

Bio-248

**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABALHO DE LICENCIATURA**

**INDUÇÃO DE CALOS DE DUAS VARIEDADES DE MANDIOCA**

*(Manihot esculenta, Crantz)*

**E ESTUDO DA BIOSÍNTESE DE GLICOSÍDEOS CIANOGENÍCOS A NÍVEL  
CELULAR**

Autora: Eunice Ribeiro

**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABALHO DE LICENCIATURA**

**INDUÇÃO DE CALOS DE DUAS VARIEDADES DE MANDIOCA**

*(Manihot esculenta, Crantz)*

**E ESTUDO DA BIOSÍNTESE DE GLICOSÍDEOS CIANOGENÍCOS A NÍVEL  
CELULAR**

Autora: Eunice Ribeiro

Supervisor: Doutor Henk Doddema

MAPUTO, NOVEMBRO DE 1998

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

ao Miguel,

ao Bruno,

ao Mauro

e aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Endereço a mais profunda gratidão ao Projecto DEIB, pelo apoio financeiro prestado.

Ao Professor Doutor Henk Doddema, pela orientação, pelo apoio, pelo incentivo e pela compreensão, durante a realização do trabalho.

Ao Dr. Orlando Quilambo pelo apoio e incentivo.

Ao Eng. Pequenino e à Eng<sup>a</sup> Anabela Zacarias pelo apoio dado no fornecimento de material vegetal usado no trabalho.

Ao Doutor Manuel Amane e Eng. Jerónimo Ribeiro pela orientação na análise estatística.

Aos Sr. Sitói e Sr. Manhiça pelo apoio prestado no ensinamento das técnicas de laboratório e pela sua disponibilidade permanente.

Aos colegas e amigos pela amizade e incentivo.

A todos os que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## DECLARAÇÃO

Declaro por minha honra que este trabalho foi por mim realizado.

## ABREVIATURAS/GLOSSÁRIO

ABA	Ácido abscísico
Ágar	Produto vegetal (produzido a partir de algas) usado na solidificação de meios de cultura
AIA	Ácido indol-acético
AIB	Ácido indol-butírico, IBA
ANA	Ácido a-naftil-acético
Asséptico	Livre de contaminações por microrganismos
Auxinas	Grupo de hormonas vegetais (naturais ou sintéticas) que induzem o alongamento celular, em alguns casos divisão celular, muitas vezes induzindo raízes adventícias e inibindo as gemas
BA	Benzil-amino-purina
BAP	Benzil-amino-purina
Biossíntese	Síntese de componentes pelas plantas e células
Calo	Divisão activa não organizada de tecidos de células diferenciadas e não diferenciadas e muitas vezes a partir de ferimentos ou em tecidos em cultura
Citocininas	Hormona vegetal (naturais ou sintéticas) que induzem a divisão celular e muitas vezes gemas adventícias e na maioria dos casos inibindo a formação de raízes adventícias; diminuem a dominância apical
Clone	Conjunto de indivíduos geneticamente idênticos obtidos por multiplicação vegetativa de uma planta mãe
2,4-D	Ácido (2,4-di-cloro-fenoxi)-acético
Explante	Fragmento retirado de tecidos vegetais e utilizado na cultura <i>in vitro</i>
Friável	que se esmaga facilmente
GA3	Ácido giberélico
Glicina	Ácido a-amino-acético
<i>in vitro</i>	Cultura de material vivo em meio artificial e sob condições assépticas
M.M.	Maria Maputo
myo-inositol	Açúcar pentose
Multiplicação vegetativa	Sinónimo de reprodução assexuada conduzindo á obtenção de clones

MS	Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)
P.A.	Precoce de Angola
Piridoxina	Vitamina B <sub>6</sub>
Subcultura	Transferência asséptica de um inóculo para meio de cultura fresco
TDZ	Tidiazuron
Tiamina	Vitamina B <sub>1</sub>

## RESUMO

Com o objectivo de fazer o estabelecimento de cultura de calos *in vitro* e determinar as concentrações óptimas de auxinas, citocininas, açúcares e estudo da biossíntese de glicosídeos cianogênicos a nível celular na mandioca, foi feito o presente trabalho.

Foram estabelecidos calos quer a partir de folhas como de caules das duas variedades.

Para a determinação da melhor concentração de auxinas citocininas e açúcar foram feitas três experiências usando explantes de folhas e caules das duas variedades.

A primeira experiência consistiu na variação nas doses de 2,4-D no intervalo entre (1 $\mu$ M e 14 $\mu$ M) mantendo-se constantes as concentrações de cinetina e açúcar.

Na experiência seguinte variou-se a concentração de cinetina no intervalo entre (1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M).

Na última experiência variou-se a concentração de açúcar entre (0,01M e 0,1M).

Depois a partir de calos estabelecidos fez-se a extração de glicosídeos através do método de Bradbury et al. (1994).

A concentração óptima de 2,4-D na indução de calos a partir de caules de P.A. foi de 5,5  $\mu$ M e para M.M. foi de 5,9  $\mu$ M.

A concentração óptima de 2,4-D na indução de calos a partir de folhas de P.A. situou-se no intervalo entre 3,5  $\mu$ M e 10,5  $\mu$ M e para M.M. entre 4,6  $\mu$ M e 11,8  $\mu$ M.

A concentração óptima de cinetina na indução de calos a partir de caules de P.A. situou-se entre 2,5  $\mu$ M e 7,7  $\mu$ M e para M.M. entre 3,87  $\mu$ M e de 6,5  $\mu$ M.

A concentração óptima de cinetina na indução de calos a partir de folhas de P.A. situou-se no intervalo entre 2,75  $\mu$ M e 9,1  $\mu$ M e para M.M. entre 3,87  $\mu$ M e 6,5  $\mu$ M.

Na experiência relativa a concentração de açúcar só foi considerada a experiência relativa a folha de P.A. que teve como concentração óptima de açúcar para a indução do calo 0,057 M. — *folha e não M.M.*

Quanto a biossíntese de glicosídeos cianogênicos houve diferenças no conteúdo de cianetos entre os calos submetidos a diferentes temperaturas e pH.



# ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJECTIVOS .....	4
2.1. Objectivos gerais .....	4
2.2. Objectivos específicos .....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	5
3.1. Materiais .....	5
3.2. Métodos .....	6
3.2.1. Preparação das plantas "stock" .....	6
3.2.2. Preparação dos explantes .....	6
3.2.3. Condições gerais de incubação .....	7
3.2.4. Determinação da melhor concentração de Auxinas .....	9
3.2.5. Determinação da melhor concentração de Citocininas .....	9
3.2.6. Determinação da melhor concentração de açúcar .....	10
3.2.7. Medida de crescimento .....	10
3.2.8. Análise dos dados.....	11
3.2.9. Determinação de glicosídeos cianogénicos .....	12
4. RESULTADOS .....	15
4.1. Concentração de Auxinas .....	15
4.2. Concentração de Citoquininas .....	21
4.3. Concentração de açúcar .....	27
4.4. Biossíntese de glicosídeos cianogénicos .....	33
5. DISCUSSÃO.....	38
5.1. Concentração de auxina .....	38
5.2. Concentração de cinetina .....	39
5.3. Concentração de açúcar .....	40

5.4. Biossíntese de glicosídeos cianogénicos.....	41
6. CONCLUSÕES.....	42
7. RECOMENDAÇÕES .....	44
8. BIBLIOGRAFIA .....	45

## Lista de anexos

Anexo 1. Composição do meio de cultura Murashige & Skoog (1962). *(ordenar os anexos)*

Anexo 2. Média de pesos relativos de calos obtidos ao fim de 30 dias. Os valores correspondem a média de 10 calos por concentração de 2,4-D. *Na folha em sd*

Anexo 3. Média de pesos relativos de calos obtidos ao fim de 30 dias. Os valores correspondem a média de 10 calos por concentração de cinetina.

Anexo 4. Média de pesos relativos de calos obtidos ao fim de 30 dias. Os valores correspondem a média de 10 calos por concentração de açúcar.

Anexo 5. Resultados dos testes de análise de variância (ANOVA - G), para comparar o efeito das diferentes concentrações de 2,4-D no crescimento relativo de calos obtidos de caule e folha de PA e de calos obtidos de caule e folha de MM.

Anexo 6. Resultados dos testes de análise de variância (ANOVA - G), para comparar o efeito das diferentes concentrações de Cinetina no crescimento relativo de calos obtidos caule e folha de PA e de calos obtidos de caule e folha de MM.

Anexo 7. Resultados dos testes de análise de variância (ANOVA - G), para comparar o efeito das diferentes concentrações de açúcar no crescimento relativo de calos obtidos de caule e folha de PA e de calos obtidos de caule e folha de MM.

## 1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é originária da América. Tem sido sugerido que os ancestrais desta, estejam entre as primeiras plantas usadas pelo homem na América Central e do Sul (Sharp *et al.*, 1984). *NE*

Foi introduzida em África pelos navegadores portugueses no século XVI ou XVII, na bacia do Congo, Oeste de África (António, 1960).

Em Moçambique, provavelmente tenha sido introduzida na província de Nampula por volta de 1760, a partir de colónias francesas no Oceano Índico. Estabeleceu-se como a principal cultura ao longo da costa, entre esse período e o início deste século (Serra, 1982).

A mandioca é um arbusto perene da família Euphorbiaceae que compreende plantas com caules ramificados e não ramificados. As folhas são palmatipartidas e as inflorescências desenvolvem-se no ápice dos ramos. Raízes tuberosas desenvolvem-se na base do caule. São normalmente cilíndricas e consistem de periderme, córtex, e medula rica em amido (Sharp *et al.*, 1984). *NE*

A planta é propagada vegetativamente a partir de estacas do caule (Roca, 1984).

É um produto alimentar de grande importância para a nutrição de mais de 500 milhões de pessoas no mundo tropical. Mais de 100 milhões de pessoas obtêm 500 kcal/dia/pessoa a partir da mandioca. Estima-se que na África Central, a mandioca forneça mais de 1000 kcal por dia, para 30 milhões de pessoas (Bokanga, 1994).

Na maioria dos países onde é produzida é usada principalmente na alimentação humana e encontra-se disponível nos mercados fresca ou processada sob forma de farinha. Além disso, as suas folhas que são uma boa fonte de proteínas e vitaminas, são usadas como alimento em África (Sharp *et al.*, 1984) *NE*

Também é usada como ração animal na América Latina e, constitui um importante produto de exportação na Tailândia, Indonésia e Índia. *(fonte!)*

Em Moçambique raízes e folhas são usadas na alimentação humana.

A mandioca acumula dois glicosídeos cianogênicos, linamarina que é acumulada nos vacúolos e lotaustralin no citoplasma (White *et al.*, 1994) nas folhas e raízes na proporção de 93:7 (Koch *et al.*, 1994; Nambisan, 1994). Após hidrólise, produzem o cianeto (Anónimo, IITA, 1990), um composto altamente tóxico que pode causar paralisia e morte nos consumidores se a planta não for bem tratada para a remoção do cianeto e se a dieta dessas pessoas for pobre em proteínas. O processamento geralmente varia de acordo com as preferências alimentares e culturais dos consumidores e inclui a transformação em pasta, grânulos, farinha e muitos diferentes pratos.

A hidrólise é catalizada pela enzima linamarase, armazenada na parede celular das folhas (White, 1994; Dufour, 1994) e ocorre quando o tecido vegetal é danificado ou perde a sua integridade fisiológica.

Segundo Bokanga (1994), existe uma larga variação nos níveis de glicosídeos cianogênicos e actividade da linamarase dentro do mesmo tecido da planta de mandioca. Em adição, variações ocorrem entre variedades e também entre plantas da mesma variedade em ambientes aparentemente similares, e entre plantas da mesma variedade em ambientes diferentes.

Não existem variedades de mandioca completamente livres de glicosídeos cianogênicos (Bokanga, 1994) o que exclui a produção de tais plantas através das técnicas clássicas de propagação. Contudo, existe a possibilidade do uso de modernas técnicas de engenharia genética para atingir esse fim, uma vez que já foram identificados, clonados e isolados 3 genes que são as chaves das enzimas que controlam a biossíntese e degradação dos glicosídeos cianogênicos (Koch *et al.*, 1994)

( se forem usados métodos eficientes de regeneração *in vitro* do calo da mandioca. )

Se por um lado a presença de glicosídeos cianogênicos na mandioca tem desvantagens, por outro lado estudos feitos sugerem que a presença destes são uma evidência do mecanismo de defesa contra pragas e doenças quer no campo como durante a armazenagem.

Belloti (1994), afirma que os cianetos na mandioca, actuam como um mecanismo de defesa para certo tipo de pestes herbívoras. A redução dos níveis de cianetos nas raízes poderiam diminuir a resistência a pragas desta planta, incluindo mamíferos. Consequentemente, a tendência para reduzir os níveis de cianetos nas raízes, ou o desenvolvimento de variedades acianogênicas teria de ser estudada com precaução.

Já se sabe que as condições ambientais afectam o conteúdo de glicosídeos cianogênicos nas plantas. Todavia, a relação directa entre o ambiente e a bioquímica da célula é pouco conhecida. Características morfológicas e anatómicas da planta podem esconder respostas fisiológicas. Em cultura de células tais complicações podem ser evitadas.

Com o objectivo de estudar as condições mais adequadas para a indução e manutenção do calo de duas variedades de mandioca seleccionadas e investigar alguns efeitos ambientais na produção e acumulação de componentes cianogênicos nas células, foi feito o presente trabalho.

## 2. OBJECTIVOS

### 2.1. Objectivos gerais

Os objectivos gerais do presente trabalho foram:

- a) Estabelecimento de culturas de calos de mandioca *in vitro*
- b) Estudo da biossíntese de glicosídeos cianogênicos a nível celular na mandioca

### 2.2. Objectivos específicos

Foram objectivos específicos, a determinação:

- i) da concentração óptima de auxina para a indução do calo na mandioca.
- ii) da concentração óptima de açúcar para a indução do calo na mandioca.
- iii) da concentração óptima de citocinina para a indução do calo na mandioca.
- iv) do conteúdo de glicosídeos cianogênicos no calo da mandioca submetidos a diferentes condições de: pH, temperatura e valores osmóticos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Durante a realização do trabalho foram utilizados os seguintes materiais:

- Frascos (100 ml, 250ml, 500ml, 1l)
- Balões volumétricos (500ml, 1l, 2l)
- Provetas graduadas de ( 25ml, 50ml, 100ml, 500ml, 1l)
- Pipetas graduadas (1ml, 2ml, 5ml, 10ml)
- Pipetas automáticas
- Recipientes de cultura (placas de Petri estéreis).
- Frascos de vidro com tampa de (100ml, 250ml, 500ml, e 1000ml).
- Tubos de ensaio
- Tigelas de vidro para lavagem dos explantes
- Termómetro
- Lamparina
- Papel de alumínio
- Papel de filtro
- Parafilme
- Parafina
- Pinças
- Bisturis
- Autoclave
- Câmara de fluxo Laminar
- Balanças: uma para pesar pequenas quantidades e outra para pesar grandes quantidades.
- Medidor de pH para ajustar o meio e soluções.
- Vasos para o plantio das estacas na estufa.
- Insecticida e fungicida.



### 3.2. Métodos

Neste trabalho foram usadas plantas de duas variedades de mandioca, uma com alto teor de cianetos, 'Precoce de Angola' e outra com um teor médio de cianetos, 'Maria Maputo' ambas obtidas no Banco de Germoplasma do Instituto Nacional de Investigação Agronómica (INIA).

#### 3.2.1. Preparação das plantas "stock"

Para a preparação do material vegetal do qual se extraíram os explantes para a indução do calo utilizou-se o método "standard" de Sharp *et al.* (1984).

Retiraram-se estacas com 10 a 15 cm de comprimento, seleccionadas na parte média do caule das plantas existentes no Banco de Germoplasma. As estacas provenientes do campo foram mergulhadas numa solução fungicida e insecticida para desinfectar. Como fungicida usou-se o mancozeb+metalxyl WP 60%+10% (Sanlaxyl 70% WP) e como insecticida, o dimetoato EC 40%, (Perfekthion 40% EC) na proporção de 2 gr/l e 2,5 ml/l, respectivamente (Seregen *et al.* 1994). Após 15 minutos de imersão na solução, as estacas foram postas a secar durante alguns minutos ao ar livre. Em seguida, as extremidades superiores de cada estaca foram seladas com parafina derretida, para evitar a entrada de microrganismos e perda de água, e plantadas em vasos de 20 litros. As estacas foram deixadas a desenvolver na estufa. As plantas eram regadas diariamente com cerca de 500 ml água por vaso.

Após cerca de 5 semanas, rebentos novos tinham crescido o suficiente para se fazer a remoção de folhas e caules a partir dos quais se prepararam os explantes (porção da planta a ser submetida a cultura *in vitro*) para a indução dos calos.

#### 3.2.2. Preparação dos explantes

Para a indução de calo a partir de caules usou-se o método de Pollard e Walker (1990). Foram cortados pedaços de caule não lenhosos com 5 cm de comprimento. Os caules foram lavados em água destilada e depois removeram-se os explantes.

Para a desinfecção, os explantes foram lavados em água destilada e mergulhados numa solução de etanol a 70% durante 7 minutos. Em seguida, foram imersos numa solução de hipoclorito de sódio a 3,5% m/v, durante 15 minutos. Depois foram lavados com água destilada e esterelizada, por três vezes, em condições estéreis.

Os explantes de 5 cm foram divididos em explantes de 2 cm depois de ter-se descartado 2-3 mm das extremidades. Esses pedaços de 2 cm foram divididos longitudinalmente em dois e a parte cortada posta sobre o meio de cultura solidificado com ágar.

Na preparação dos explantes das folhas, adaptou-se o método "standard" de preparação de gemas de Sharp *et al.* (1984).

As folhas colectadas foram postas num recipiente com papel de filtro humedecido com água destilada. A desinfecção consistiu na lavagem rápida (1 minuto) em etanol a 70%, imersão durante 2-3 minutos numa solução de hipoclorito de sódio a 3,5% m/v e na lavagem sob condições estéreis, 4 vezes com água destilada e esterelizada.

Sob uma placa de petri esterelizada e com o auxílio de um bisturi e pinça prepararam-se explantes com dimensões de aproximadamente 2x4 mm. No corte destes explantes utilizou-se as extremidades junto ao pecíolo e evitou-se as nervuras principais e secundárias dos lóbulos das folhas. Seguidamente esses pedaços de folha foram transferidos para o meio de cultura.

### 3.2.3. Condições gerais de incubação

O meio de cultura base utilizado na determinação da melhor concentração de auxina, citocinina e açúcar foi o Murashige & Skoog (MS), 1962 (Anexo 1), uma forma comercial em pó da Flow Laboratories cuja proporção de mistura foi de 4,708 g/l de água destilada e esterelizada, sendo necessário acrescentar o açúcar, as hormonas e o ágar.

O meio foi solidificado com 0,8% de ágar.

O pH foi ajustado para 5,6 ou 5,8, usando-se para o efeito HCl 0,5N ou NaOH 1N que eram preparados em quantidades de 25 ml.

A auxina usada o 2,4-D, foi preparada em soluções stock de 1 mg/ml, segundo o método descrito por Gamborg, O.L. (1991) da seguinte maneira: Dissolveu-se a quantidade desejada de pó para fazer a solução stock geralmente 25mg, em 2 a 5ml de etanol adicionando-se depois gradualmente água destilada e esterelizada. Em seguida aqueceu-se lentamente e finalmente adicionou-se água até perfazer o volume final (25ml) neste caso. O pH deste stock de solução foi finalmente ajustado para 5, usando-se para tal, HCl 0,5N ou NaOH 1N. Depois, a solução era guardada na geladeira por períodos não superiores a 1 mês.

A cinetina também foi preparada em solução stock de 1mg/ml em quantidades de 25ml da seguinte maneira: Dissolveu-se a quantidade de pó desejada em 2 a 5ml de HCl 0,5 N, aqueceu-se lentamente e depois dissolveu-se com água destilada e esterelizada até perfazer o volume de 25 ml. Esta solução foi também guardada na geladeira e usada dentro de um período não superior a 3 meses.

O aparecimento do calo teve sempre início na parte do caule em contacto com o ágar nas duas variedades e nos dois tipos de explantes usados.

Os explantes foram incubados em placas de petri estéreis sobre o meio de cultura separados por um papel de filtro esterelizado para facilitar o manuseamento do calo durante a pesagem, evitava-se desta maneira que pedaços de meio viessem aderidos ao calo alterando assim o peso.

As amostras foram mantidas nas condições normais do laboratório. Não foi possível controlar as seguintes variáveis: temperatura (27-28°C), iluminação (não superior a 2000 lux), fotoperíodo (14-16 h) e qualidade luminosa (luz diurna através de lâmpadas fluorescentes).

#### 3.2.4. Determinação da melhor concentração de Auxinas

Para a determinação da melhor concentração de auxinas realizaram-se 4 experiências que variaram entre si na variedade e no tipo de explante utilizado, conforme o seguinte:

- Experiência 1: Explante do caule da variedade 'Maria Maputo'
- Experiência 2: Explante da folha da variedade 'Maria Maputo'
- Experiência 3: Explante do caule da variedade 'Precoce de Angola'
- Experiência 4: Explante da folha da variedade 'Precoce de Angola'

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com oito tratamentos, dez repetições e um tipo explante por repetição. Os tratamentos consistiram em 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

Ao MS adicionou-se 5  $\mu\text{M}$  de cinetina e 0,058 M de açúcar.

#### 3.2.5. Determinação da melhor concentração de Citocininas

Para a determinação da melhor concentração de citocinina realizaram-se 4 ensaios que variaram entre si na variedade, no tipo de explante utilizado e na concentração de 2,4-D (7  $\mu\text{M}$  de 2,4-D para os explantes de caule e 4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D para os explantes de folha), conforme o seguinte:

- Experiência 1: Explante do caule da variedade 'Maria Maputo', 7  $\mu\text{M}$  de 2,4-D;
- Experiência 2: Explante da folha da variedade 'Maria Maputo', 4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D;
- Experiência 3: Explante do caule da variedade 'Precoce de Angola', 7  $\mu\text{M}$  de 2,4-D;
- Experiência 4: Explante da folha da variedade 'Precoce de Angola', 4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com dez tratamentos, dez repetições e um explante por repetição. Os tratamentos consistiram em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10  $\mu\text{M}$  de cinetina.

Ao MS adicionou-se 0,058 M de açúcar.

### 3.2.6. Determinação da melhor concentração de açúcar

Para a determinação da melhor concentração de açúcar realizaram-se 4 experiências que variaram entre si na variedade, no tipo de explante, na concentração de auxina e citocinina (4  $\mu\text{M}$  de cinetina para os explantes de caule e 6  $\mu\text{M}$  para os explantes de folha), conforme o seguinte:

- Experiência 1: Calo do caule da variedade 'Maria Maputo', 7  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 4  $\mu\text{M}$  cinetina;
- Experiência 2: Calo da folha da variedade 'Maria Maputo', 4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 6  $\mu\text{M}$  cinetina;
- Experiência 3: Calo do caule da variedade 'Precoce de Angola', 7  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 4  $\mu\text{M}$  cinetina;
- Experiência 4: Calo da folha da variedade 'Precoce de Angola', 4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 6  $\mu\text{M}$  cinetina.

Os calos foram obtidos do melhor tratamento das duas experiências anteriores (determinação da melhor concentração de auxinas e determinação da melhor concentração de citocininas). Isto deveu-se ao facto de no período de montagem da última experiência não existirem plantas "stock" das duas variedades em estudo, em condições para a incubação, quer na estufa quer no Banco de Germoplasma do INIA, devido ao facto destas se desenvolverem menos na época fria e serem mais susceptíveis a ataques por pragas e fungos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com dez tratamentos, dez repetições e um tipo de explante por repetição. Os tratamentos consistiram em 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 e 0,10 M de açúcar.

### 3.2.7. Medida de crescimento

A análise da concentração óptima de auxinas, citocininas e açúcar em cada tipo de explante fez-se medindo-se o crescimento obtido, através do peso médio de matéria fresca/concentração/variedade, pelo método standard de Dodds e Roberts (1995).

O método consistiu na comparação do peso da matéria fresca de explantes não submetidos a cultura *in vitro* com mesmas dimensões que os explantes cultivados e explantes cultivados com crescimento de

*vitro* com mesmas dimensões que os explantes cultivados e explantes cultivados com crescimento de

calos em diferentes períodos de crescimento. No caso das folhas pesaram-se pedaços de folhas idênticos aos pedaços incubados no primeiro dia, e a segunda pesagem foi feita no 30º dia de cada experimento isto porque os explantes provenientes das folhas apresentavam um crescimento de calo muito insignificante no 15º dia, tendo sido feitas portanto só duas medições no caso das folhas. No caso de explantes provenientes de caules com crescimento mais acentuado em função da concentração hormonal usada foram pesados em três períodos diferentes de crescimento (1º, 15º e 30º dia).

Para cada período foi subtraído o valor médio dos explantes não cultivados do valor médio do peso da amostra fresca, usando-se para calcular essa média 10 explantes/período/concentração.

Após, cada período de crescimento, 10 explantes foram pesados e a determinação da melhor concentração em cada experiência foi feita graficamente, através do cálculo de aumento de peso relativo dos calos ao fim de 30 dias de incubação por experiência.

### 3.2.8. Análise dos Dados

Foi usado o teste de análise de variância (Anova G com regressão) para desdobrar nos componentes da regressão.

Segundo Gomes (1990), “a análise de variância tal como é feita usualmente pressupõe a independência dos diversos tratamentos utilizados. Quando esta hipótese não se verifica, a análise da variância deve reflectir a dependência entre os tratamentos, sob pena de não ser válida. Assim acontece no caso em que os tratamentos são quantitativos com mais de dois níveis e se justifica a existência de uma correspondência funcional chamada equação de regressão que ligue os valores dos tratamentos (x) aos dados analisados (y).”

A análise de dados do presente trabalho foi quantitativa (baseou-se na medição do crescimento de calos ao fim de 30 dias sob efeito de diferentes concentrações de auxinas, citocininas e açúcares).

O determinante considerado no presente trabalho foi o  $R^2$  da equação de regressão com maior percentagem.

### 3.2.9. Determinação de glicosídeos cianogénicos

Após o estabelecimento dos calos, estes foram mantidos através de sub-culturas isto é, pela transferência periódica (mensal) para meios nutritivos frescos.

Para a determinação dos glicosídeos cianogénicos em função da temperatura os calos foram submetidos a diferentes temperatura ( $10^{\circ}\text{C}$ ,  $24^{\circ}\text{C}$ ,  $28,3^{\circ}\text{C}$  e  $29^{\circ}\text{C}$ ) durante 3 dias.

Para a determinação dos glicosídeos cianogénicos em função do pH os calos foram submetidos a diferentes pH (4, 4,5, 6,5, 7, 8 e 9), durante 3 dias. Para os ajustes do pH foram usados  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e ácido cítrico.

O conteúdo de glicosídeos cianogénicos foi determinado e comparado com o de calos mantidos sob condições "standard".

Para a determinação dos glicosídeos cianogénicos utilizou-se o método standard de Bradbury *et al.* (1994):

#### a) Extracção

Os calos foram misturados durante 2-3 minutos num liquidificador com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 0.1M, sendo a proporção de mistura de 20 gr de calos para 100 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M. A mistura foi lavada e filtrada numa bomba de água através de papel de filtro, Whatman N°1, até perfazer 100 ml com o mesmo ácido num frasco volumétrico.

b) Hidrólise

2.0 ml dessa solução e 2.0 ml de  $H_2SO_4$  a 4M foram aquecidos num tubo de ensaio fechado durante 50 minutos em banho Maria. Depois, deixou-se arrefecer até atingir a temperatura ambiente e adicionou-se 5 ml de NaOH a 3,6 M. A solução foi filtrada (quando necessário) e deixou-se repousar durante 5-10 minutos para permitir a quebra de cianidrina em cianeto.

c) Determinação colorimétrica

Para preparar o acetato (2 M tampão a pH = 5), adicionou-se ao ácido acético (0,2 M) gotas de NaOH (5 M) até atingir pH 5.

Num tubo de ensaio fechado com rolha com capacidade para 10 ml, misturou-se 7 ml de acetato, 1 ml de solução alcalina de cianeto e 0,4 ml de solução de T-chloramine. A solução de T-chloramine foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de T-chloramine em 100 ml de água destilada.

Após 5 minutos à temperatura ambiente, 1,6 ml de ácido isonicotínico/ácido barbitúrico foi adicionado. O ácido foi preparado pela adição de 0,8 g de ácido barbitúrico e 0,4 g de ácido isonicotínico em 50 ml de NaOH a 0,2 M.

A cor azul desenvolveu-se à temperatura ambiente e a absorvância (A) foi medida a 600 nm. A cor era estável entre 40 a 80 minutos.

A absorvância da solução de coloração azul foi medida pelo branco da água destilada.

A absorvância foi convertida para  $\mu g$  de KCN pelo uso de uma estreita linha de calibração de absorvância diante de uma quantidade de KCN em 10 ml de solução colorida.

d) Linha de calibração

A linha de calibração foi produzida pela dissolução de 37,5 mg de KCN seco em 500 ml de NaOH a 0,2 M.

Quantidades de 0,2, 0,4, 0,8, 1,2 e 1,6 ml foram diluídas até 10 ml com NaOH a 0,2 M. Aliquotas de 1 ml de cada diluição foram misturadas a 7 ml de acetato a 0,2 M (pH=5) e 0,4 ml de T-chloramine e 1,6 ml de ácido isonicotínico/ácido barbitúrico.



A quantidade de KCN presente em 10 ml da solução colorida cobria uma área de 1,5 a 12  $\mu\text{g}$ .

A absorvância da solução foi convertida para  $\mu\text{g}$  de KCN (Y) em 10 ml de solução. A quantidade equivalente de KCN em mg/Kg do peso de matéria fresca da mandioca é dada pela seguinte equação:

$$\text{KCN} = \frac{1,868 * Y * V}{W}$$

Onde:

KCN é dado em mg de KCN por Kg de peso de matéria fresca do calo;

Y é  $\mu\text{g}$  de KCN em 10 ml de solução;

V é o volume da solução;

W é o peso de matéria fresca do calo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Concentração de Auxinas

O Quadro 1 apresenta o resumo da análise de variância do efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos a partir de folhas e caules de duas variedades de mandioca.

**Quadro 1.** Resumo da análise de variância do aumento relativo de peso dos calos em função de diferentes concentrações de 2,4-D.

	Quadrados Médios				
	G.L.	Precoce de Angola		Maria Maputo	
		Caule	Folha	Caule	Folha
Tratamento	7	1320077 **	0,3571238x10 <sup>9</sup> **	936089,9 **	0,1418986x10 <sup>8</sup> **
Linear	1	1598429	0,8840182x10 <sup>8</sup>	330652,4	2887247,70 89 //
Quadrático	1	2088219*	1788134x10 <sup>9</sup>	1152714**	2524345 x10 <sup>8</sup> **
Cúbico	1	39954,21	0,5623686 x10 <sup>9</sup> **	34338,49	0,3327126 x10 <sup>8</sup> **
Desvio		3893154,8	1,3088 x10 <sup>9</sup> 9	3698365,7	28109294 x10 <sup>8</sup> 9 2
Resíduo	72	439125,7	0,6018251x10 <sup>9</sup> 9	97483,41	2159860 x10 <sup>8</sup> 9
C.V. (%)		80,14	50,58	53,88	113,45

\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

C. V. Coeficiente de variação

GL Graus de liberdade

Com base nos resultados (Quadro 1 e Figuras 1 a 4) verificou-se que as concentrações de 2,4-D influenciaram, significativamente, de forma quadrática o crescimento dos calos obtidos a partir de caules das duas variedades (figuras 1 e 3) e, de forma cúbica, os obtidos a partir das folhas das duas variedades (figuras 2 e 4).

O modelo linear não apresenta resultado significativo nem para os caules nem para as folhas.

A percentagem dos coeficientes de variação no caso dos caules variaram de 54% a 80% e no caso das folhas, de 50,58% a 113,4%.

Os quadrados médios dos tratamentos foram significativos ao nível de 1%, pelo teste F, quer para P.A. como para M.M.

As Figuras 1, 2, 3 e 4 apresentam os gráficos resultantes da análise de regressão. O Anexo 2 apresenta os valores médios do crescimento relativo obtidos ao fim de 30 dias de crescimento.

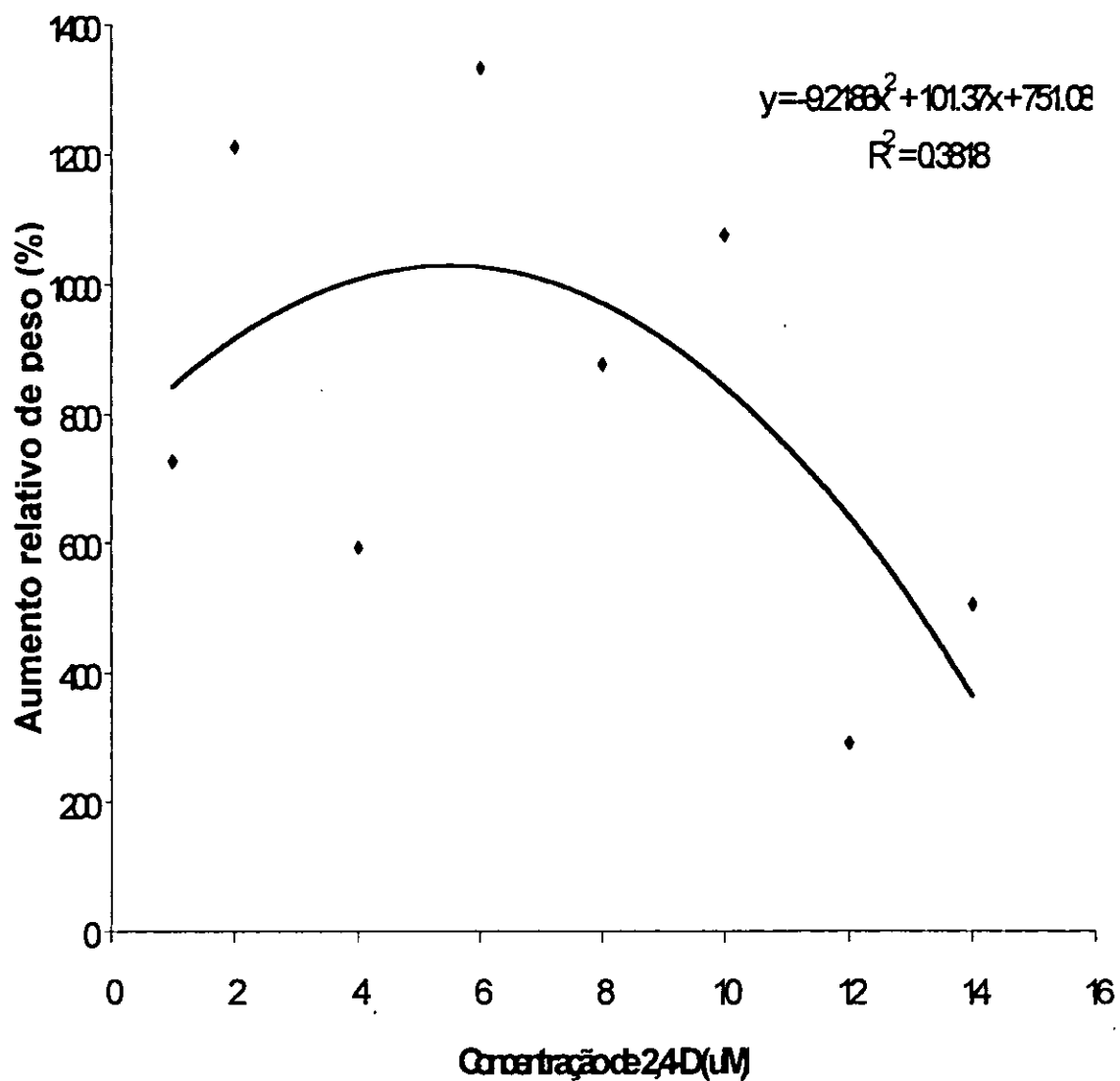


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos obtidos a partir de explantes de caules da variedade "Precoce de Angola".

A concentração óptima de 2,4-D foi de 5,5 µM para os calos resultantes de caule de P.A. segundo a equação resultante do modelo de linha de regressão do gráfico.

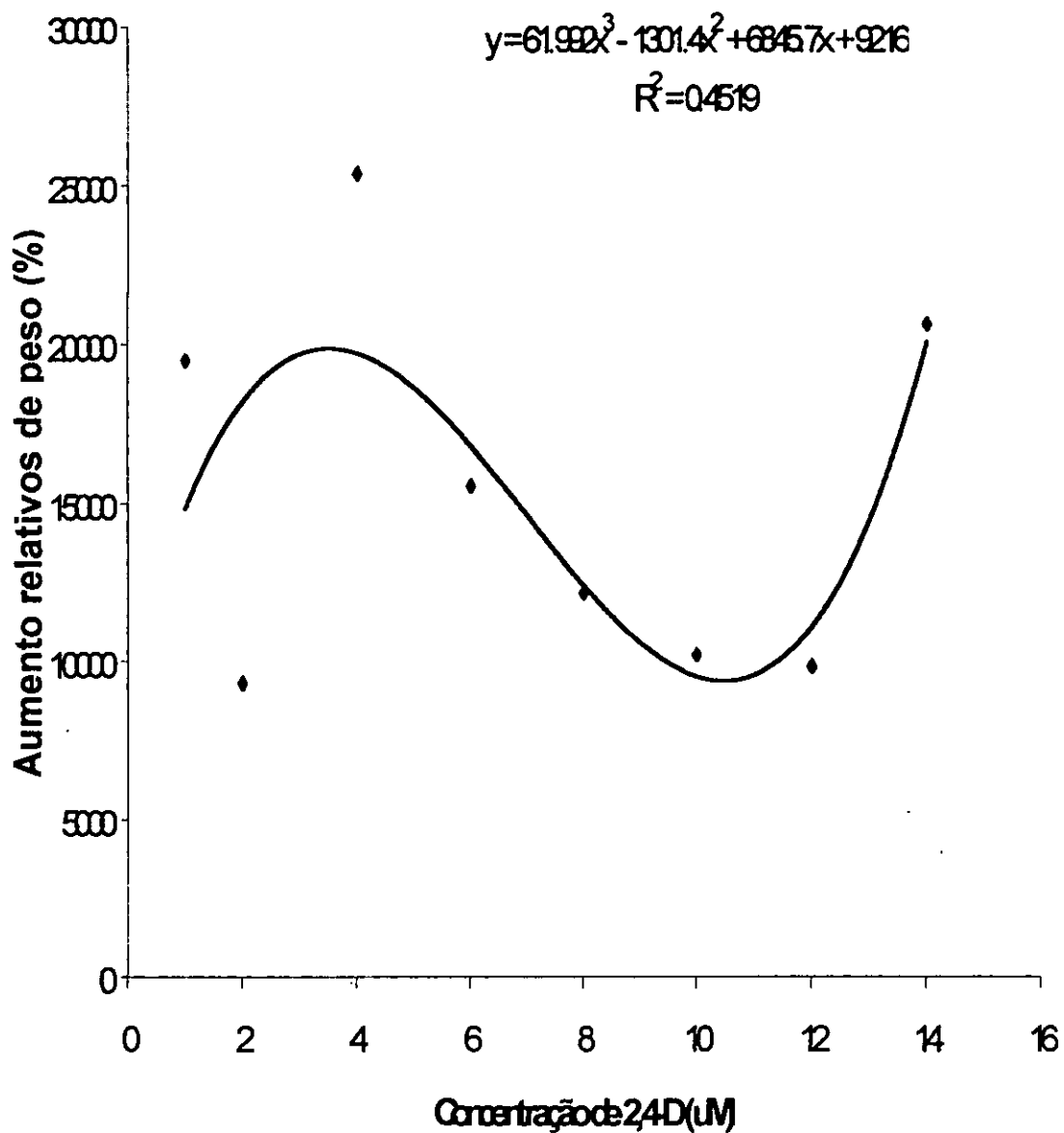


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos obtidos a partir de explantes folhas da variedade "Precoce de Angola".

Aqui a concentração óptima de 2,4-D para os calos resultantes de folhas de P.A. segundo a equação do gráfico, está no intervalo entre 3,5 µM e 10,5 µM.

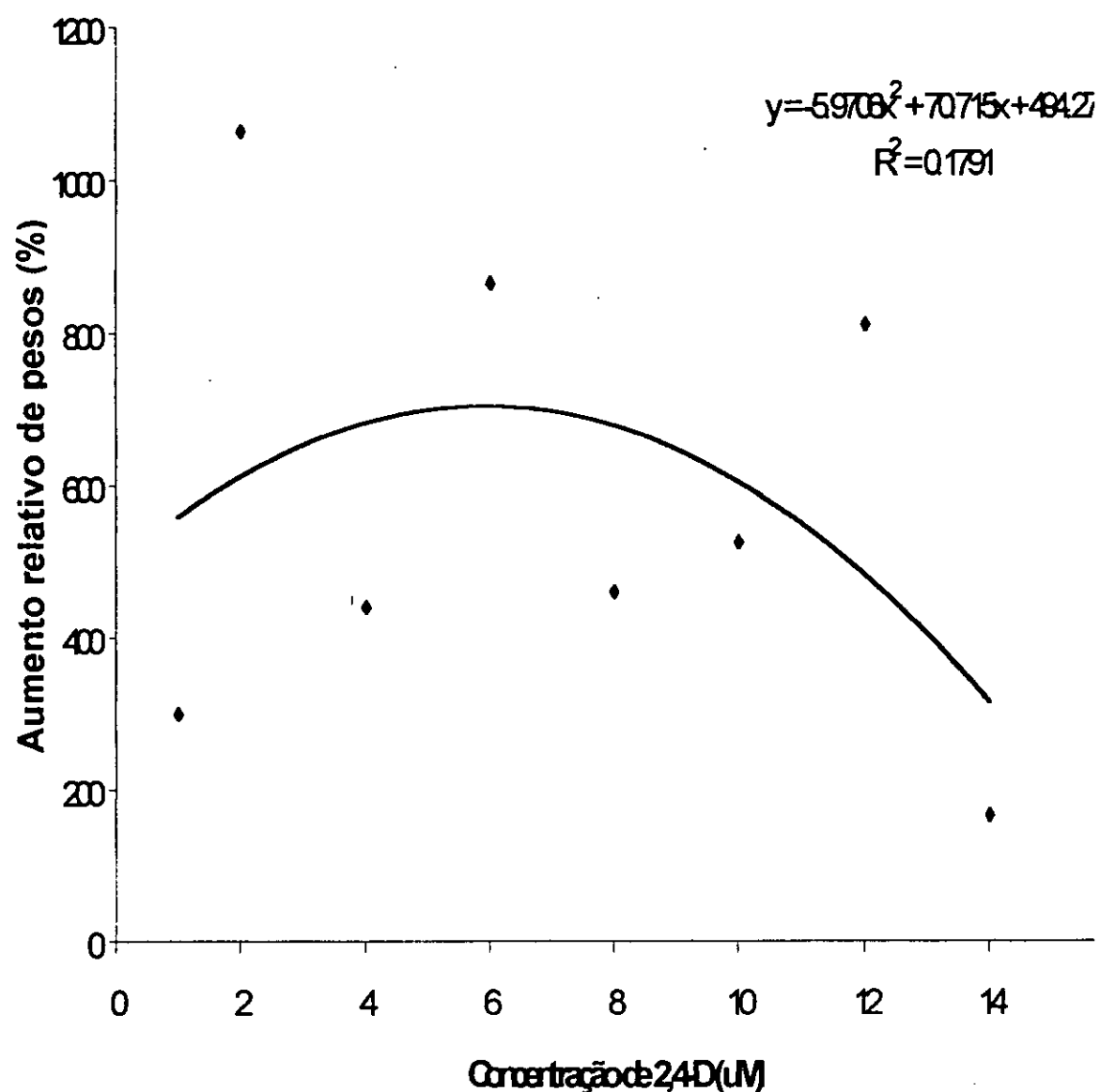


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos obtidos a partir de explantes de caules da variedade “Maria Maputo”.

A concentração óptima de 2,4-D foi de 5,9  $\mu\text{M}$  para os calos resultantes de caule de M.M. segundo a equação do gráfico de regressão.

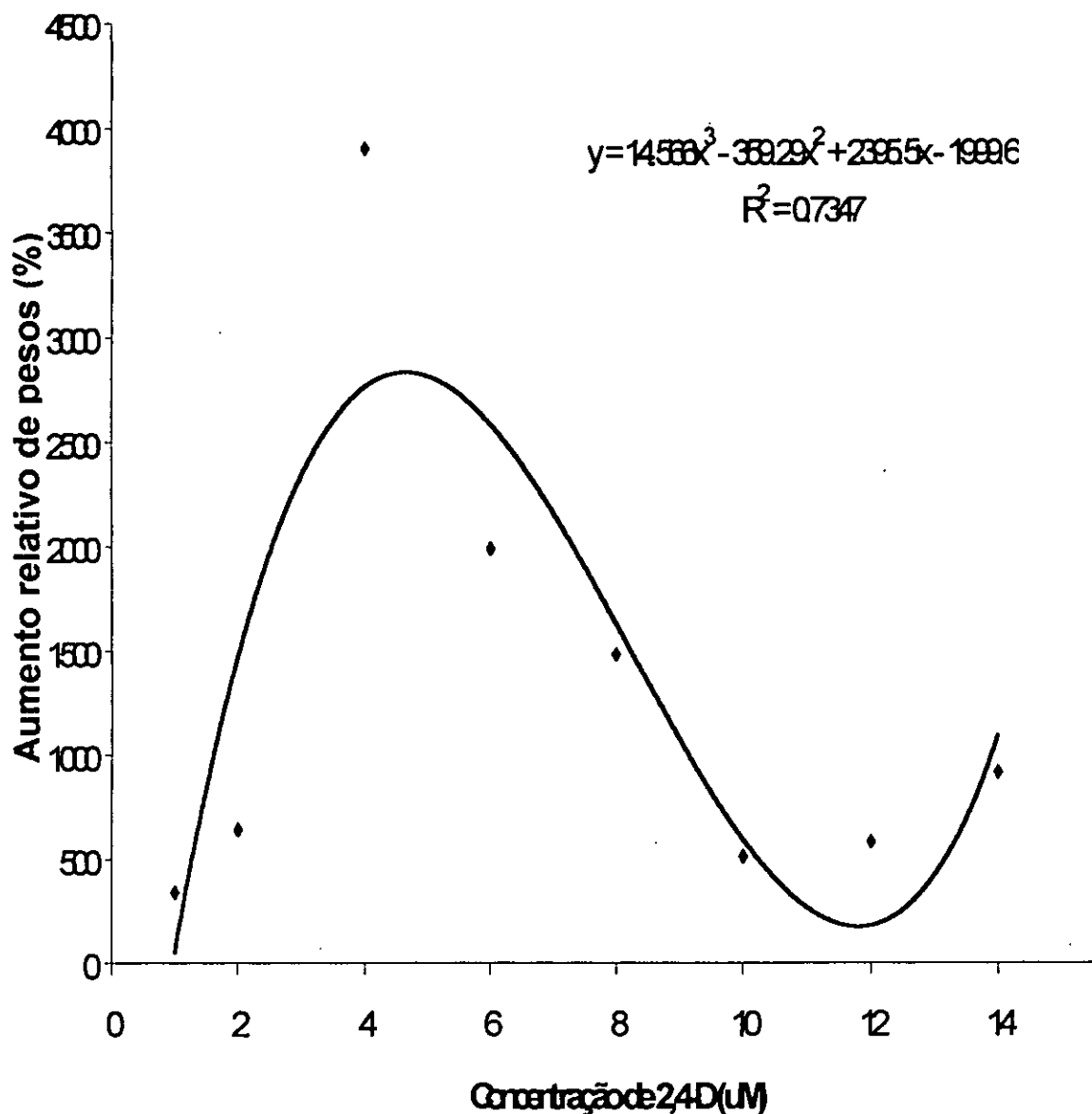


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos obtidos a partir de explantes folhas da variedade "Maria Maputo".

Aqui a concentração ótima de 2,4-D para os calos resultantes de folhas de M.M. segundo a equação do gráfico, está no intervalo entre 4,6 µM e 11,8 µM.

## 4.2. Concentração de Citocininas

O Quadro 2 apresenta o resumo da análise de variância do efeito de diferentes concentrações de Cinetina na indução de calos a partir de folhas e caules de duas variedades de mandioca.

**Quadro 2.** Resumo da análise de variância do aumento relativo de peso dos calos em função de diferentes concentrações de Cinetina

	G.L.	Quadrados Médios			
		Precoce de Angola		Maria Maputo	
		Caule	Folha	Caule	Folha
Tratamento	9	495955.2**	4303050x10 <sup>8</sup> **	1277363.0**	0,8807277 x10 <sup>9</sup> **
Linear	1	364306.3	0,2698432x10 <sup>9</sup> **	49011966**	0,1210513x10 <sup>10</sup>
Quadrático	1	153829.0	0,1314151x10 <sup>8</sup>	277143.0	0,1998444 x10 <sup>9</sup> **
Cúbico	1	6264445,8**	0,4432795 x10 <sup>8</sup> **	1935005**	0,5659236 x10 <sup>9</sup>
Desvio		1469073,9	37112864	1632626,8	2,4242 x10 <sup>9</sup>
Resíduo	90	96865,92	73311470,0	454590.9	0,1889914 x10 <sup>9</sup>
C.V. (%)		73,58	53,66	86,09	101,284

\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

C.V. Coeficiente de variação

GL Graus de liberdade

Com base nos resultados apresentados no Quadro 2 todos tratamentos referentes tanto aos caules como as folhas foram significativamente positivos ao nível de 1% pelo teste F.

Os coeficientes de variação (C.V.) no caso dos caules variam entre 73,5% e 86% e no caso das folhas



variaram entre 53,6% e 101,2%.

Os calos provenientes de caule de P.A. apresenta o componente cúbico como significativo a nível de 1% pelo teste F; não sendo os componentes linear e quadrático significativos neste caso.

Para os calos resultantes de folhas de P.A. só a componente quadrática não apresenta qualquer significância. As componentes linear e cúbica são significativas a 1% pelo teste F tendo optado pela componente cúbica por esta apresentar um  $R^2$  maior. ( $R^2$  da componente linear 72%;  $R^2$  da componente cúbica 85%).

No caso dos calos provenientes de caule de M.M. a componente quadrática não foi significativa, tendo as componentes linear significância a 1% pelo teste F e cúbica 5% pelo teste F. Neste caso optou-se pelo componente cúbica por apresentar um  $R^2$  maior ( $R^2$  da componente linear 43%;  $R^2$  da componente cúbica 62%).

Na folha de M.M. só a componente linear é significativa a 1% pelo teste F. Todas as outras componentes não são significativas.

As Figuras 5, 6, 7 e 8 apresentam os gráficos resultantes da análise de regressão e o Anexo 3 apresenta os valores médios do crescimento relativo obtidos ao fim de 30 dias de crescimento.

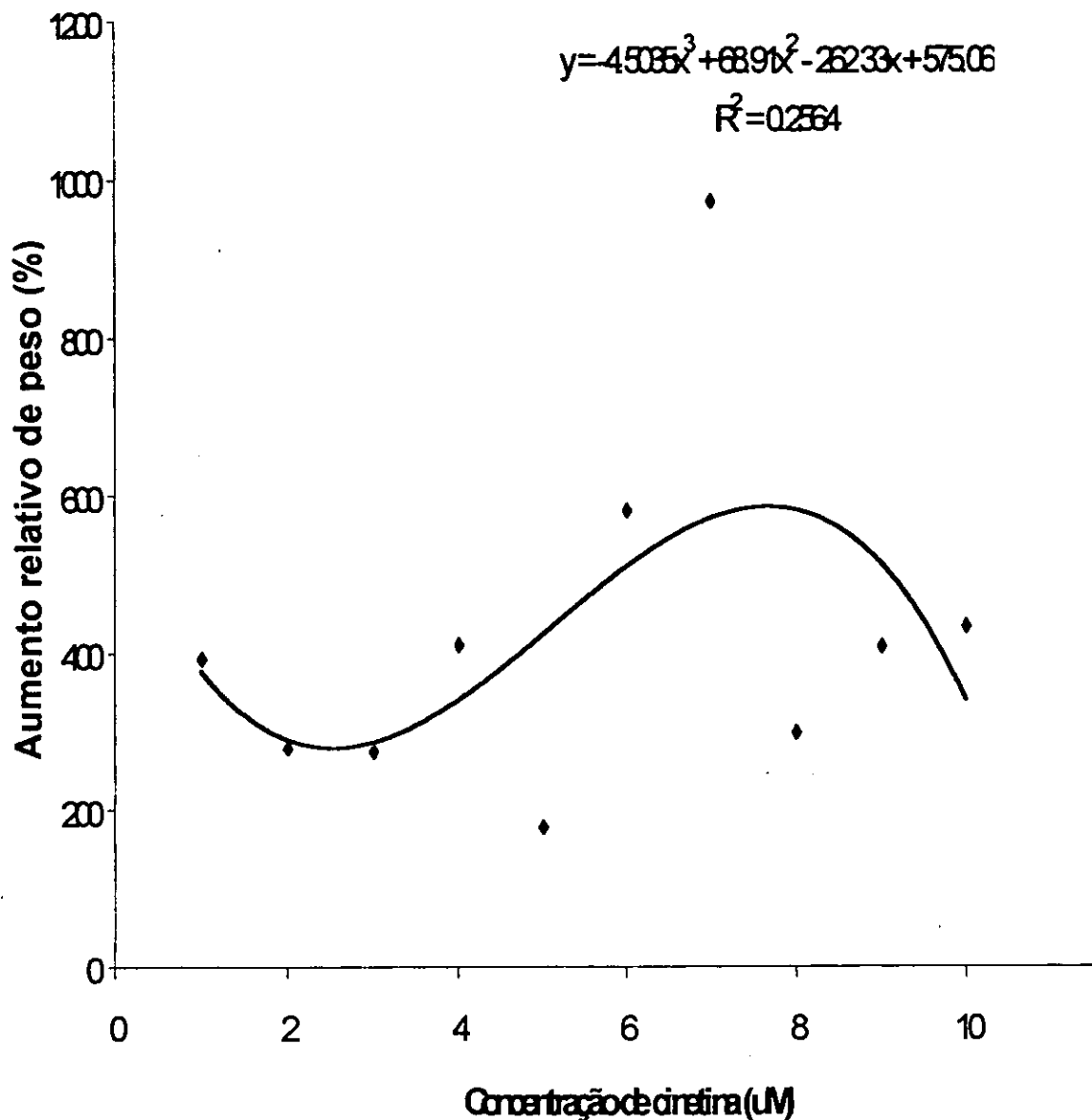


Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de cinetina no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos obtidos a partir de explantes de caules da variedade "Maria Maputo".

A concentração óptima de cinetina para os calos resultantes de caule de P.A. segundo a equação do gráfico, está no intervalo entre 2,5 µM e 7,7 µM.

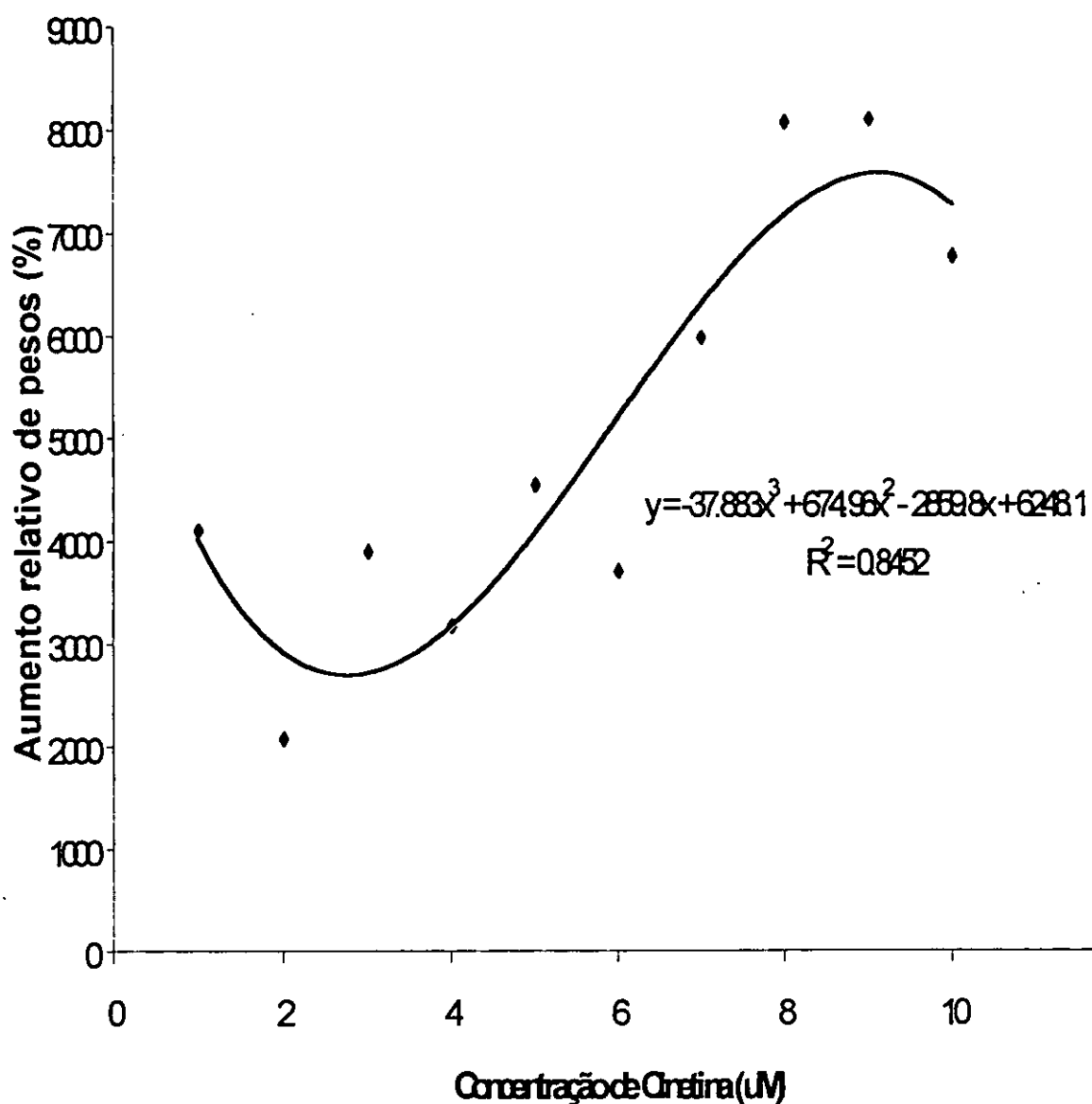


Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de cinetina no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos obtidos a partir de explantes folhas da variedade Precoce de Angola.

A concentração óptima de cinetina para os calos resultantes de folha de P.A. segundo a equação do gráfico, está no intervalo entre 2,75 µM e 9,1 µM.

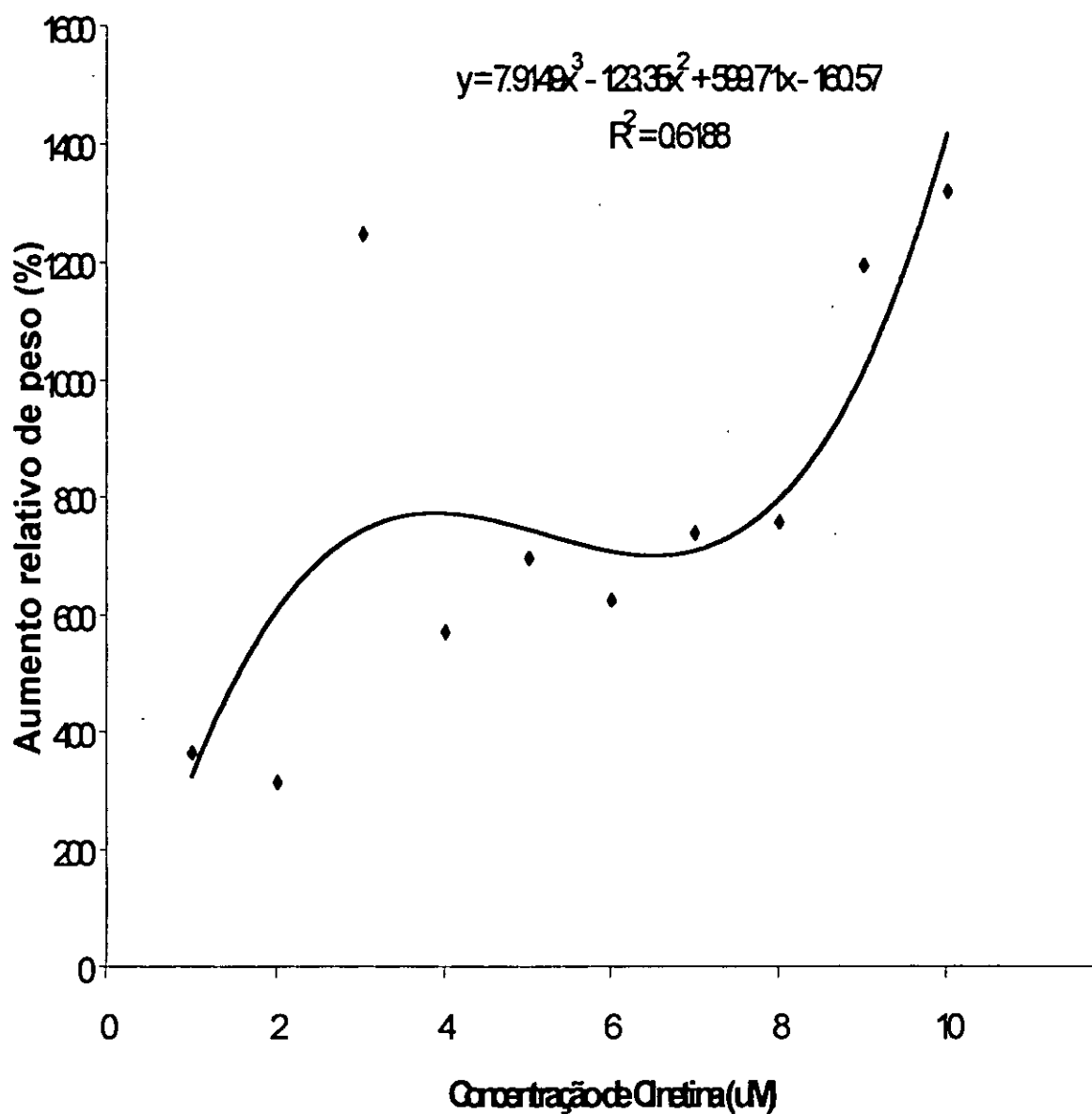


Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de cinetina no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos obtidos a partir de explantes de caules da variedade "Maria Maputo".

A concentração óptima de cinetina para os calos resultantes de caules da variedade M. M. segundo a equação do gráfico, está no intervalo entre 3,87 µM e 6,5 µM.

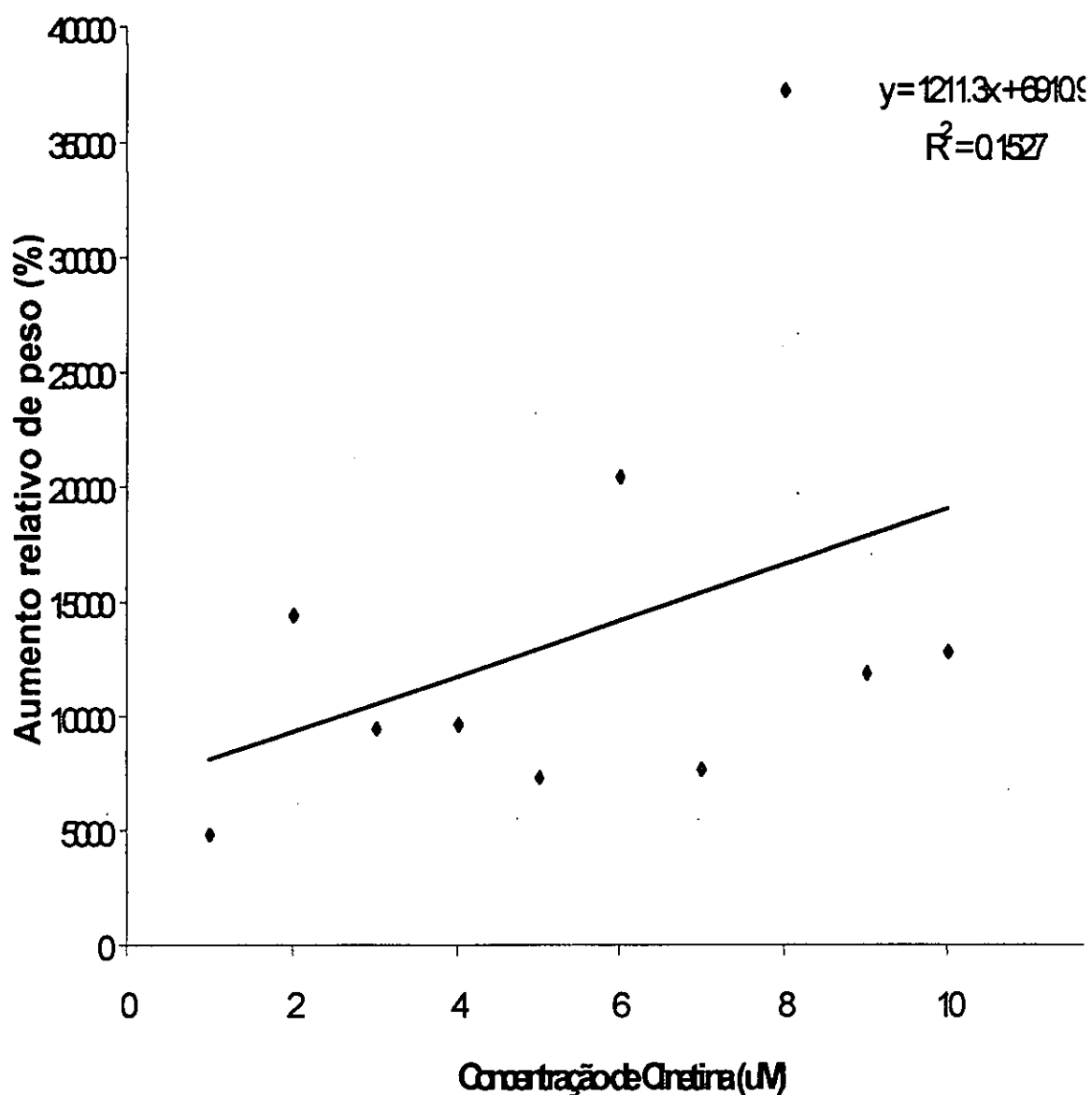


Figura 8. Efeito de diferentes concentrações de cinetina no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos obtidos a partir de explantes folhas da variedade “Maria Maputo”.

A concentração óptima de cinetina para os calos resultantes de folhas da variedade M. M. segundo a equação do gráfico é de 5,7 µM. A linha do gráfico sugere que o peso foi aumentando com o aumento da concentração de cinetina.

### 4.3. Concentração de açúcar

O Quadro 3 apresenta o resumo da análise de variância do efeito de diferentes concentrações de açúcar na indução de calos a partir de folhas e caules de duas variedades de mandioca.

**Quadro 3.** Resumo da análise de variância do aumento relativo de peso dos calos em função de diferentes concentrações de açúcar.

	Precoce de Angola				Maria Maputo			
	Caule		Folha		Caule		Folha	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tratamento	7	303137,7**	9	143968,7**	8	3208291**	6	117084,5**
Linear	1	34100,06	1	15126,89	1	433973,3*	1	52,05365
Quadrático	1	223836,3*	1	192933,8*	1	6109721**	1	7915,71
Cúbico	1	240891,5*	1	852,01	1	698608,3**	1	305623,9**
Desvio	4	1181523,6	6	733639,8	5	12214576,0	3	388915,4
Resíduo	69	51932,57	77	491144,64	81	100622,3	62	40544,36
C.V. (%)		108,85		72,45		74,49		108,87

\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

C.V.(%) Coeficiente de variação

GL Graus de liberdade

QM Quadrado Médio

O quadro 3 apresenta o resultado da análise de variância no aumento relativo de peso de calos em função

de diferentes concentrações de açúcar. Todos os tratamentos foram significativos a 1% de probabilidade pelo teste F.

Os graus de liberdade diferem nesta experiência porque houve perda de tratamentos e em outros casos de repetições porque houve infecções e não foi possível incubar novos calos por falta de tempo e também de calos.

Os calos resultantes de caules de P.A. mostraram efeito quadrático e cúbico significativo a 5% pela análise de variância, tendo-se optado pelo modelo cúbico por este apresentar uma maior percentagem de significância ( $R^2$  da componente quadrática 12% ;  $R^2$  da componente cúbica 24%).

Os calos resultantes de caules de M.M. mostraram efeito linear, quadrático e cúbico significativos tendo-se optado pelo modelo de linha cúbico por esta apresentar maior nível de significância. ( $R^2$  da componente linear 43% ;  $R^2$  da componente cúbica 62%).

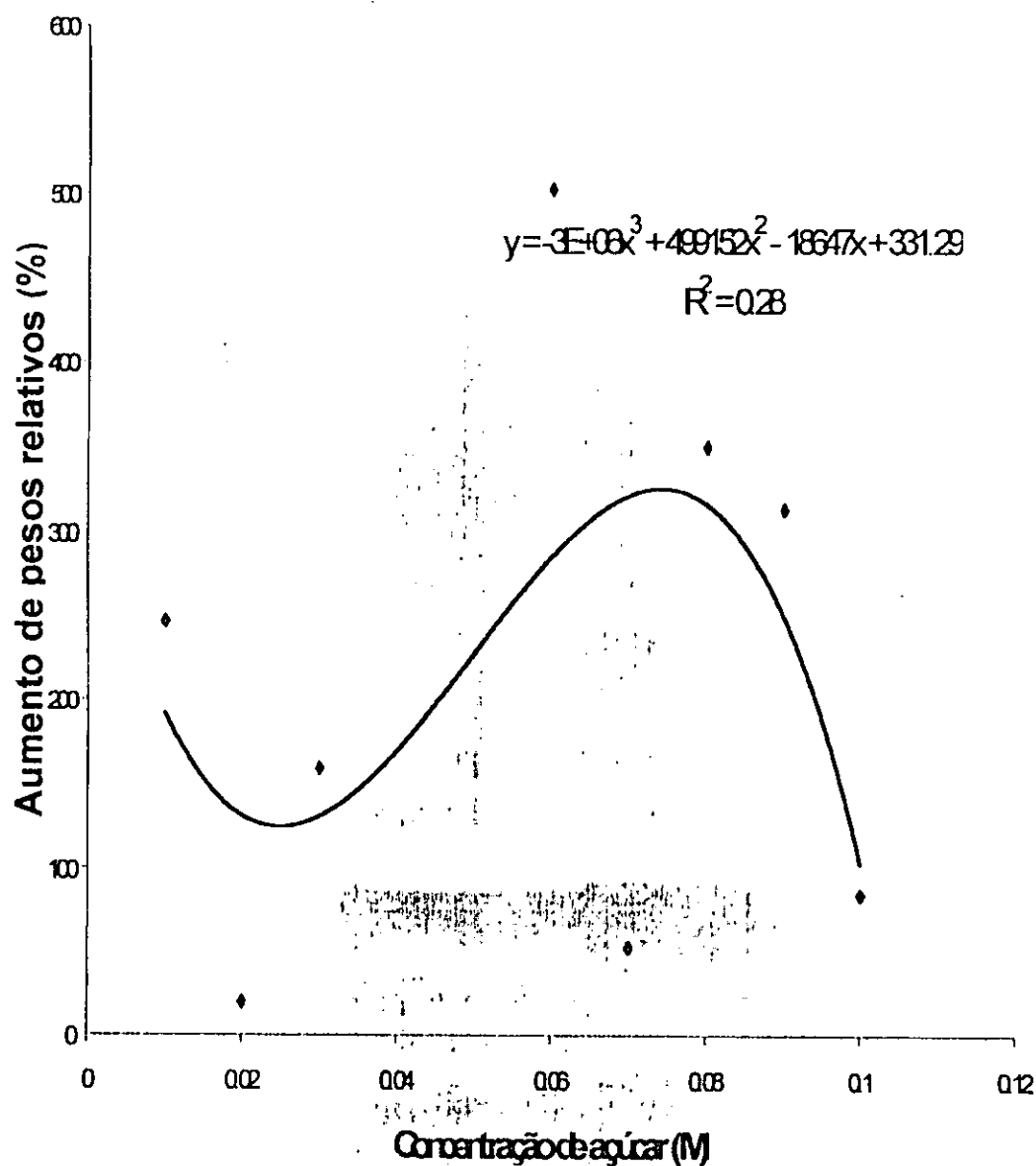
No caso das folhas de P.A. o modelo quadrático foi o mais significativo não tendo os modelos linear e cúbico significância segundo a análise de variância.

Nas folhas de M.M. também o modelo cúbico foi o que apresentou maior significância.

Nesta experiência os coeficientes de variação (CV) dos calos resultantes de caules variaram entre 74,4% e 108,8% e dos calos resultantes de folhas variaram entre 72,4% e 108,8%.

Como se pode observar no Anexo 4, na experiência em relação ao caule de P.A. perderam-se os tratamentos referentes a 0,04M e 0,05M de açúcar e no caso da folha de M.M. perdeu-se o tratamento de 0,05 M de açúcar com 0,04M; 0,05M e 0,1M de açúcar. *Popule*

As Figuras 9, 10, 11 e 12 apresentam os gráficos resultantes da análise de regressão e o Anexo 4 apresenta os valores médios do crescimento relativo obtidos ao fim de 30 dias de crescimento.



**Figura 9.** Efeito de diferentes concentrações de sacarose no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos provenientes de caules da variedade Precoce de Angola.

Não foram calculadas as melhores concentrações de açúcar de acordo com a equação do gráfico, neste caso, porque perderam-se os resultados referentes ao tratamento com 0,04 M e 0,05 M de açúcar ( veja Anexo 4). O modelo de linha da regressão pode não ser o mais correcto.



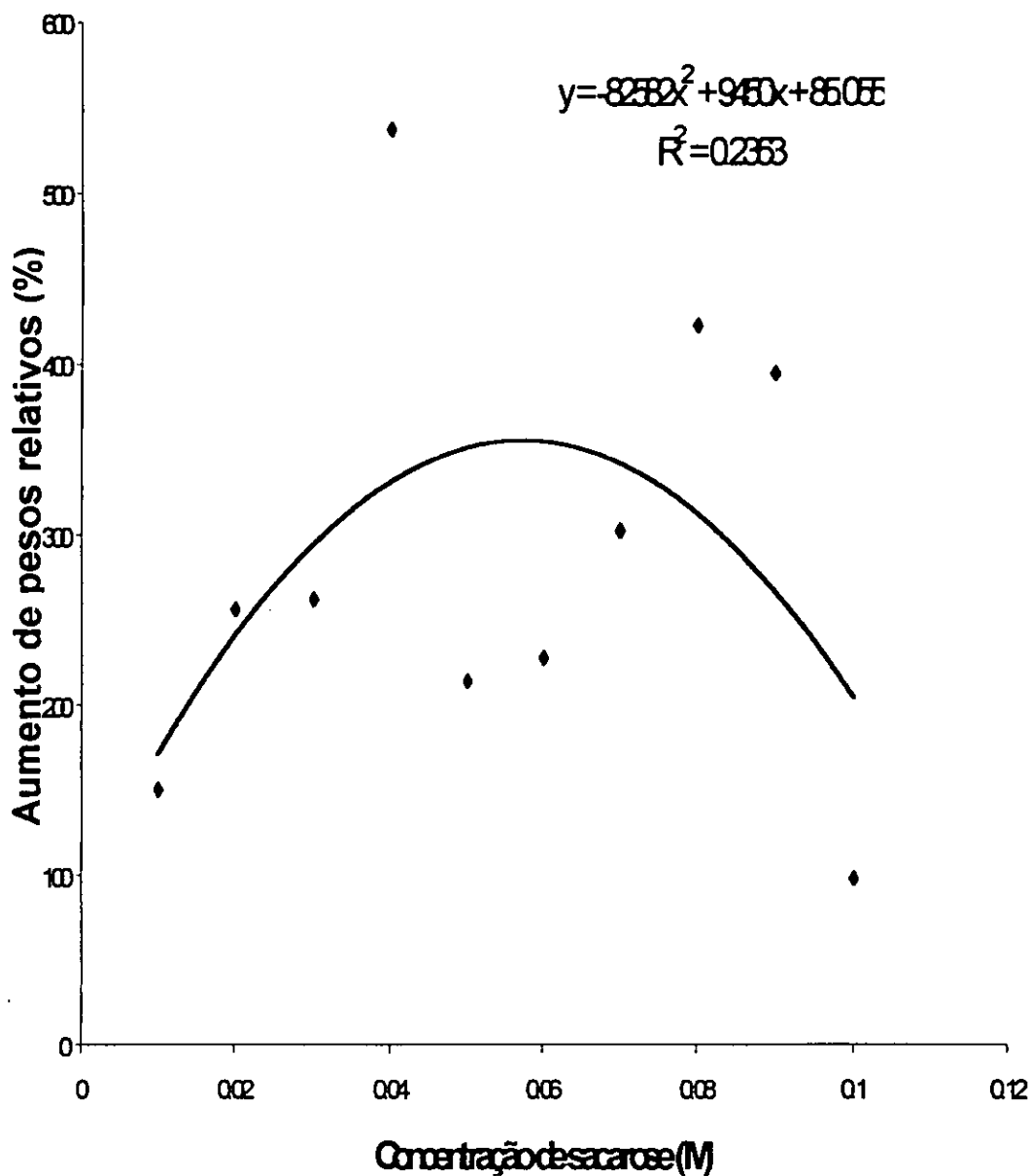


Figura 10. Efeito de diferentes concentrações de sacarose no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos provenientes folhas da variedade "Precoce de Angola".

A concentração óptima de sacarose foi de 0,057 M segundo a equação do gráfico da análise de regressão.

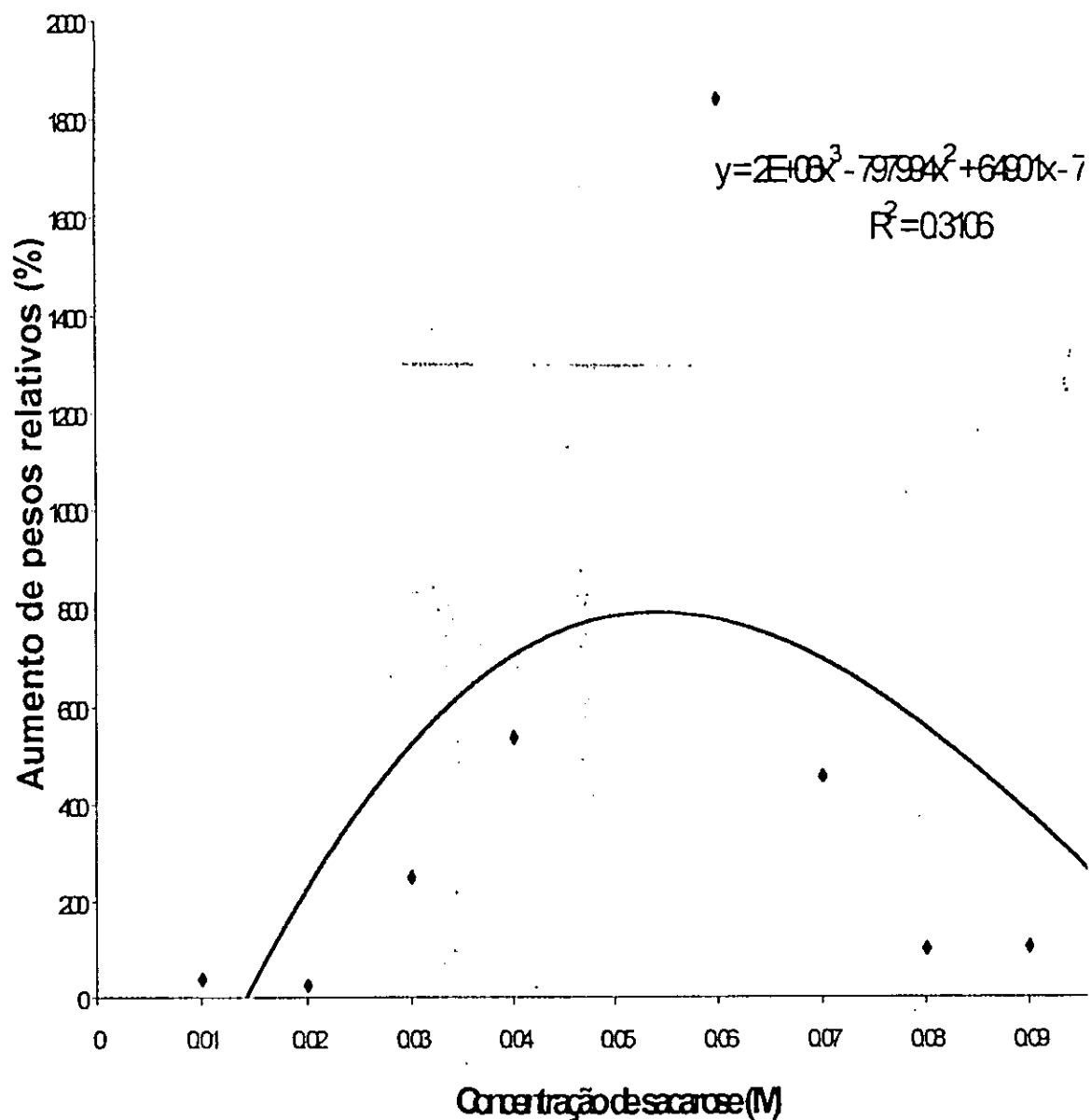


Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de sacarose no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos provenientes de caules da variedade Maria Maputo.

Nesta figura, não foram calculadas as melhores concentrações de açúcar de acordo com a equação do gráfico, porque perderam-se os resultados referentes aos tratamentos com 0,05 M de açúcar ( veja Anexo 4). O modelo de linha da regressão pode não ser o mais correcto.

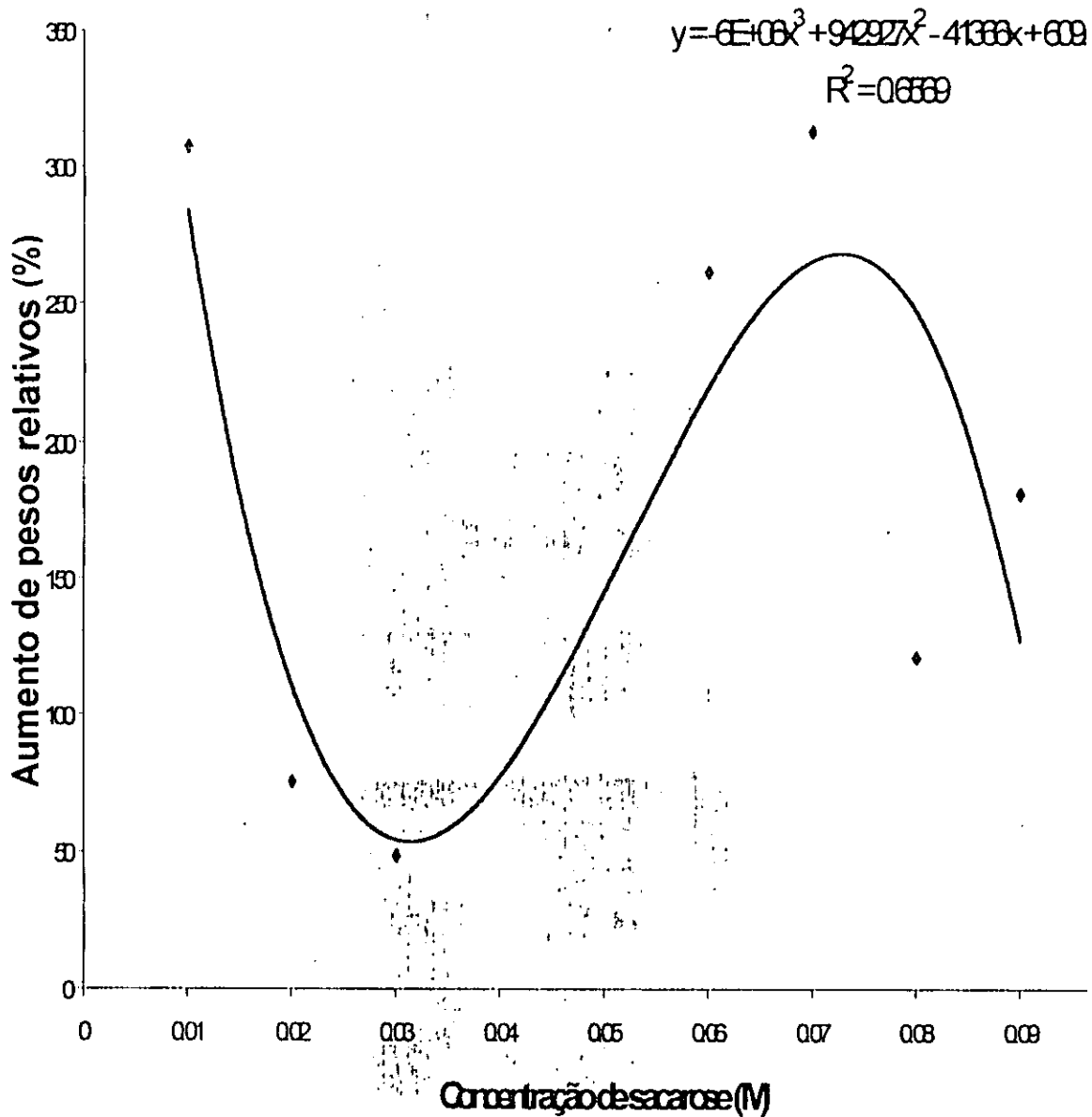


Figura 12 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no aumento de peso relativo ao fim de 30 dias de calos provenientes de folha da variedade Maria Maputo.

Nesta figura, não foram calculadas as melhores concentrações de açúcar de acordo com a equação do gráfico, porque perderam-se os resultados referentes aos tratamentos com 0,04 M; 0,05 M e 0,1M de açúcar ( veja Anexo 4). Este facto poderia levar a uma interpretação errada dos resultados.

#### 4.4. Biossíntese de glicosídeos cianogénicos

A Figura 13 apresenta a linha de calibração obtida pela solução padrão de KCN.

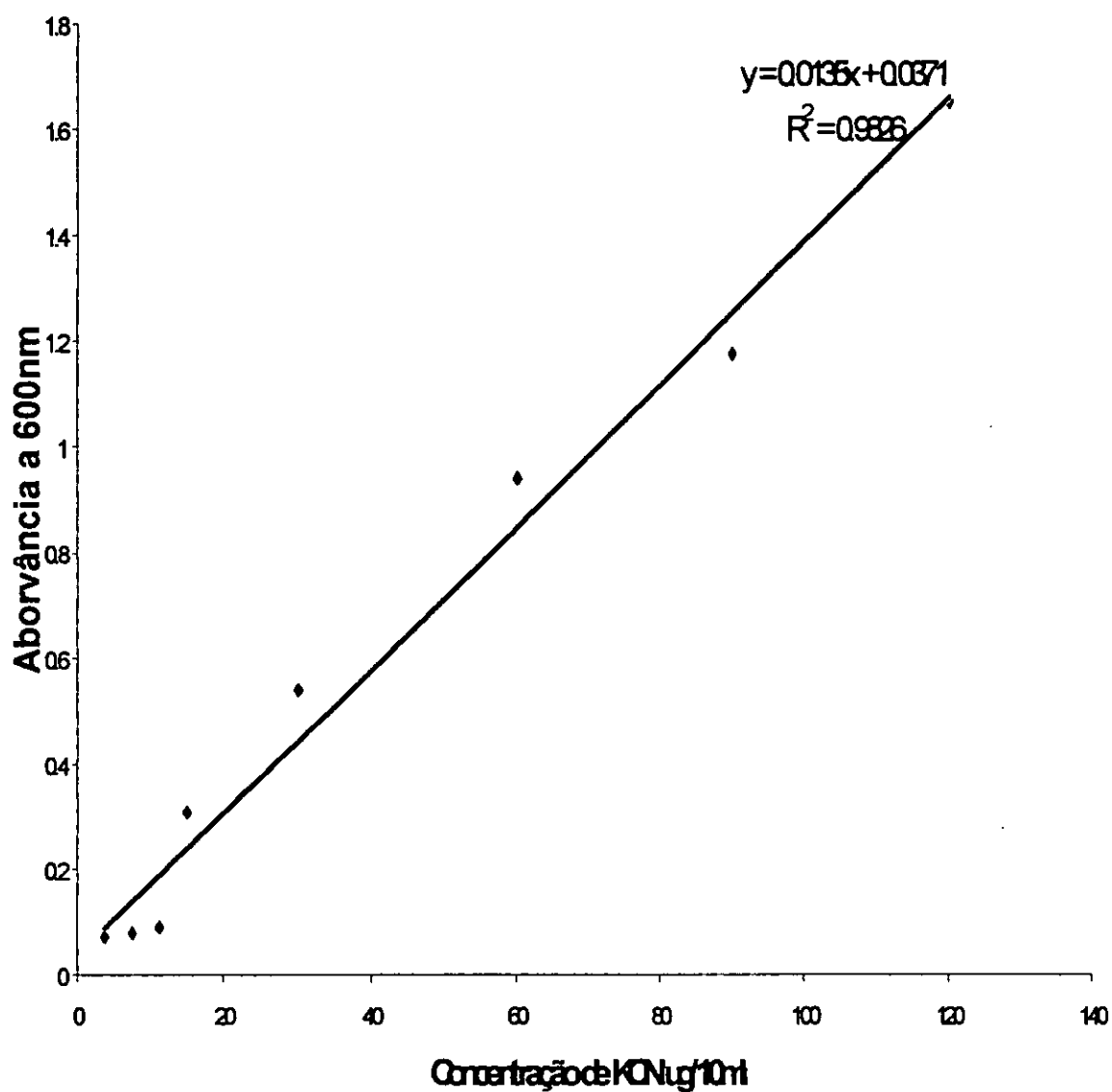


Figura 13. Linha de calibração resultante da solução padrão de KCN.

A concentração de cianeto foi obtida a partir da seguinte equação:

$$\text{Concentração de cianeto} = (\text{Valor da absorvância} - 0,0371)/0,0135$$

O Quadro 4 apresenta as concentrações de KCN obtidas a partir de calos de 'Maria Maputo' e 'Precoce de Angola' submetidos a diferentes valores de pH.

O Quadro 5 apresenta as concentrações de KCN obtidas a partir de calos de 'Maria Maputo' e 'Precoce de Angola' submetidos a diferentes valores de temperatura.

**Quadro 4.** Concentrações de KCN obtidas a partir de diferentes valores de pH

Variedade	PH	Valor da absorvância a 600 nm	Concentração de cianeto ( $\mu\text{g}/10\text{ml}$ )
Maria Maputo	4,0	0.088	3.77
Maria Maputo	4,5	0.104	4.96
Maria Maputo	6,5	0.126	6.59
Maria Maputo	7,0	0.11	5.40
Maria Maputo	8,0	0.198	11.92
Maria Maputo	9,0	0.139	7.55
Precoce de Angola	4,0	0.142	7.77
Precoce de Angola	4,5	0.139	7.55
Precoce de Angola	6,5	0.126	6.59
Precoce de Angola	7,0	0.109	5.33
Precoce de Angola	8,0	0.14	7.62
Precoce de Angola	9,0	0.092	4.07

**Quadro 5.** Concentrações de KCN obtidas a partir de diferentes temperaturas

Variedade	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Valor da absorvância a 600 nm	Concentração de cianeto ( $\mu\text{g}/10\text{ml}$ )
Maria Maputo	10	0.17	9.84
Maria Maputo	25	0.134	7.18
Maria Maputo	28,3	0.15	8.36
Precoce de Angola	10	0.17	8.36
Precoce de Angola	25	0.14	14.88
Precoce de Angola	29	0.198	11.92

*Barra 1 = mais cianeto M.M.  
 Barra 2 = " " PA*

*O que precede o/ os pedras*

O Quadro 6 apresenta a quantidade equivalente de HCN em mg/kg de peso de matéria fresca do calo da mandioca que é dada pela seguinte equação:

$$\text{HCN} = \frac{1,868 * Y * V}{W}$$

W

Onde:

HCN é dado em mg de HCN por kg de peso de matéria fresca do calo;

Y é  $\mu\text{g}$  de KCN em 10 ml de solução;

V é o volume da solução analisada;

W é o peso fresco do calo.

**Quadro 6.** Quantidade equivalente de HCN em mg/kg de peso da matéria fresca dos calos submetidos a diferentes valores de pH

Variedade	Peso (g)	V(ml)	Concentração de cianeto ( $\mu\text{g}/10\text{ml}$ )	Quantidade equivalente de HCN em mg/kg
Maria Maputo	3.84	1	3.77	1.84
Maria Maputo	3.98	1	4.96	2.32
Maria Maputo	6.80	1	6.59	1.81
Maria Maputo	0.89	1	5.40	11.39
Maria Maputo	4.59	1	11.92	4.85
Maria Maputo	3.25	1	7.55	4.33
Precoce de Angola	3.80	1	7.77	3.82
Precoce de Angola	2.5	1	7.55	5.64
Precoce de Angola	1.66	1	6.59	7.40
Precoce de Angola	2.25	1	5.33	4.42
Precoce de Angola	5.70	1	7.62	2.50
Precoce de Angola	3.58	1	4.07	2.12

*O pro fazer os dados?*

Quadro 7: Quantidade equivalentes de HCN em mg/kg de peso da matéria fresca dos calos submetidos a diferentes temperaturas

Variedade	Peso (g)	V(ml)	Concentração de cianeto ( $\mu\text{g}/10\text{ml}$ )	Quantidade equivalente de HCN em (mg/kg)
Maria Maputo	4.17	1	9.84	4.41
Maria Maputo	14.59	1	7.18	0.92
Maria Maputo	12.10	1	8.36	1.29
Precoce de Angola	18.10	1	8.36	0.86
Precoce de Angola	20.00	1	14.88	1.39
Precoce de Angola	11.55	1	11.92	1.93

*O peso fresco e o peso seco*



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Concentração de auxinas

Com base nos resultados (Quadro 1 e Figuras 1 a 4) verifica-se que as concentrações de 2,4-D influenciaram, significativamente, de forma quadrática o crescimento dos calos obtidos a partir de caules das duas variedades e, de forma cúbica, os obtidos a partir das folhas das duas variedades.

Os coeficientes de variação (Quadro 1) em todos os casos foram aparentemente altos devido, provavelmente, à grande heterogeneidade do material inicial. Por outro lado também pode ser explicado pelo facto de não se ter cumprido com todos os requisitos necessários a cultura *in vitro* (temperatura, fotoperíodo, iluminação, qualidade luminosa)

→ Ate' que foram a falta de condições  
de validação ou que o presente trabalho

A concentração óptima de auxinas com base na equação de regressão (Figuras 1 e 3) foi de 5,5  $\mu\text{M}$  no caso de calos obtidos a partir de caules de P.A. e 5,9  $\mu\text{M}$  para a variedade M.M. Este resultado está de acordo com Roca (1984) que define o intervalo entre 5 a 13  $\mu\text{M}$ , como o intervalo óptimo da concentração de 2,4-D para a indução de calos na mandioca. *declaração*

Segundo Pierik (1987), Krikorian (1995), as auxinas promovem o alargamento dos tecidos, alongamento celular, divisão celular (formação de calos) e formação de raízes em função da concentração usada.

Neste trabalho com os calos obtidos a partir de caules de ambas variedades houve formação de raízes. No caso dos calos obtidos da variedade P.A. houve formação de raízes nos 8, 10, 12 e 14  $\mu\text{M}$  e no caso da variedade M.M. a formação de raízes verificou-se com 6, 8 e 10  $\mu\text{M}$  de auxinas sendo a concentração de cinetina de 5  $\mu\text{M}$ , portanto constante.

MM bases [ ] = raízes 6 - 10  
PA altas [ ] = raízes 8 - 14

Caules  
A variedade <sup>MM</sup> forma raízes acima do [ ] de auxinas  
A variedade PA a partir do [ ] obtendo do 3º estágio  
produz raízes

Skoog et al. (1962)<sup>NE</sup>, estudando o efeito da interacção entre auxinas e cinetinas no desenvolvimento e crescimento de calos de tabaco verificou que com baixas concentrações de auxinas e dez vezes mais essa quantidade em cinetina, inicialmente estas actuam na indução de calos, depois com uma concentração maior de auxinas e mantendo-se a de cinetina, a auxina actua na indução de raízes e finalmente com altas concentrações de auxinas esta actua no crescimento de calos pelo alargamento celular.

*low A + low C = calos  
high A + C = raízes  
high A*

*5.5 Exp high A + C = raízes PA 6-10  
5.8 optimum A + C = raízes MAN 8 →*

No que diz respeito as folhas, as duas variedades mostraram um crescimento cúbico positivo, o que sugere que possivelmente embora não se tenha verificado a formação de raízes as auxinas estivessem inicialmente actuando na indução do calos promovendo grande crescimento e indução de calos, depois embora não se tenha verificado a formação de raízes durante o desenvolvimento de calos provenientes de folha, nesse ponto estivesse actuando na indução de raízes, seguido depois de crescimento pelo alargamento celular pelo aumento do matéria fresca.

*relaxar:  
Como aplicar a var. formas de raízes nos calos das folhas*

O modelo de linha cúbica resultante da análise de variância com resultado significativo determinado para os explantes de folha também foi encontrado por Cousineau (1991) ao investigar a regeneração de gemas adventícias a partir de explantes de folha de Rubus idaeus L. através da manipulação dos componentes do meio, tipos de explantes de tecidos e condições de incubação tendo analisado a interacção entre citocininas (TDZ, BA) e auxinas (IBA) tendo constatado uma interacção cúbica entre o TDZ e todas as concentrações de IBA.

### 5.2. Concentração de cinetina

Com base nos resultados (Quadro 2 e Figuras 5 a 8) verifica-se que as concentrações de cinetina influenciaram, significativamente, de forma cúbica o crescimento relativo dos calos obtidos a partir de caules e folhas de 'Precoce de Angola' e calos de caule de 'Maria Maputo' e, de forma linear, os obtidos a partir das folhas de 'Maria Maputo' e caule

*folhas de PA e caule de 1999<sub>39</sub>*

Caules e folhas +  
Citocininas ou Cinetina

Observando os gráficos das duas variedades separadamente, isto é, figuras 5 e 6 de caule e folha de P.A. e figuras 7 e 8 de caule e folha de M.M; o comportamento das curvas resultantes da análise de regressão sugerem que as duas variedades respondem de forma diferente em relação ao aumento de concentração de cinetina, *sem como nos raios.*

Krikorian (1995), referindo-se a interação entre citocininas e auxinas afirma que a manipulação de auxinas e citocininas podem induzir a organogênese. Quando o nível de citocininas em relação a auxina é alto há formação de gemas, quando o nível de auxinas é maior que da citocinina há formação de raízes e finalmente quando os níveis de citocininas e auxinas são iguais há formação de calos.

+ C < A = gemas  
- C > A = raízes  
C = A = calos

Houve formação de raízes nos calos provenientes de caules (7  $\mu$ M de 2,4-D) de ambas variedades nas seguintes concentrações de cinetina: 6, 8, e 10  $\mu$ M. Nas restantes concentrações de cinetina não houve formação de raízes. *Qual é a relação da figura 8?*

Roca (1984) propõe o intervalo entre 2 e 8  $\mu$ M de cinetina, como ótimo na indução do calo na mandioca. *Why not discuss a ultrapassagem do intervalo? 6-10 ou 5-10 e 2-8*

### 5.3. Concentração de açúcar

Nesta experiência, em vez de explantes, usaram-se calos obtidos das melhores concentrações das experiências anteriores, isto é, calos obtidos a partir de folhas e caules das duas variedades foram submetidos a diferentes concentrações de açúcar. Isto foi devido a falta de explantes na altura da montagem da experiência.

Por se ter terem perdidos *alguns* vários tratamentos e repetições só foi considerada a experiência relativa a calos de folhas de P.A. que apresentou um resultado que está dentro do intervalo sugerido por Roca como o ótimo de açúcar para a indução do calo na mandioca. Segundo o gráfico resultante da análise de regressão a concentração ótima de sacarose foi de 0,057 M.

Roca (1984) afirma que o açúcar é uma ótima fonte de carbono e que o intervalo ótimo está entre (0,03  $\mu$ M e 0,087  $\mu$ M).

#### 5.4. Biossíntese de glicosídeos cianogénicos

Como se pode observar no quadro 4, a maior concentração de cianeto foi observada na variedade Maria Maputo em pH = 8.

A variedade Precoce de Angola não apresentou valores muito elevados apesar da planta a partir do qual se induziram os calos ter um alto teor de cianeto.

*mas 2  
que a literatura pode  
fazer sobre este resultado*

Em relação a temperatura a variedade que apresentou maior teor de cianeto foi PA a 25°C. 14 8 8

#### 5.5. Aspectos gerais

*nt é o mesmo*

Segundo Deberg e Read (1991), um sistema de micropropagação intensivo comporta 5 fases distintas. Fase 0: Preparação do material vegetal; Fase 1: iniciação da cultura; Fase 2: multiplicação vegetativa e crescimento do material vegetal, Fase 3: enraizamento dos rebentos; Fase 4: aclimação. Cada uma dessas fases tem problemas específicos que podem não se limitar unicamente a uma fase mas abranger as fases seguintes.

O presente trabalho abrangeu as duas primeiras fases. Porque houve um bocado de descuido na !!

Fase 0 que é considerada indispensável para o estabelecimento de um sistemático e eficaz sistema de micropropagação e, consiste no crescimento das "plantas stock" em estufas sob boas condições de higiene. O impacto desta fase não se reflecte só no estado fitossanitário dos explantes mas também no sucesso da Fase seguinte. A Fase 1 portanto, que no caso do presente trabalho ficou afectado. Na altura da montagem da terceira não dispunha de explantes para a montagem da experiência.

Apesar da estufa usada para o crescimento das "plantas stock" não reunir as condições necessárias, o problema maior foi o facto de não ter dado atenção ao ataque de cochonilha que foi a causa da perda de "plantas stock" pois dispunha de meios para combate e prevenção. → *para um combate a cochonilha*

Isso afectou a terceira fase da experiência que teve que ser feita com calos em manutenção.

Por outro lado os resultados deste trabalho podem ter sido influenciados pela falta condições necessárias à cultura *in vitro*.

## 6. CONCLUSÕES

- A concentração óptima de 2,4-D para a indução de calos a partir de caules de P.A. foi de  $5,5 \mu\text{M}$
- A concentração óptima de 2,4-D para a indução de calos a partir de folhas de P.A. situou-se no intervalo entre  $3,5 \mu\text{M}$  e  $10,5 \mu\text{M}$
- A concentração óptima de 2,4-D para a indução de calos a partir de caules de M.M. foi de  $5,9 \mu\text{M}$ .
- A concentração óptima de 2,4-D para a indução de calos a partir de folhas de M.M. situou-se no intervalo entre  $4,6 \mu\text{M}$  e  $11,8 \mu\text{M}$
- A concentração óptima de cinetina para a indução de calos a partir de caules de P.A. situou-se no intervalo entre  $2,5 \mu\text{M}$  e  $7,7 \mu\text{M}$ .
- A concentração óptima de cinetina para a indução de calos a partir de folhas de P.A. situou-se no intervalo entre  $2,75 \mu\text{M}$  e  $9,1 \mu\text{M}$
- A concentração óptima de cinetina para a indução de calos a partir de caules de M.M. situou-se no intervalo entre  $3,87 \mu\text{M}$  e  $6,5 \mu\text{M}$ .
- A concentração óptima de cinetina para a indução de calos a partir de folhas de M.M. foi de  $5,7 \mu\text{M}$ .
- A concentração óptima de açúcar para a indução de calos a partir de folhas de M.M. foi de  $0,057 \text{ M}$ .
- O método destrutivo usado na medição de crescimento relativo dos calos pode de alguma forma ter influenciado os resultados. *Quá?*

- Seria necessário conduzir uma série de experiências similares para determinar as condições ótimas para regeneração de gemas a partir de calos de mandioca.

*Conclusões de recomendações?*

## 7. RECOMENDAÇÕES

*Recomenda-se que:*

- Que em outros trabalhos desta natureza seja usado outro método de medição de crescimento.
- Que se dê especial atenção a Fase 0 ( fase de preparação do material vegetal "plantas stock" a usar na cultura *in vitro*).
- Que outros trabalhos similares fossem conduzidos numa série de experiências de modo a determinar as condições óptimas para a regeneração de gemas a partir de calos da mandioca.
- São necessárias condições constantes de temperatura, fotoperíodo, iluminação e qualidade luminosa.
- São necessárias condições de máxima higiene, antes, durante e após a cultura *in vitro*
- Durante o desenvolvimento do calos para gemas o conteúdo de cianetos poderia ser seguido de modo a determinar quando é que a produção de cianeto começa.

*Quito confiado*

## 8. BIBLIOGRAFIA

Anónimo, International Institute of Tropical Agriculture (1990). Cassava in Tropical Africa. A Reference Manual. 176 pp. Ibadan, Chayce Publication Services.

Antônio, P. (1960). A Mandioca. Revista Agricola, 18: 49-53.

Bellotti, A.C. & L.Riis (1994). Cassava Cyanogenic Potencial and Resistance to Pests and Diseases. Acta Horticulturae, 375: 141-153.

Bokanga, M. (1994). Distribution of Cyanogenic Potencial in Cassava Germplasm. Acta Horticulturae, 375:117-123.

Bradbury, J.H., M.G. Bradbury e S.V. Egan (1994). Comparison of Methods of Analysis of Cyanogens in Cassava. Acta Horticulturae, 375: 87-96.

Cousineau, C.J. & D.J. Donnelly (1991). Adventitious Shoot Regeneration from Leaf Explants of Tissue Culture and Greenhouse-grown raspberry in: Plant Cell, Tissue and Organ Culture Vol. 27;3: 249-255. Kluwer Academic Publishers.

Debergh, P.C. e P.E. Read (1991). Micropropagation. In: Debergh, P.C. & R. H. Zimmerman Micropropagation Technology and Application. 484 pp. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Dixon, R.A. (1985). Plant Cell Culture: a practical approach, 236 pp. London, IRL Press Limited.

Dodds, J.H. e L.W. Roberts (1995). Experiments in Plant Tissue Culture, 3ª edição, 256 pp. New York, Cambridge University Press.



Dufour, D.L (1994). Cassava in Amazonia: Lessons in Utilization and Safety From Native Peoples Acta Horticulturae, 375: 175-182

Flick ,C.E., D.A. Evans & W.R. Sharp (1983) .Organogenesis in: Sharp, W.R., D.A. Evans, P.V. Ammirato e Y. Yamada. Handbook of Plant Cell Culture. Volume 2, 644 pp. New York, Macmillan Publishing Company.

Gamborg, O.L. (1991) Média Preparation in: Plant Tissue Culture Manual. 1125 pp. Netherlands, Kluwer Academic Publishers.

Gomes, F.P. (1990). Curso de Estatística Experimental, 13ª edição 468 pp. Piracicaba, Livraria Nobel S.A.

Koch, B.M. et al. (1994). Possible Use of a Biotechnological Approach to Optimize and Regulate the Content and Distribution of Cyanogenic Glucosides in Cassava to Increase Food Safety. Acta Horticulturae, 375: 45-60.

Krikorian, A.D.(1995). Cytokinin-Auxin Ratios and Adventitious Organogenesis from Intact Organs and Callus Cultures in: Davies J.Peter Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> edition 833 pp. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Murashige, T. e F. Skoog (1962). A Revised Medium for rapid Growth and Biossays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 15:437-497.

Nambisan, B. (1994). Evaluationonn of the Efect of Various Processing Techniques on Cyanogen Content Reduction in Cassava . Acta Horticulturae, 375: 193-201.

- Pierik, R.L.M. (1987). In Vitro Culture of Higher Plants, 344 pp. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers.
- Pollard, J.W. e J.M. Walker (1990). Methods in Molecular Biology. volume 6, 597 pp. New Jersey, Humana Press.
- Roca, W.M. (1984) Cassava in: Sharp, W.R., D.A. Evans, P.V. Ammirato e Y. Yamada. Handbook of Plant Cell Culture. Volume 2, 644 pp. New York, Macmillan Publishing Company.
- Segeren, P, R. van den Oever e J. Compton (1994). Pragas, Doenças e Ervas Daninhas nas Culturas Alimentares em Moçambique. 258 pp. Maputo, INIA.
- Serra, C. (1982). Mandioca: O que é e como terá surgido em Africa e em Moçambique. Tempo 619: 51-54.
- White, W.L.B., J.M. McMahon and R. T. Sayre (1994). Regulation of Cyanogenesis in Cassava Acta Horticulturae, 375: 69-77.
- Yeoman, M.M. (1986). Plant Cell Culture Technology. 375 pp. Oxford. Blackwell Scientific Publications.

Anexo 3. Média de pesos relativos de calos obtidos ao fim de 30 dias. Os valores correspondem a média de 10 calos por concentração de cinetina

Média de pesos relativos (%) ao fim de 30 dias					
Experiência	Concentração de cinetina ( $\mu\text{M}$ )	Precoce de Angola		Maria Maputo	
		Caule	Folha	Caule	Folha
B	1	393,167 <sup>9</sup>	4113,411	365,000	4828,956
	2	279,333	2084,281	314,833	14424,420
	3	275,464	3906,208	1249,500	9474,177
	4	410,310	3179,117	571,667	9656,970
	5	178,448	4547,482	695,833	7331,349
	6	580,298	3712,240	625,000	20425,100
	7	973,000	5980,499	737,500	7685,100
	8	298,405	8067,573	756,667	37222,620
	9	408,071	8095,105	1195,000	11882,630
	10	433,333	6770,498	1320,000	12800,000

Os valores apresentados nas tabelas correspondem a média de 10 calos  $\pm$  sd:

Anexo 4. Média de pesos relativos de calos obtidos ao fim de 30 dias. Os valores correspondem a média de 10 calos por concentração de açúcar

Média de pesos relativos (%) ao fim de 30 dias					
Experiência	Concentração de Açúcar (M)	Precoce de Angola		Maria Maputo	
		Caule	Folha	Caule	Folha
C	0,01M	246,706 <i>+sd</i>	150,571	37,738	307,407
	0,02M	-19,663	256,738	26,333	75,631
	0,03M	158,972	262,593	250,667	48,500
	0,04M		538,000	538,333	
	0,05M		214,375		
	0,06M	501,833	227,963	1840,000	261,167
	0,07M	52,33	302,762	456,667	312,333
	0,08M	349,369	422,500	99,881	120.643
	0,09M	312,667	394,833	104,500	181.167
	0,1M	83,833	98,333	478,333	

Os valores apresentados nas tabelas correspondem a média de 10calos  $\pm$  sd:

Neste caso nas concentrações onde não aparece os valores médios houve perda de calos ao 30 dia por infecção.

ANEXO 1. Composição do meio de cultura Murashige & Skoog (1962).

Constituintes	Molaridade no meio	Concentração das soluções "stock" (mg/l)
<i>Macronutrientes</i>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,6x10 <sup>-2</sup>	33000
KNO <sub>3</sub>	18,8 x10 <sup>-2</sup>	38000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,00x10 <sup>-3</sup>	8800
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,50x10 <sup>-3</sup>	7400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25 x10 <sup>-3</sup>	3400
<i>Micromutrientes</i>		
KI	5,00x10 <sup>-4</sup>	166
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,00 x10 <sup>-4</sup>	1240
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	9,99 x10 <sup>-5</sup>	4460
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,99 x10 <sup>-5</sup>	1720
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,00 x10 <sup>-4</sup>	50
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,00 x10 <sup>-7</sup>	5
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1,00 x10 <sup>-7</sup>	5
<i>Fontes de Ferro</i>		
Na <sub>2</sub> EDTA . 2H <sub>2</sub> O	1,00 x10 <sup>-4</sup>	7460
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,00x10 <sup>-4</sup>	5560
<i>Compostos Orgânicos</i>		
Myo inositol	4,90x10 <sup>-4</sup>	100
<i>Vitaminas</i>		
Ácido nicotínico	4,66x10 <sup>-6</sup>	0,5
Piridoxina-HCl	2,40x10 <sup>-6</sup>	0,5
Tiamina -HCl	3,00x10 <sup>-7</sup>	0,5
<i>Aminoácidos</i>		
Glicina	3,00x10 <sup>-5</sup>	2,0
<i>Fontes de Carbono</i>		
Sacarose	8,80x10 <sup>-2</sup>	30g/l

Anexo 2. Média de pesos relativos de calos obtidos ao fim de 30 dias. Os valores correspondem a média de 10 calos por concentração de 2,4-D.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Média de pesos relativos (%) ao fim de 30 dias				
	2,4-D	Precoce de Angola		Maria Maputo	
		Caule	Folha	Caule	Folha
1		728,405	19529,040	300,060	338,333
2		1212,274	9320,939	1064,250	643,833
4		593,500	25406,350	441,151	3903,959
6		1332,524	15565,010	866,190	1989,000
8		876,954	12196,730	461,041	1481,663
10		1076,040	10199,940	526,417	510,167
12		291,056	9836,270	810,143	580,389
14		504,405	20653,760	166,202	915,667

*onde estão os sel?*

Anexo 5. Resultados dos testes de análise de variância (ANOVA - G), para comparar o efeito das diferentes concentrações de 2,4-D no crescimento relativo de calos obtidos de caule e folha de PA e de calos obtidos de caule e folha de MM.

\*  
\* TITULO = PAGINA \*  
\* SUBTITULO = 1 \*  
\*  
\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*

\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*  
ANOVAG MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

E S T A T I S T I C A S S I M P L E S

OBSERVACOES PERDIDAS = 0  
OBSERVAÇÕES DESCARTADAS = 0  
OBSERVAÇÕES CONSIDERADAS = 80

D I S T R I B U I C A O D O S D A D O S

EFEITO	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	10
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10
TRAT	8	10



NOME MEDIA DESVIO

DIA31 826.8946 719.1555

CORRELAÇÕES

NOME X NOME PRODUTO CRUZADO CORRELAÇÃO

DIA31 DIA31 .4085759E+08 1.0000

DETERMINANTE = .6250000E-01

ANALISE DE VARIANÇIA

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGN
TRAT	7	9240538.	1320077.	3.006	.007
LINEAR R2= .17	1	1598429.	1598429.	3.640	.060
QUADR R2= .40	1	2088219.	2088219.	4.755	.032

CUBIC	R2= .40	1	39954.21	39954.21	.091	*****
QUART	R2= .43	1	254967.8	254967.8	.581	*****
QUINT	R2= .65	1	2017407.	2017407.	4.594	.03547
RESIDUAL		2	3241561.	1620780.	3.691	.02979
RESIDUO		72	.3161705E+08	439125.7		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 80.139

\*\*\*\*\* SAEG 4.0 UFV/DPS - UFV - DEPARTAMENTO DE SOLOS  
16/09/98 17:47:34 ARQUIVO=RESUL1-A \*\*\*\*\*

\*  
\* TITULO = \*  
\* SUBTITULO = \*  
\* PAGINA \*  
\* 1 \*  
\*  
\*  
\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*

C A U L E P A

\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

LISTAR TRAT DIA31

OBSERV.	TRAT	DIA31
1	1.000	728.405
2	2.000	1212.274
3	3.000	593.500
4	4.000	1332.524
5	5.000	876.954
6	6.000	1076.040
7	7.000	291.056
8	8.000	504.405

\*  
\* TITULO = PAGINA \* F O L H A P A  
\* SUBTITULO = 1 \*  
\*

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*  
ANOVAG MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

E S T A T I S T I C A S S I M P L E S

OBSERVACOES PERDIDAS = 0  
OBSERVACOES DESCARTADAS = 0  
OBSERVACOES CONSIDERADAS = 80

D I S T R I B U I C A O D O S D A D O S

EFEITO	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	10
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10
TRAT	8	10

NOME MEDIA DESVIO

DIA31 15338.51 9300.202

CORRELACOES

NOME X NOME PRODUTO CRUZADO CORRELACAO

DIA31 DIA31 .6833008E+10 1.0000

DETERMINANTE = .6250000E-01

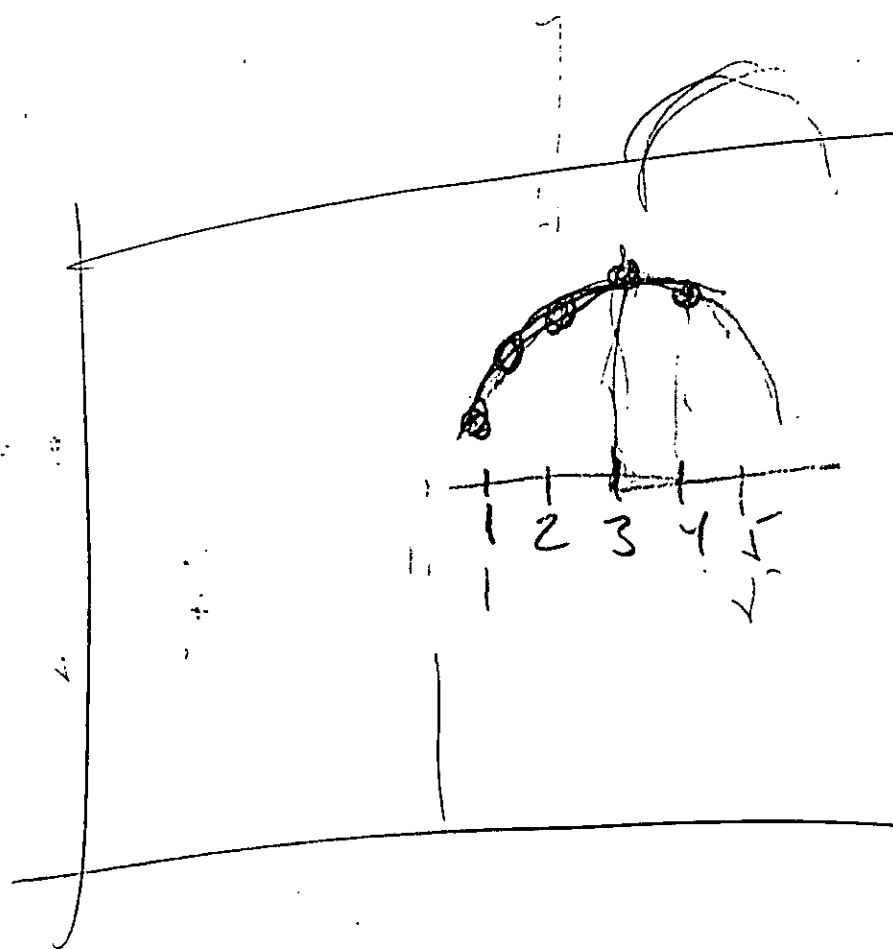
ANALISE DE VARIANCIA

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF
TRAT	7	.2499866E+10	.3571238E+09	5.934	.00000
LINEAR R2= .04	1	.8840182E+08	.8840182E+08	1.469	.22948
QUADR R2= .11	1	.1788134E+09	.1788134E+09	2.971	.08900

CUBIC	R2= .33	1	.5623686E+09	.5623686E+09	9.344	.00315
QUART	R2= .53	1	.4987128E+09	.4987128E+09	8.287	.00527
QUINT	R2= .71	1	.4486721E+09	.4486721E+09	7.455	.00796
RESIDUAL		2	.7228977E+09	.3614488E+09	6.006	.00387
RESIDUO		72	.4333141E+10	.6018251E+08		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 50.577



\*  
\* TITULO = PAGINA \* F O L H A P A

\* SUBTITULO = 1 \*

\*  
\*

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

LISTAR DIA31 TRAT

OBSERV. DIA31 TRAT

1	19529.040	1.000
2	9320.939	2.000
3	25406.350	3.000
4	15565.010	4.000
5	12196.730	5.000
6	10199.940	6.000
7	9836.270	7.000
8	20653.760	8.000

\* \* \* \* \*  
\* TITULO = PAGINA \*  
\* SUBTITULO = 1 \*  
\* \* \* \* \*

C A U L E M M

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*  
ANOVAG MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

E S T A T I S T I C A S . S I M P L E S

OBSERVACOES PERDIDAS = 0  
OBSERVACOES DESCARTADAS = 0  
OBSERVACOES CONSIDERADAS = 80

D I S T R I B U I C A O D O S D A D O S

EFEITO	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	10
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10
TRAT	8	10



NOME MEDIA DESVIO

DIA31 579.4317 414.4760

CORRELACOES

NOME X NOME PRODUTO CRUZADO CORRELACAO

DIA31 DIA31 .1357144E+08 1.0000

DETERMINANTE = .6250000E-01

ANALISE DE VARIANCIA

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF
TRAT	7	6552629.	936089.9	9.603	.00000
LINEAR R2= .05	1	330652.4	330652.4	3.392	.06965
QUADR R2= .23	1	1152714.	1152714.	11.825	.00099

CUBIC	R2= .23	1	34338.49	34338.49	.352	*****
QUART	R2= .59	1	2361448.	2361448.	24.224	.00002
QUINT	R2= .59	1	358.7176	358.7176	.004	*****
RESIDUAL		2 3	2673118.	1336559.	13.711	.00001
RESIDUO		72	7018806.	97483.41		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 53.884

\*  
\* TITULO = PAGINA \*  
\* SUBTITULO = 1 \*  
\* \* \*

C A U L E M M

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*

\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

LISTAR TRAT DIA31

OBSERV.	TRAT	DIA31
1	1.000	300.060
2	2.000	1064.250
3	3.000	441.151
4	4.000	866.190
5	5.000	461.041
6	6.000	526.417
7	7.000	810.143
8	8.000	166.202

\*  
 \* TITULO =  
 \* SUBTITULO =  
 \*  
 \*

F O L H A M M

PAGINA \*

1 \*

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*

\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

ANOVAG MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

## T S T A T I S T I C A S S I M P L E S

OBSERVACOES PERDIDAS = 0

OBSERVACOES DESCARTADAS = 0

OBSERVACOES CONSIDERADAS = 80

## D I S T R I B U I C A O D O S D A D O S

EFEITO	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	10
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10
TRAT	8	10

NOME	MEDIA	DESVIO
------	-------	--------

DIA31 1295.376 1796.054

C O R R E L A C O E S

NOME	X NOME	PRODUTO CRUZADO	CORRELACAO
DIA31	DIA31	.2548389E+09	1.0000

DETERMINANTE = .6250000E-01

A N A L I S E D E V A R I A N C I A

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF.
TRAT	7	.9932900E+08	.1418986E+08	6.570	.00001
LINEAR R2= .03	1	2887247.	2887247.	1.337	.25143
QUADR R2= .28	1	.2524345E+08	.2524345E+08	11.688	.00105

CUBIC	R2= .62	1	.3327126E+08	.3327126E+08	15.404	.00021
QUART	R2= .64	1	1913452.	1913452.	.886	*****
QUINT	R2= .80	1	.1637809E+08	.1637809E+08	7.583	.00747
RESIDUAL		2	.1963550E+08	9817752.	4.546	.01384
RESIDUO		72	.1555099E+09	2159860.		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 113.453

\*  
\* TITULO = PAGINA \* F O L H A M M  
\* SUBTITULO = 1 \*  
\*  
\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*

\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

LISTAR TRAT DIA31

OBSERV.	TRAT	DIA31
1	1.000	338.333
2	2.000	643.833
3	3.000	3903.959
4	4.000	1989.000
5	5.000	1481.663
6	6.000	510.167
7	7.000	580.389
8	8.000	915.667

Anexo 6. Resultados dos testes de análise de variância (ANOVA - G), para comparar o efeito das diferentes concentrações de Cinetina no crescimento relativo de calos obtidos caule e folha de PA e de calos obtidos de caule e folha de MM.



\*\*\*\*\* SAEG 4.0 UFV/DPS - UFV - DEPARTAMENTO DE SOLOS  
16/09/98 18:26:46 ARQUIVO=RESUL2-A \*\*\*\*\*

\*  
\* TITULO = PAGINA \* CAULEPA  
\* SUBTITULO = 1 \*  
\*  
\*

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*  
ANOVAG MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

E S T A T I S T I C A S S I M P L E S

OBSERVACOES PERDIDAS = 0  
OBSERVACOES DESCARTADAS = 0  
OBSERVACOES CONSIDERADAS = 100

D I S T R I B U I C A O D O S D A D O S

EFEITO	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	10
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10
TRAT	8	10
TRAT	9	10
TRAT	10	10

NOME                    MEDIA                    DESVIO

DIA31                    422.9829                    364.8928

C O R R E L A C O E S

NOME            X NOME                    PRODUTO CRUZADO            CORRELACAO

DIA31            DIA31                    .1318153E+08            1.0000

DETERMINANTE =            .1953125E-01

A N A L I S E   D E   V A R I A N C I A

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF
TRAT	9	4463597.	495955.2	5.120	.00002

LINEAR	R2= .08	1	364306.3	364306.3	3.761	.05559
QUADR	R2= .12	1	153829.0	153829.0	1.588	.21085
CUBIC	R2= .26	1	626445.8	626445.8	6.467	.01268
QUART	R2= .30	1	213036.2	213036.2	2.199	.14156
QUINT	R2= .45	1	639390.5	639390.5	6.601	.01183
RESIDUAL		4	2466589.	616647.2	6.366	.00015
RESIDUO		90	8717933.	96865.92		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 73.580

\*\*\*\*\* SAEG 4.0 UFV/DPS - UFV - DEPARTAMENTO DE SOLOS  
16/09/98 18:32:32 ARQUIVO=RESUL2-A \*\*\*\*\*

\*  
\* TITULO = \*  
\* SUBTITULO = PAGINA \*  
\* 1 \*

C A U L E P A

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
LISTAR TRAT DIA31 \*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

OBSERV.	TRAT	DIA31
1	1.000	393.167
2	2.000	279.333
3	3.000	275.464
4	4.000	410.310
5	5.000	178.448
6	6.000	580.298
7	7.000	973.000
8	8.000	298.405
9	9.000	408.071
10	10.000	433.333



NOME	MEDIA	DESVIDO
------	-------	---------

DIA31	5045.642	3252.205
-------	----------	----------

C O R R E L A C O E S

NOME	X NOME	PRODUTO CRUZADO	CORRELACAO
------	--------	-----------------	------------

DIA31	DIA31	.1047107E+10	1.0000
-------	-------	--------------	--------

DETERMINANTE = .1953125E-01

A N A L I S E D E V A R I A N C I A

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF.
TRAT	9	.3872745E+09	.4303050E+08	5.869	.00000

LINEAR	R2= .70	1	.2698432E+09	.2698432E+09	36.806	.00000
QUADR	R2= .73	1	.1314151E+08	.1314151E+08	1.792	.18399
CUBIC	R2= .85	1	.4432795E+08	.4432795E+08	6.046	.01584
QUART	R2= .87	1	.1074544E+08	.1074544E+08	1.466	.22919
QUINT	R2= .92	1	.1875108E+08	.1875108E+08	2.558	.11326
RESIDUAL		4	.3046538E+08	7616344.	1.039	.39171
RESIDUO		90	.6598323E+09	7331470.		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 53.664

\*\*\*\*\* SAEG 4.0 UFV/DPS - UFV - DEPARTAMENTO DE SOLOS  
16/09/98 18:46:15 ARQUIVO=RESUL2-B \*\*\*\*\*

\*  
\* TITULO = \*  
\* SUBTITULO = \*  
\*  
\*  
\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

LISTAR TRAT DIA31

OBSERV.	TRAT	DIA31
1	1.000	4113.411
2	2.000	2084.281
3	3.000	3906.208
4	4.000	3179.117
5	5.000	4547.482
6	6.000	3712.240
7	7.000	5980.499
8	8.000	8067.573
9	9.000	8095.105
10	10.000	6770.498



\*  
 \* TITULO =  
 \* SUBTITULO =  
 \*  
 \*  
 \*

PAGINA \*  
 1 \*

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
 \*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*  
 ANOVAG MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

STATISTICAS SIMPLES

OBSERVACOES PERDIDAS = 0  
 OBSERVACOES DESCARTADAS = 0  
 OBSERVACOES CONSIDERADAS = 100

DISTRIBUICAO DOS DADOS

EFEITO	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	10
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10
TRAT	8	10
TRAT	9	10
TRAT	10	10

NOME	MEDIA	DESVIO
------	-------	--------

DIA31	783.1000	727.5908
-------	----------	----------

## CORRELACOES

NOME	X NOME	PRODUTO CRUZADO	CORRELACAO
------	--------	-----------------	------------

DIA31	DIA31	.5240945E+08	1.0000
-------	-------	--------------	--------

DETERMINANTE = .1953125E-01

## ANALISE DE VARIANCIA

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF.
--------------------	------	------------------	----------------	---	---------

TRAT	9	.1149627E+08	1277363.	2.810	.00592
------	---	--------------	----------	-------	--------

LINEAR	R2= .43	1	4901966.	4901966.	10.783	.00145
QUADR	R2= .45	1	277143.0	277143.0	.610	*****
CUBIC	R2= .62	1	1935005.	1935005.	4.257	.04197
QUART	R2= .65	1	301673.2	301673.2	.664	*****
QUINT	R2= .68	1	414445.2	414445.2	.912	*****
RESIDUAL		4	3666034.	916508.4	2.016	.09886
RESIDUO		90	.4091318E+08	454590.9		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 86.098

\*\*\*\*\* SAEG 4.0 UFV/DPS - UFV - DEPARTAMENTO DE SOLOS  
16/09/98 18:58:23 ARQUIVO=RESUL2-C \*\*\*\*\*

\*  
\* TITULO = \*  
\* SUBTITULO = PAGINA \*  
\* 1 \*  
\*  
\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*

C A U L E M M

\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

LISTAR TRAT DIA31

OBSERV.	TRAT	DIA31
1	1.000	365.000
2	2.000	314.833
3	3.000	1249.500
4	4.000	571.667
5	5.000	695.833
6	6.000	625.000
7	7.000	737.500
8	8.000	756.667
9	9.000	1195.000
10	10.000	1320.000

\*\*\*\*\* SAEG 4.0 UFV/DPS - UFV - DEPARTAMENTO DE SOLOS  
16/09/98 19:02:18 ARQUIVO=RESUL2-D \*\*\*\*\*

\*  
\* TITULO = F O L H A M M  
\* SUBTITULO = PAGINA \*  
1 \*

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*  
ANOVAR MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

E S T A T I S T I C A S S I M P L E S

OBSERVACOES PERDIDAS = 0  
OBSERVACOES DESCARTADAS = 0  
OBSERVACOES CONSIDERADAS = 100

D I S T R I B U I C A O D O S D A D O S

.FEITO	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	10
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10
TRAT	8	10
TRAT	9	10
TRAT	10	10

NOME	MEDIA	DESVIO
------	-------	--------

DIA31	13573.13	15870.62
-------	----------	----------

C O R R E L A C O E S

NOME	X NOME	PRODUTO CRUZADO	CORRELACAO
------	--------	-----------------	------------

DIA31	DIA31	.2493578E+11	1.0000
-------	-------	--------------	--------

DETERMINANTE = .1953125E-01

A N A L I S E D E V A R I A N C I A

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF.
--------------------	------	------------------	----------------	---	---------

TRAT	9	.7926549E+10	.8807277E+09	4.660	.00005
------	---	--------------	--------------	-------	--------

LINEAR	R2= .15	1	.1210513E+10	.1210513E+10	6.405	.01310
CUADR	R2= .18	1	.1998444E+09	.1998444E+09	1.057	.30655
CUBIC	R2= .25	1	.5659236E+09	.5659236E+09	2.994	.08697
CUART	R2= .36	1	.8868921E+09	.8868921E+09	4.693	.03292
QUINT	R2= .41	1	.3619686E+09	.3619686E+09	1.915	.16979
RESIDUAL		4	.4701407E+10	.1175352E+10	6.219	.00018
RESIDUO		90	.1700923E+11	.1889914E+09		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 101.284

Anexo 7. Resultados dos testes de análise de variância (ANOVA - G), para comparar o efeito das diferentes concentrações de açúcar no crescimento relativo de calos obtidos de caule e folha de PA e de calos obtidos de caule e folha de MM.



CAULEPA

\* TITULO = PAGINA \*  
\* SUBTITULO = 1 \*  
\* \* \*

\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*  
ANOVAG MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

ESTATISTICAS SIMPLES

OBSERVACOES PERDIDAS = 3  
OBSERVACOES DESCARTADAS = 0  
OBSERVACOES CONSIDERADAS = 77

DISTRIBUICAO DOS DADOS

EITO	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	7
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10
TRAT	8	10

ESTATISTICAS SIMPLES

OBSERVACOES PERDIDAS = 3  
 OBSERVACOES DESCARTADAS = 0  
 OBSERVACOES CONSIDERADAS = 77

DISTRIBUICAO DOS DADOS

EFEITO	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	7
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10
TRAT	8	10

NO ME            MEDIA            DESVIO

DIA31           209.3558           273.9889

CORRELACOES

NO ME    X NO ME            PRODUTO CRUZADO    CORRELACAO

DIA31    DIA31            5705312.            1.0000

DETERMINANTE = .5347595E-01

ANALISE DE VARIANCIA

31

FONTES DE VARIACAO    G.L.    SOMA DE QUADRAO    QUADRAO MEDIO    F    SIGNIF.

TRAT		7	2121964.	303137.7	5.837	.00003
LINEAR	R2= .02	1	34100.03	34100.06	.657	*****
QUADR	R2= .12	1	223836.3	223836.3	4.310	.04162

PAGINA = 2

CUBIC	R2= .24	1	240891.5	240891.5	4.639	.03476
QUART	R2= .26	1	54198.98	54198.98	1.044	.31055
QUINT	R2= .58	1	685712.3	685712.3	13.204	.00054
RESIDUAL		2	883224.5	441612.3	8.504	.00050
RESIDUO		69	3583349.	51932.57		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 108.852



NOME	MEDIA	DESVIO
DIA31	209.3558	273.9889

CORRELAÇÕES

NOME	X NOME	PRODUTO CRUZADO	CORRELAÇÃO
DIA31	DIA31	5705312.	1.0000

DETERMINANTE = .5347595E-01

ANALISE DE VARIANÇIA

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF.
TRAT	7	2121964.	303137.7	5.837	.00003
LINEAR	R2= .02 1	34100.06	34100.06	.657	*****
QUADR	R2= .12 1	223836.3	223836.3	4.310	.04162

UBIC	R2= .24	1.	240891.5	240891.5	4.639	.03476
QUART	R2= .26	1	54198.98	54198.98	1.044	.31055
QUINT	R2= .58	1	685712.3	685712.3	13.204	.00054
RESIDUAL		2	883224.5	441612.3	8.504	.00050
RESIDUO		69	3583348.	51932.57		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 108.852

\* \* \* \* \*  
 \* TITULO = PAGINA \*  
 \* SUBTITULO = 1 \*  
 \* \* \* \* \*

F O L H A P A

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
 \*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*  
 AOVAG MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

E S T A T I S T I C A S S I M P L E S

OBSERVACOES PERDIDAS = 13  
 OBSERVACOES DESCARTADAS = 0  
 OBSERVACOES CONSIDERADAS = 87

D I S T R I B U I C A O D O S D A D O S

TRATEITO	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	5
TRAT	2	10
TRAT	3	9
TRAT	4	10
TRAT	5	8
TRAT	6	9
TRAT	7	10
TRAT	8	10
TRAT	9	10
TRAT	10	6

NOME	MEDIA	DESVIO
DIA31	305.9907	243.0393

C O R R E L A C O E S

NOME	X NOME	PRODUTO CRUZADO	CORRELACAO
DIA31	DIA31	5079856.	1.0000

DETERMINANTE = .6149981E-01

A N A L I S E D E V A R I A N C I A

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF.
TRAT	9	1295718.	143968.7	2.929	.00485

LINEAR	R2= .01	1	15126.89	15126.89	.308	*****
QUADR	R2= .16	1	192933.8	192933.8	3.926	.051111#
CUBIC	R2= .16	1	852.0189	852.0189	.017	*****
QUART	R2= .43	1	350070.6	350070.6	7.123	.00927
QUINT	R2= .64	1	265847.3	265847.3	5.409	.02265
RESIDUAL		4	470887.6	117721.9	2.395	.05754
RESIDUO		77	3784138.	49144.64		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 72.449



\* \* \* \* \*  
\* TITULO = PAGINA \*  
\* SUBTITULO = 1 \*  
\* \* \* \* \*

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

LISTAR TRAT DIA31

OBSERV.	TRAT	DIA31
1	1.000	150.571
2	2.000	256.738
3	3.000	262.593
4	4.000	538.000
5	5.000	214.375
6	6.000	227.963
7	7.000	302.762
8	8.000	422.500
9	9.000	394.833
10	10.000	98.333

\*\*\*\*\* SAEG 4.0 UFV/DPS - UFV - DEPARTAMENTO DE SOLOS  
05/10/98 10:43:11 ARQUIVO=EXP3-C \*\*\*\*\*

\* TITULO = \*  
\* SUBTITULO = \* PAGINA \*  
\* 1 \*

C A U L E M M

\*\*\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*  
ANOVAR MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

E S T A T I S T I C A S S I M P L E S

OBSERVACOES PERDIDAS = 0  
OBSERVACOES DESCARTADAS = 0  
OBSERVACOES CONSIDERADAS = 90

D I S T R I B U I C A O D O S D A D O S

ITEM	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	10
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10
TRAT	8	10
TRAT	9	10

NOME	MEDIA	DESVIO.
DIA31	425.8280	616.4117

CORRELACOES

NOME	X NOME	PRODUTO CRUZADO	CORRELACAO
DIA31	DIA31	.3381674E+08	1.0000

ETERMINANTE = .3515625E-01

ANALISE DE VARIANCIA

DIA31

FONTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF.
TRAT	8	.2566633E+08	3208291.	31.884	.00000
LINEAR R2= .02	1	433973.3	433973.3	4.313	.04100 *

QUADR	R2= .25	1	6109721.	6109721.	60.719	.00000	* *
CUBIC	R2= .28	1	698608.3	698608.3	6.943	.01008	* *
QUART	R2= .64	1	9105800.	9105800.	90.495	.00000	
QUINT	R2= .64	1	4053.119	4053.119	.040	*****	
RESIDUAL		3	9314170.	3104723.	30.855	.00000	
RESIDUO		81	8150408.	100622.3			

COEFICIENTE DE VARIACAO = 74.493

\* TITULO = PAGINA \*  
CAULEPA

\* SUBTITULO = 1 \*  
\* \* \*

\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

LISTAR TRAT DIA31

OBSERV.	TRAT	DIA31
1	1.000	37.738
2	2.000	26.333
3	3.000	250.667
4	4.000	538.333
5	5.000	1840.000
6	6.000	456.667
7	7.000	99.881
8	8.000	104.500
9	9.000	478.333

\* \* \* \* \*  
\* TITULO = PAGINA \*  
\* SUBTITULO = 1 \*  
\* \* \* \* \*

\*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*  
ANOVAG MODELO=DIA31 FUNCAO TRAT(R)

ESTATISTICAS SIMPLES

OBSERVACOES PERDIDAS = 1  
OBSERVACOES DESCARTADAS = 0  
OBSERVACOES CONSIDERADAS = 69

DISTRIBUICAO DOS DADOS

TRAT	IDENTIFICACAO	DADOS
TRAT	1	9
TRAT	2	10
TRAT	3	10
TRAT	4	10
TRAT	5	10
TRAT	6	10
TRAT	7	10

NOME MEDIA DESVIO

DIA31 184.9431 217.4808

CORRELAÇÕES

NOME	X NOME	PRODUTO CRUZADO	CORRELACAO
------	--------	-----------------	------------

DIA31	DIA31	3216258.	1.0000
-------	-------	----------	--------

DETERMINANTE = .1051202E+00

ANALISE DE VARIANCA

DIA31

SORTES DE VARIACAO	G.L.	SOMA DE QUADRADO	QUADRADO MEDIO	F	SIGNIF.
RAT	6	702507.1	117084.5	2.888	.01512
LINEAR R2= .00	1	52.05365	52.05365	.001	*****
QUADR R2= .01	1	7915.717	7915.717	.195	*****
CUBIC R2= .45	1	305623.9	305623.9	7.538	.00790**

CUART	R2= .82	1	264254.8	264254.8	6.518	.01316
QUINT	R2=1.00	1	121972.6	121972.6	3.008	.08781
RESIDUAL		1	2688.000	2688.000	.066	*****
RESIDUO		62	2513751.	40544.36		

COEFICIENTE DE VARIACAO = 108.875



\* TITULO = F O L H A M M  
PAGINA \*  
\* SUBTITULO = 1 \*  
\* \* \*

\* \*\*\* SAEG-4.0 \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* UFV-MG-BR \*\*\*\*\*

LISTAR TRAT DIA31

OBSERV.	TRAT	DIA31
1	1.000	307.407
2	2.000	75.631
3	3.000	48.500
4	4.000	261.167
5	5.000	312.333
6	6.000	120.643
7	7.000	181.167