantidade de material jovem e vigoroso, bem como o melhor desempenho deste com maior número de rebentações por segmento. Nesta fase, também as condições ambientais em que são feitas as recolhas do material devem ser tidas em conta, dando preferência a períodos com humidade relativa baixa.

Adicionalmente, na primeira fase, o estabelecimento da cultura, o meio selecionado também tem um impacto muito significativo na taxa de sucesso desta técnica.

A utilização de um meio de cultura com uma concentração de BAP de 0,5 mg/L e em vez de 1,0 mg/L produziu um maior número de rebentações, além de que os segmentos apresentam um aspeto visual mais saudável, comparativamente ao segundo meio de cultura em estudo, que apresentava uma concentração de BAP duas vezes superior.

Neste seguimento, e de forma a dar continuidade ao estudo do uso da técnica de micropropagação *in vitro* em alfarrobeira, futuramente devem ser realizados mais testes com meios de cultura que estimulem o crescimento dos segmentos, de forma a aumentar a quantidade de plantas em laboratório e viabilizar a próxima etapa da técnica, a fase de multiplicação.

Relativamente à germinação de sementes, neste processo não parece haver uma diferença significativa na escolha da altura de germinação, uma vez que não foram obtidas diferenças entre os ensaios. No entanto, o tipo de tratamento pré-germinativo e o meio de germinação impactam a taxa de germinação. Se por um lado os resultados mais favoráveis foram obtidos com a imersão das sementes em ácido sulfúrico por 30 minutos, ou seja, quando as sementes estão sujeitas a um tratamento químico mais agressivo, onde acontece a rutura do tegumento que posteriormente pode facilitar o crescimento do embrião. Por outro, e tal como acontece na fase de estabelecimento da

cultura da micropropagação, um meio de cultura com 0,5 mg/L de BAP (meio 1) é mais adequado que o meio com o dobro deste fator de crescimento.

Em trabalhos futuros, seria importante analisar as taxas de germinação utilizando técnicas de rutura do tegumento de forma mecânica, com vista a ser um procedimento de fácil acesso, e mais barato, para produtores da espécie, via seminal. Neste sentido, seria também interessante testar o efeito da idade da semente na taxa de germinação utilizando sementes colhidas em diferentes anos. Adicionalmente, o estudo da viabilidade do embrião quando exposto a altas temperaturas durante o tratamento pré-germinação, seria pertinente para distinguir entre efeito da contaminação por bactérias ou dano no embrião.

Para a técnica de micropropagação, seria importante dar seguimento ao estudo, de forma a conseguir obter plantas selecionadas em laboratório. Tendo em conta os resultados deste estudo e o surgimento de uma série de novas hipóteses, neste momento foi preparado um projeto que será apresentado para financiamento com objetivo de dar continuidade a este estudo.

## Bibliografia

- Batlle, A. R., & Tous, J. (2013). The Carob Tree: Botany, Horticulture, and Genetic Resources. Em M. H. Meyer, M. S. Reid, & D. Swietlik, *HORTICULTURAL REVIEWS*. Canada: Wiley-Blackwell. Obtido em 27 de agosto de 2024
- Batlle, L., & Tous, J. (1997). *Carob tree - Ceratonía siliqua* L. (I. I. Vegetais, Ed.) doi:ISBN 92-9043-328-X
- BOSTAN, S. Z., & KILIÇ, D. (2014). The Effects Of Different Treatments On Carob (*Ceratonía Siliqua* L.) Seed Germination. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*. Obtido em 3 de maio de 2024
- Brugaletta, M., Malfa, S. L., Gentile, A., Almeida, R., & Romano, A. (2009). In Vitro Culture Establishment of *Ceratonía siliqua* (L.) Mature Trees from Cultivars of Different Mediterranean Countries. Obtido em 30 de abril de 2024
- Cançado, G. M., Braga, F. T., Souza, R. A., Nunes, C. F., Ribeiro, A. P., & Soares, B. D. (s.d.). *Cultivo in vitro da oliveira e suas aplicações*.
- Correia, P. J., Guerreiro, J. F., & Bouça, E. (2017). *Alfarrobeira: Estado da Produção*. CNCFS. doi:ISBN: 978-989-99857-1-1
- Costa, J., & Rosa, A. (2020). *Coleção de Alfarrobeiras do Algarve - Caracterização Morfológica de Variedades*. DIREÇÃO REGIONAL DE AGRICULTURA E PESCAS DO ALGARVE. Obtido em 5 de julho de 2024
- Custódio, L., Carneiro, M. F., & Romano, A. (2004). Microsporogenesis and anther culture in carob tree (*Ceratonía siliqua* L.). doi:10.1016/j.scienta.2004.08.001
- Custódio, L., Martins-Loução, M., & Romano, A. (2004). Influence of sugars on in vitro rooting and acclimatization of carob tree. Obtido em 18 de julho de 2024
- CyberColloids Ltd. (s.d.). *Carob and Locust bean Gum – Structure*. Obtido em 30 de julho de 2024, de CyberColloids: <https://cybercolloids.net/information/technical-articles/carob-and-locust-bean-gum-structure/>
- Deen, E. M., El-Sayed, O. M., El-Rahman, A., El-Sayed, I., & Hegazi, G. A.-M. (2014). Studies on Carob (*Ceratonía siliqua* L.) Propagation. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. Obtido em 4 de maio de 2024
- Florestas.pt. (11 de fevereiro de 2020). *Alfarrobeira: uma espécie bem adaptada a clima seco e solos pobres*. Obtido em 12 de junho de 2024, de Florestas.pt: <https://florestas.pt/conhecer/alfarrobeira-uma-especie-bem-adaptada-a-clima-seco-e-solos-pobres/>
- Florestas.pt. (22 de junho de 2020). *O valor da alfarroba: produção nacional é referência mundial*. Obtido em 4 de junho de 2024, de AgroPortal: <https://www.agroportal.pt/o-valor-da-alfarroba-producao-nacional-e-referencia-mundial/>

- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. D. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. doi:ISBN 978-1-4020-5005-3 (e-book)
- Gonçalves, S., Correia, P., Martins-Loução, M., & Romano, A. (2004). A new medium formulation for in vitro rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentrations. Obtido em 14 de agosto de 2024
- Gunes, E., Gubbuk, H., Ayala-silva, T., Gozlekci, S., & Ercisli, S. (2013). Effects of Various Treatments on Seed Germination and Growth of Carob (*Ceratonía Siliqua* L.). Obtido em 3 de maio de 2024
- Hakim, L., Islam, M. R., Mamun, A. N., & Khan, G. A. (2010). Clonal Propagation of Carob (*Ceratonía Siliqua* L., Fabaceae). Obtido em 22 de maio de 2024
- Hernández, P. M. (2003). *Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas (Vol.II)*. Madrid. Obtido em 28 de junho de 2024
- Laaraj, S., Salmaoui, S., Addi, M., El-rhouttais, C., Tikent, A., Elbouzidi, A., . . . Elfazazi, K. (2023). Carob (*Ceratonía siliqua* L.) Seed Constituents: A Comprehensive Review of Composition, Chemical Profile, and Diverse Applications. *Hindawi - Journal of Food Quality*. doi:https://doi.org/10.1155/2023/3438179
- Loução, M. A., & Carvalho, J. H. (1989). *A Cultura da Alfarroba*. Lisboa. Obtido em 29 de julho de 2024
- Mahdad, Y. M., & Gaouar, S. B. (2023). Origin, distribution and domestication of the carob tree (*Ceratonía siliqua* L.). *Turkish Journal of Botany*. doi:10.55730/1300-008X.2748
- Mendonça, A., Gonçalves, A., Moura, C., Chorondo, I., Pinho, E., Severino, F., . . . Santos, M. (2023). *Pomar de Sequeiro Dieta Mediterrânica | Algarve* (1ª ed.). doi:ISBN : 978-972-643-150-3
- Nia, S., Abid, M., & Belkoura, I. (2021). Carob tree micropropagation essays (*Ceratonía siliqua* L.). Obtido em 30 de agosto de 2024
- Osório, M. L., Osório, J., Gonçalves, S., David, M. M., Correia, M. J., & Romano, A. (2012). Carob trees (*Ceratonía siliqua* L.) regenerated in vitro can acclimatize successfully to match the field performance of seed-derived plants. Obtido em 5 de junho de 2024
- Romano, A., Barros, S., & Martins-Loução, M. (2001). Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonía siliqua*. Obtido em 5 de maio de 2024
- Silva, I. A. (2019). *Micropropagação das espécies: Prunus dulcis e Ceratonía siliqua*. Tese de mestrado em Engenharia Agronómica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto , Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território . Obtido em 6 de julho de 2024
- SIMA. (Semana 13 - 2024). Newsletter - Fruticultura. Em p. e. Gabinete de planeamento.

UTAD - Jardim Botânico. (2024). *Ceratonia siliqua* L. Obtido em 30 de agosto de 2024,  
de UTAD Jardim Botânico:  
[https://jb.utad.pt/especie/Ceratonia\\_siliqua#:~:text=Distribui%C3%A7%C3%A3o%20geral%3A%20Considera%2Dse%20a,se%20concentra%20o%20seu%20cultivo](https://jb.utad.pt/especie/Ceratonia_siliqua#:~:text=Distribui%C3%A7%C3%A3o%20geral%3A%20Considera%2Dse%20a,se%20concentra%20o%20seu%20cultivo)

## Anexos

### Anexo I - Meio de cultura MS - Murashige & Skoog (1962)

	mg/L	mL/ 1L meio
<b>Macronutrientes MS</b>		
KNO <sub>3</sub>	1900	<b>50</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	440	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	
<b>Oligo/Micronutrientes MS</b>		
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9	<b>1</b>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	
KI	0,83	
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	
<b>Vitaminas MS</b>		
Glicina	2	<b>2</b>
Ácido nicotínico	0,5	
Piridoxina H-Cl (vit. B6)	0,5	
Tiamina H-Cl (vit. B1)	0,1	
<b>Mioinositol MS</b>	100	<b>5</b>
<b>FeEDTA</b>	40	<b>10</b>
<b>Reguladores de Crescimento</b>		
BAP	0,1	<b>0,1</b>
<b>Fonte de Carbono</b>		
Sacarose		<b>30 g/L</b>

Perfazer o volume com água destilada.

<b>pH</b> 5,75	
<b>Agente gelificante</b> Agar	<b>12 g/L</b>

Anexo II - Análise estatística do referente ao primeiro ensaio de material vegetal *in vitro*

Ordinary one-way ANOVA					
ANOVA results					
3					
4	<b>ANOVA summary</b>				
5	F	1.777			
6	P value	0.3096			
7	P value summary	ns			
8	Significant diff. among means (P < 0.05)?	No			
9	R squared	0.5423			
10					
11	<b>Brown-Forsythe test</b>				
12	F (DFn, DFd)	1.566e+031 (2, 3)			
13	P value	<0.0001			
14	P value summary	****			
15	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes			
16					
17	<b>Bartlett's test</b>				
18	Bartlett's statistic (corrected)				
19	P value				
20	P value summary				
21	Are SDs significantly different (P < 0.05)?				
22					
23	<b>ANOVA table</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>
24	Treatment (between columns)	4152	2	2076	F (2, 3) = 1.777
25	Residual (within columns)	3504	3	1168	P=0.3096
26	Total	7655	5		
27					
28	<b>Data summary</b>				
29	Number of treatments (columns)	3			
30	Number of values (total)	6			

Ordinary one-way ANOVA									
Multiple comparisons									
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.05							
4									
5	<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95.00% CI of diff.</b>	<b>Below threshold?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>			
6	Calos/Lenticelas vs. Rebentações	-6.868	-149.7 to 135.9	No	ns	0.9781	A-B		
7	Calos/Lenticelas vs. Contaminações	52.05	-90.76 to 194.9	No	ns	0.3978	A-C		
8	Rebentações vs. Contaminações	58.92	-83.89 to 201.7	No	ns	0.3316	B-C		
9									
10	<b>Test details</b>	<b>Mean 1</b>	<b>Mean 2</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>SE of diff.</b>	<b>n1</b>	<b>n2</b>	<b>q</b>	<b>DF</b>
11	Calos/Lenticelas vs. Rebentações	63.59	70.45	-6.868	34.17	2	2	0.2842	3
12	Calos/Lenticelas vs. Contaminações	63.59	11.54	52.05	34.17	2	2	2.154	3
13	Rebentações vs. Contaminações	70.45	11.54	58.92	34.17	2	2	2.438	3
14									
15	<b>Compact letter display</b>								
16	Rebentações	A							
17	Calos/Lenticelas	A							
18	Contaminações	A							

Table format:		Group A	Group B	Group C
Column		Calos/Lenticelas	Rebentações	Contaminações
1	Meio 1	27.27272727	90.909090910	15.384615380
2	Meio 2	99.90000000	50.00000000	7.692307692

Anexo III - Análise estatística do referente ao segundo ensaio de material vegetal *in vitro*

RM one-way ANOVA ANOVA results						
2						
3	<b>Repeated measures ANOVA summary</b>					
4	Assume sphericity?	No				
5	F	2.211				
6	P value	0.3769				
7	P value summary	ns				
8	Statistically significant (P < 0.05)?	No				
9	Geisser-Greenhouse's epsilon	0.5000				
10	R squared	0.6886				
11						
12	<b>Was the matching effective?</b>					
13	F	0.1772				
14	P value	0.7147				
15	P value summary	ns				
16	Is there significant matching (P < 0.05)?	No				
17	R squared	0.02685				
18						
19	<b>ANOVA table</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>	<b>P value</b>
20	Treatment (between columns)	5807	2	2904	F (1.000, 1.000) = 2.211	P=0.3769
21	Individual (between rows)	232.7	1	232.7	F (1, 2) = 0.1772	P=0.7147
22	Residual (random)	2627	2	1313		
23	Total	8667	5			
24						
25	<b>Data summary</b>					
26	Number of treatments (columns)	3				
27	Number of subjects (rows)	2				
28	Number of missing values	0				

RM one-way ANOVA									
Multiple comparisons									
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	3							
3	Alpha	0.05							
4									
5	<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95.00% CI of diff.</b>	<b>Below threshold?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>			
6	Calos/Lenticelas vs. Rebentações	-19.86	-920.2 to 880.5	No	ns	0.9219	A-B		
7	Calos/Lenticelas vs. Contaminações	53.79	-600.0 to 707.6	No	ns	0.5383	A-C		
8	Rebentações vs. Contaminações	73.64	-172.9 to 320.2	No	ns	0.1732	B-C		
9									
10	<b>Test details</b>	<b>Mean 1</b>	<b>Mean 2</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>SE of diff.</b>	<b>n1</b>	<b>n2</b>	<b>q</b>	<b>DF</b>
11	Calos/Lenticelas vs. Rebentações	62.54	82.39	-19.86	49.59	2	2	0.5663	1
12	Calos/Lenticelas vs. Contaminações	62.54	8.750	53.79	36.01	2	2	2.112	1
13	Rebentações vs. Contaminações	82.39	8.750	73.64	13.58	2	2	7.671	1
14									
15	<b>Compact letter display</b>								
16	Rebentações	A							
17	Calos/Lenticelas	A							
18	Contaminações	A							

Table format:		Group A	Group B	Group C
Column		Calos/Lenticelas	Rebentações	Contaminações
1	Meio 1	27.77777778	97.22222222	10.00000000
2	Meio 2	97.29729730	67.56756757	7.50000000

Anexo IV - Análise estatística do referente à taxa de germinação nos diferentes tratamentos

No entanto, para efeitos estatísticos e como as condições dos dois ensaios eram semelhantes, embora a diferença temporal entre eles, assumiu-se que seriam duas repetições do mesmo ensaio.

2way ANOVA ANOVA results						
1	Table Analyzed	t1+t2				
2						
3	<b>Two-way ANOVA</b>	Ordinary				
4	Alpha	0.05				
5						
6	<b>Source of Variation</b>	<b>% of total variation</b>	<b>P value</b>	<b>P value summary</b>	<b>Significant?</b>	
7	Row Factor	77.77	<0.0001	****	Yes	
8	Column Factor	8.923	0.0099	**	Yes	
9						
10	<b>ANOVA table</b>	<b>SS (Type III)</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>	<b>P value</b>
11	Row Factor	17528	3	5843	F (3, 18) = 35.06	P<0.0001
12	Column Factor	2011	2	1006	F (2, 18) = 6.033	P=0.0099
13	Residual	3000	18	166.7		
14						
15	<b>Data summary</b>					
16	Number of columns (Column Factor)	3				
17	Number of rows (Row Factor)	4				
18	Number of values	24				

2way ANOVA Multiple comparisons					
1	Compare cell means regardless of rows and columns				
2					
3	Number of families	1			
4	Number of comparisons per family	66			
5	Alpha	0.05			
6					
7	<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Predicted (LS) mean diff.</b>	<b>95.00% CI of diff.</b>	<b>Below threshold?</b>	<b>Summary</b>
8					
9	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento A:Meio 2	5.833	-18.20 to 29.87	No	ns
10	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento A:Ex vitro	21.67	-2.371 to 45.70	No	ns
11	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento B:Meio 1	-31.67	-59.42 to -3.910	Yes	*
12	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento B:Meio 2	-25.83	-62.55 to 10.88	No	ns
13	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento B:Ex vitro	-10.00	-46.72 to 26.72	No	ns
14	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento C:Meio 1	-73.89	-101.6 to -46.13	Yes	****
15	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento C:Meio 2	-68.06	-104.8 to -31.34	Yes	****
16	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento C:Ex vitro	-52.22	-88.94 to -15.50	Yes	**
17	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 1	-20.00	-47.76 to 7.756	No	ns
18	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 2	-14.17	-50.88 to 22.55	No	ns
19	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento D:Ex vitro	1.667	-35.05 to 38.38	No	ns
20	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento A:Ex vitro	15.83	-8.204 to 39.87	No	ns
21	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento B:Meio 1	-37.50	-74.22 to -0.7817	Yes	*
22	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento B:Meio 2	-31.67	-59.42 to -3.910	Yes	*
23	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento B:Ex vitro	-15.83	-52.55 to 20.88	No	ns
24	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento C:Meio 1	-79.72	-116.4 to -43.00	Yes	****
25	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento C:Meio 2	-73.89	-101.6 to -46.13	Yes	****
26	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento C:Ex vitro	-58.06	-94.77 to -21.34	Yes	***
27	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 1	-25.83	-62.55 to 10.88	No	ns
28	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 2	-20.00	-47.76 to 7.756	No	ns
29	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento D:Ex vitro	-4.167	-40.88 to 32.55	No	ns
30	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento B:Meio 1	-53.33	-90.05 to -16.62	Yes	**

31	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento B:Meio 2	-47.50	-84.22 to -10.78	Yes	**
32	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento B:Ex vitro	-31.67	-59.42 to -3.910	Yes	*
33	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento C:Meio 1	-95.56	-132.3 to -58.84	Yes	****
34	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento C:Meio 2	-89.72	-126.4 to -53.00	Yes	****
35	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento C:Ex vitro	-73.89	-101.6 to -46.13	Yes	****
36	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 1	-41.67	-78.38 to -4.948	Yes	*
37	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 2	-35.83	-72.55 to 0.8850	No	ns
38	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento D:Ex vitro	-20.00	-47.76 to 7.756	No	ns
39	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento B:Meio 2	5.833	-18.20 to 29.87	No	ns
40	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento B:Ex vitro	21.67	-2.371 to 45.70	No	ns
41	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento C:Meio 1	-42.22	-69.98 to -14.47	Yes	**
42	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento C:Meio 2	-36.39	-73.11 to 0.3294	No	ns
43	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento C:Ex vitro	-20.56	-57.27 to 16.16	No	ns
44	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 1	11.67	-16.09 to 39.42	No	ns
45	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 2	17.50	-19.22 to 54.22	No	ns
46	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento D:Ex vitro	33.33	-3.385 to 70.05	No	ns
47	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento B:Ex vitro	15.83	-8.204 to 39.87	No	ns
48	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento C:Meio 1	-48.06	-84.77 to -11.34	Yes	**
49	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento C:Meio 2	-42.22	-69.98 to -14.47	Yes	**
50	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento C:Ex vitro	-26.39	-63.11 to 10.33	No	ns
51	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 1	5.833	-30.88 to 42.55	No	ns
52	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 2	11.67	-16.09 to 39.42	No	ns
53	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento D:Ex vitro	27.50	-9.218 to 64.22	No	ns
54	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento C:Meio 1	-63.89	-100.6 to -27.17	Yes	***
55	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento C:Meio 2	-58.06	-94.77 to -21.34	Yes	***
56	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento C:Ex vitro	-42.22	-69.98 to -14.47	Yes	**
57	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 1	-10.00	-46.72 to 26.72	No	ns
58	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 2	-4.167	-40.88 to 32.55	No	ns
59	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento D:Ex vitro	11.67	-16.09 to 39.42	No	ns
60	Tratamento C:Meio 1 vs. Tratamento C:Meio 2	5.833	-18.20 to 29.87	No	ns

61	Tratamento C:Meio 1 vs. Tratamento C:Ex vitro	21.67	-2.371 to 45.70	No	ns				
62	Tratamento C:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 1	53.89	26.13 to 81.65	Yes	****				
63	Tratamento C:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 2	59.72	23.00 to 96.44	Yes	***				
64	Tratamento C:Meio 1 vs. Tratamento D:Ex vitro	75.56	38.84 to 112.3	Yes	****				
65	Tratamento C:Meio 2 vs. Tratamento C:Ex vitro	15.83	-8.204 to 39.87	No	ns				
66	Tratamento C:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 1	48.06	11.34 to 84.77	Yes	**				
67	Tratamento C:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 2	53.89	26.13 to 81.65	Yes	****				
68	Tratamento C:Meio 2 vs. Tratamento D:Ex vitro	69.72	33.00 to 106.4	Yes	****				
69	Tratamento C:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 1	32.22	-4.496 to 68.94	No	ns				
70	Tratamento C:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 2	38.06	1.337 to 74.77	Yes	*				
71	Tratamento C:Ex vitro vs. Tratamento D:Ex vitro	53.89	26.13 to 81.65	Yes	****				
72	Tratamento D:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 2	5.833	-18.20 to 29.87	No	ns				
73	Tratamento D:Meio 1 vs. Tratamento D:Ex vitro	21.67	-2.371 to 45.70	No	ns				
74	Tratamento D:Meio 2 vs. Tratamento D:Ex vitro	15.83	-8.204 to 39.87	No	ns				
75									
76									
77	<b>Test details</b>	<b>Predicted (LS) mean 1</b>	<b>Predicted (LS) mean 2</b>	<b>Predicted (LS) mean diff.</b>	<b>SE of diff.</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>q</b>	<b>DF</b>
78									
79	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento A:Meio 2	13.61	7.778	5.833	6.455	2	2	1.278	18.00
80	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento A:Ex vitro	13.61	-8.056	21.67	6.455	2	2	4.747	18.00
81	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento B:Meio 1	13.61	45.28	-31.67	7.454	2	2	6.008	18.00
82	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento B:Meio 2	13.61	39.44	-25.83	9.860	2	2	3.705	18.00
83	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento B:Ex vitro	13.61	23.61	-10.00	9.860	2	2	1.434	18.00
84	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento C:Meio 1	13.61	87.50	-73.89	7.454	2	2	14.02	18.00
85	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento C:Meio 2	13.61	81.67	-68.06	9.860	2	2	9.761	18.00
86	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento C:Ex vitro	13.61	65.83	-52.22	9.860	2	2	7.490	18.00
87	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 1	13.61	33.61	-20.00	7.454	2	2	3.795	18.00
88	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 2	13.61	27.78	-14.17	9.860	2	2	2.032	18.00
89	Tratamento A:Meio 1 vs. Tratamento D:Ex vitro	13.61	11.94	1.667	9.860	2	2	0.2390	18.00
90	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento A:Ex vitro	7.778	-8.056	15.83	6.455	2	2	3.469	18.00

91	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento B:Meio 1	7.778	45.28	-37.50	9.860	2	2	5.379	18.00
92	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento B:Meio 2	7.778	39.44	-31.67	7.454	2	2	6.008	18.00
93	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento B:Ex vitro	7.778	23.61	-15.83	9.860	2	2	2.271	18.00
94	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento C:Meio 1	7.778	87.50	-79.72	9.860	2	2	11.43	18.00
95	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento C:Meio 2	7.778	81.67	-73.89	7.454	2	2	14.02	18.00
96	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento C:Ex vitro	7.778	65.83	-58.06	9.860	2	2	8.327	18.00
97	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 1	7.778	33.61	-25.83	9.860	2	2	3.705	18.00
98	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 2	7.778	27.78	-20.00	7.454	2	2	3.795	18.00
99	Tratamento A:Meio 2 vs. Tratamento D:Ex vitro	7.778	11.94	-4.167	9.860	2	2	0.5976	18.00
100	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento B:Meio 1	-8.056	45.28	-53.33	9.860	2	2	7.649	18.00
101	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento B:Meio 2	-8.056	39.44	-47.50	9.860	2	2	6.813	18.00
102	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento B:Ex vitro	-8.056	23.61	-31.67	7.454	2	2	6.008	18.00
103	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento C:Meio 1	-8.056	87.50	-95.56	9.860	2	2	13.71	18.00
104	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento C:Meio 2	-8.056	81.67	-89.72	9.860	2	2	12.87	18.00
105	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento C:Ex vitro	-8.056	65.83	-73.89	7.454	2	2	14.02	18.00
106	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 1	-8.056	33.61	-41.67	9.860	2	2	5.976	18.00
107	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 2	-8.056	27.78	-35.83	9.860	2	2	5.139	18.00
108	Tratamento A:Ex vitro vs. Tratamento D:Ex vitro	-8.056	11.94	-20.00	7.454	2	2	3.795	18.00
109	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento B:Meio 2	45.28	39.44	5.833	6.455	2	2	1.278	18.00
110	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento B:Ex vitro	45.28	23.61	21.67	6.455	2	2	4.747	18.00
111	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento C:Meio 1	45.28	87.50	-42.22	7.454	2	2	8.011	18.00
112	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento C:Meio 2	45.28	81.67	-36.39	9.860	2	2	5.219	18.00
113	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento C:Ex vitro	45.28	65.83	-20.56	9.860	2	2	2.948	18.00
114	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 1	45.28	33.61	11.67	7.454	2	2	2.214	18.00
115	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 2	45.28	27.78	17.50	9.860	2	2	2.510	18.00
116	Tratamento B:Meio 1 vs. Tratamento D:Ex vitro	45.28	11.94	33.33	9.860	2	2	4.781	18.00
117	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento B:Ex vitro	39.44	23.61	15.83	6.455	2	2	3.469	18.00
118	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento C:Meio 1	39.44	87.50	-48.06	9.860	2	2	6.892	18.00
119	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento C:Meio 2	39.44	81.67	-42.22	7.454	2	2	8.011	18.00
120	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento C:Ex vitro	39.44	65.83	-26.39	9.860	2	2	3.785	18.00

121	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 1	39.44	33.61	5.833	9.860	2	2	0.8367	18.00
122	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 2	39.44	27.78	11.67	7.454	2	2	2.214	18.00
123	Tratamento B:Meio 2 vs. Tratamento D:Ex vitro	39.44	11.94	27.50	9.860	2	2	3.944	18.00
124	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento C:Meio 1	23.61	87.50	-63.89	9.860	2	2	9.163	18.00
125	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento C:Meio 2	23.61	81.67	-58.06	9.860	2	2	8.327	18.00
126	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento C:Ex vitro	23.61	65.83	-42.22	7.454	2	2	8.011	18.00
127	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 1	23.61	33.61	-10.00	9.860	2	2	1.434	18.00
128	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 2	23.61	27.78	-4.167	9.860	2	2	0.5976	18.00
129	Tratamento B:Ex vitro vs. Tratamento D:Ex vitro	23.61	11.94	11.67	7.454	2	2	2.214	18.00
130	Tratamento C:Meio 1 vs. Tratamento C:Meio 2	87.50	81.67	5.833	6.455	2	2	1.278	18.00
131	Tratamento C:Meio 1 vs. Tratamento C:Ex vitro	87.50	65.83	21.67	6.455	2	2	4.747	18.00
132	Tratamento C:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 1	87.50	33.61	53.89	7.454	2	2	10.22	18.00
133	Tratamento C:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 2	87.50	27.78	59.72	9.860	2	2	8.566	18.00
134	Tratamento C:Meio 1 vs. Tratamento D:Ex vitro	87.50	11.94	75.56	9.860	2	2	10.84	18.00
135	Tratamento C:Meio 2 vs. Tratamento C:Ex vitro	81.67	65.83	15.83	6.455	2	2	3.469	18.00
136	Tratamento C:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 1	81.67	33.61	48.06	9.860	2	2	6.892	18.00
137	Tratamento C:Meio 2 vs. Tratamento D:Meio 2	81.67	27.78	53.89	7.454	2	2	10.22	18.00
138	Tratamento C:Meio 2 vs. Tratamento D:Ex vitro	81.67	11.94	69.72	9.860	2	2	10.00	18.00
139	Tratamento C:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 1	65.83	33.61	32.22	9.860	2	2	4.622	18.00
140	Tratamento C:Ex vitro vs. Tratamento D:Meio 2	65.83	27.78	38.06	9.860	2	2	5.458	18.00
141	Tratamento C:Ex vitro vs. Tratamento D:Ex vitro	65.83	11.94	53.89	7.454	2	2	10.22	18.00
142	Tratamento D:Meio 1 vs. Tratamento D:Meio 2	33.61	27.78	5.833	6.455	2	2	1.278	18.00
143	Tratamento D:Meio 1 vs. Tratamento D:Ex vitro	33.61	11.94	21.67	6.455	2	2	4.747	18.00
144	Tratamento D:Meio 2 vs. Tratamento D:Ex vitro	27.78	11.94	15.83	6.455	2	2	3.469	18.00

146	<b>Compact letter display</b>	
147	Tratamento C:Meio 1	A
148	Tratamento C:Meio 2	AB
149	Tratamento C:Ex vitro	AB C
150	Tratamento B:Meio 1	B D
151	Tratamento B:Meio 2	C D E
152	Tratamento D:Meio 1	C D E F
153	Tratamento D:Meio 2	D G
154	Tratamento B:Ex vitro	D E F
155	Tratamento A:Meio 1	E G
156	Tratamento D:Ex vitro	D G
157	Tratamento A:Meio 2	F G
158	Tratamento A:Ex vitro	G

Table format: <b>Grouped</b>		Group A		Group B		Group C	
		Meio 1		Meio 2		Ex vitro	
	<input checked="" type="checkbox"/>	A:1	A:2	B:1	B:2	C:1	C:2
1	Tratamento A	6.666666667	6.666666667	0.000000000	6.666666667	3.333333333	3.333333333
2	Tratamento B	46.666666670	53.333333330	33.333333333	26.666666670	26.666666670	30.000000000
3	Tratamento C	100.000000000	86.666666670	100.000000000	100.000000000	43.333333330	40.000000000
4	Tratamento D	26.666666670	33.333333330	20.000000000	26.666666670	16.666666670	23.333333330