

Conservação *in vitro* de germoplasma indexado de três cultivares de amarílis (*Hippeastrum Herb.*)⁽¹⁾

LINCOLN AMARAL⁽²⁾; RENATO FERRAZ DE ARRUDA VEIGA⁽²⁾; ANTONIO FERNANDO CAETANO TOMBOLATO^(2,3); WILSON BARBOSA^(2,3) e ARMANDO CONAGIN⁽²⁾

RESUMO

Pesquisaram-se os efeitos das concentrações de 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose, adicionadas à solução salina MS de Murashige e Skoog (1962) a 50 e 100% e das temperaturas em sala de crescimento de 18 °C e 25 °C, na conservação *in vitro* de três acessos do BAG-amarílis (*Hippeastrum Herb.*), do Instituto Agronômico (IAC). Os ápices caulinares de 'Apple Blossom', 'Red Lion' e 'Orange Sovereign', contendo 2 primórdios foliares, foram extraídos de bulbos e submetidos a 37°C por 40 dias, para efeito de eliminação de vírus. Efetuaram-se análises de partículas virais de folhas das três cultivares cultivadas em campo e *in vitro*. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 x 2, composto de 12 tratamentos, 10 repetições e 1 explante por parcela. Verificou-se que a associação da termoterapia com a cultura *in vitro* reduziu a presença de partículas virais em 70, 65 e 55% em 'Orange Sovereign', 'Red Lion' e 'Apple Blossom', respectivamente. Explantes das três cultivares de amarílis apresentaram menor desenvolvimento quando cultivados no meio de cultura MS contendo a metade da concentração de sais, acrescido de 10 g L⁻¹ de sacarose e incubado a 18 °C, mantendo-se viáveis por 90 dias. Nessas condições, os explantes desenvolveram, em média, 1 bulbilho com 2,2; 2,0 e 2,3 folhas de 32,5; 27,8 e 25,8 cm de comprimento; 1,7; 2,3 e 2,0 raízes de 20,5; 16,8 e 18,2 cm e massa fresca de 3,9; 3,4 e 3,1g, respectivamente, para 'Apple Blossom', 'Red Lion' e 'Orange Sovereign'.

Palavras-chave: termoterapia, vírus, sacarose, temperatura, *Hippeastrum Herb.*

ABSTRACT

In vitro germplasm conservation of three indexed amaryllis cultivars (*Hippeastrum Herb.*)

This work researched the effects of the 10, 20, 30 and 40 g L⁻¹ sucrose concentration, added to MS nutrients solution of Murashige and Skoog (1962), at 50 and 100%, and those of the temperatures of a growing room at 18°C and 25°C, in the *in vitro* conservation in three BAG-amaryllis accesses (*Hippeastrum Herb.*), of Instituto Agronômico (IAC). The stalk terminal buds of 'Apple Blossom', 'Red Lion' and 'Orange Sovereign', containing 02 primordial foliages, were extracted from bulbs, which were treated with thermotherapy at 37°C for 40 days. Analyses of viral particles from the three cultivars leaves, cultivated in field and *in vitro*, were carried out. The experimental setting adopted was entirely casual, in a factorial scheme of 2 x 3 x 2, consisting of 12 treatments, 10 repetitions and 01 explant per sample. It was noticed that the association of thermo therapy with the *in vitro* culture reduced the presence of viral particles by 70, 65 and 55% for 'Orange Sovereign', 'Red Lion' and 'Apple Blossom', respectively. Explants from the three amaryllis cultivars reached the smallest development when cultivated in MS medium (50%), to which was added 10 g L⁻¹ of sucrose, and which was incubated at 18°C, keeping their viability for at least 90 days. On these conditions, the explants developed, on average, 01 bulb with 2,2; 2,0 and 2,3 leaves 32,5; 27,8 and 25,8 cm long; 1,7; 2,3 and 2,0 roots of 20,5, 16,8 and 18,2 cm and fresh mass of 3,9; 3,4 and 3,1g, for 'Apple Blossom', 'Red Lion' and 'Orange Sovereign', respectively.

Key words: thermotherapy, virus, sucrose, temperature

⁽¹⁾ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada no Instituto Agronômico (IAC), na área de concentração: Melhoria Genética Vegetal, do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical. Recebido para publicação em 27/10/2006 e aceito em 10/10/2007.

⁽²⁾ Instituto Agronômico (IAC) - Caixa Postal 28 - 13001-970 - Campinas (SP).

⁽³⁾ Bolsista CNPq (Produtividade em Pesquisa)

1. INTRODUÇÃO

O amarílis (*Hippeastrum* Herb.) é uma Amaryllidaceae nativa das Américas do Sul e Central, distribuída desde a Argentina até o México (DUTILH, 1987). Mesmo havendo 40 espécies nativas de amarílis no Brasil, há carência de acessos em bancos ativos de germoplasma para suprir programas de melhoramento genético e intercâmbio científico.

A conservação dos recursos genéticos vegetais, frente ao atual cenário de acelerada destruição ambiental, é hoje uma demanda de interesse global. Dessa forma, é imperativo priorizar estratégias para preservar os recursos genéticos, bem como pesquisar novas técnicas de conservação de espécies nativas. A conservação de germoplasma *in vitro* tem diversas vantagens em relação à conservação no campo, tais como: menor risco de perda do germoplasma, maior qualidade fitossanitária, redução no custo de manutenção, rápida multiplicação e armazenamento, menor necessidade de espaço, disponibilidade imediata para propagação e facilidade de intercâmbio (DORION et al., 1991). A utilização de retardantes de crescimento, reguladores osmóticos e hormonais, redução da temperatura de incubação e da concentração de sais e da sacarose do meio MS, podem reduzir o custo de manutenção das coleções *in vitro*, diminuindo-se a necessidade de subcultivos constantes, com economia de pessoal, equipamentos e insumos. A redução da temperatura nas salas de crescimento, aliada à diminuição na concentração dos sais e de sacarose do meio MS, têm sido estratégias que, utilizadas conjuntamente, têm possibilitado sucesso no estabelecimento das condições favoráveis ao desenvolvimento mínimo *in vitro* em várias culturas (DODDS e ROBERTS, 1993). Os reguladores osmóticos podem reduzir a viabilidade dos explantes, além de também estarem relacionados com a incidência de instabilidade genética ao material micropropagado (CHARRIER et al., 1991).

Para se conservar adequadamente qualquer acesso vegetal, é desejável que os mesmos estejam livres de patógenos. No Brasil, há três tipos principais de vírus que afetam a cultura do amarílis. O mais freqüente, que chega a infectar até 100% das plantas no campo, é o vírus do mosaico do *Hippeastrum* (*Hippeastrum mosaic potyvirus* – HiMV). No campo, o controle dessa virose é quase impossível, especialmente devido à sua presença em plantas hospedeiras. As medidas profiláticas mais comumente adotadas consistem no combate contínuo aos insetos vetores e na eliminação total das plantas com sintomas. O *Nerine latent carlavirus* (NeLV) ocorre em *Hippeastrum*, freqüentemente associado ao HiMV. Embora nem sempre expressem sintomas evidentes, os danos provocados pelo NeLV prejudicam sensivelmente a qualidade da produção (LOEBENSTEIN et al., 1995). Em amarílis, o vírus vira cabeça do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV) é de ocorrência esporádica e induz lesões cloróticas nas folhas. Mesmo não sendo muito freqüente, esse vírus provoca grandes perdas ao cultivo

de *Hippeastrum* (CHO et al., 1986). De acordo com BAPAT e NARAYANASWANY (1976), a aplicação das técnicas de cultura de ápices caulinares em amarílis iniciou-se em 1972. Essa técnica permite a produção de material com alta qualidade fitossanitária (MOREL e MARTIN, 1952). Outras técnicas têm sido associadas à cultura de ápices caulinares, como a termoterapia, para aumentar a eficiência no processo de eliminação de vírus (CONCI e NOME, 1991).

Objetivando a conservação *in vitro* de germoplasma de amarílis, pesquisaram-se neste trabalho meios de cultura, destituídos de reguladores de crescimento, temperaturas diferenciadas em sala de crescimento e a limpeza fitossanitária por associação da termoterapia com a cultura de ápices caulinares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Vinte bulbos de cada uma das cultivares: Apple Blossom, Orange Sovereign e Red Lion, após tratamento a 37 °C em câmara termostática por 40 dias, foram dissecados extraíndo-se os ápices caulinares de 5 mm de comprimento contendo 2 primórdios foliares (TOMBOLATO et al., 1998). Objetivando aumentar a quantidade desse material *in vitro*, cultivaram-se os explantes em tubos de ensaio contendo a solução salina de MURASHIGE e SKOOG (1962), suplementada com mio-inositol 100 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹ de glicina; 30 g L⁻¹ de sacarose; 2,5 mg L⁻¹ de ácido 3-indolacético (AIA) e 10 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (6-BAP). O meio foi solidificado com 6,2 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 6,0 antes da esterilização em autoclave. O material permaneceu em sala de crescimento por 60 dias, sob fotoperíodo de 16 horas (luz fria, branca de 2.500 lux) e temperatura de 25°±2 °C.

A exemplo das plantas cultivadas no campo, extraíram-se segmentos foliares de 1 cm² de plantas micropropagadas, para análise de partículas virais. Para diagnose viral, utilizou-se o microscópio eletrônico de transmissão (MET), por meio da técnica *leaf-dip*.

Para os testes de conservação *in vitro*, selecionaram-se 140 explantes livres de vírus, de cada cultivar, os quais foram cultivados em diferentes meios de cultura e temperaturas de sala de crescimento. Utilizaram-se a solução salina MS a 100% e 50%, sacarose a 10, 20 e 40 g L⁻¹ e temperatura de incubação de 18 °C e 25 °C, em câmara de cultivo. Adotaram-se dois tratamentos controles, totalizando 14 tratamentos de conservação por cultivar, com dez repetições por tratamento e uma planta por parcela. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos dispostos em esquema fatorial 2 x 3 x 2. Para análise estatística, realizou-se a análise geral da variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelos testes “t” e de Tukey a 5% de probabilidade. Por meio de análise fatorial, determinou-se a influência dos tratamentos na composição da massa fresca das plantas *in vitro*. Após 90 dias avaliou-se o número e o comprimento médio (mm) de folhas e raízes, o número de bulbilhos e a massa fresca (g) das plantas *in vitro* e adotou-se o critério “nota” de 1 a 10 para a análise, sendo que cada número da escala equivalente a aproximadamente 10 mm do

comprimento total da planta (soma do comprimento da maior folha ao comprimento da maior raiz).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas primárias das 20 amostras de cada cultivar, analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão, tiveram resultado positivo para presença de partículas virais. Visualizaram-se, no material coletado no campo, partículas virais alongada-flexuosas típicas de *Carlavirus* (provavelmente *Nerine latent carlavirus* - NeLV) e ou espécies de *Potyviriidae* (provavelmente *Hippeastrum mosaic potyvirus* - HiMV), indicando contaminação em todas as matrizes analisadas. Tais resultados justificaram plenamente a iniciativa de se realizar a conservação *in vitro* de germoplasma de amarílis a partir de acessos indexados.

Esses resultados corroboram a observação de QUAK (1977), de que provavelmente todas as espécies propagadas vegetativamente são infectadas por uma ou mais espécies de vírus, quando se encontram no campo, principalmente os latentes, que são de difícil identificação, como é o caso do *Nerine latent carlavirus*. Após o tratamento termoterápico, associado à cultura *in vitro* dos ápices caulinares, foi observada uma redução da presença de vírus em 55% em 'Apple Blossom', 65% em 'Red Lion' e 70% em 'Orange Sovereign'. Mesmo havendo relativa eficiência, acredita-se que haja necessidade de novas análises em folhas adultas dessas cultivares. Isto porque, durante a organogênese *in vitro*, o material está em intenso processo de divisão celular, podendo conter traços de partículas virais não detectáveis ao microscópio eletrônico (BALASINGAM et al., 1988).

Conforme dados da tabela 1, verifica-se tendência de maior potencial de conservação em meio MS 50% e concentração de sacarose de 10 g L⁻¹, nas três cultivares pesquisadas. A temperatura de 25 °C demonstrou menor potencial de conservação nas três cultivares. A regressão entre "massa fresca" e "nota" foi altamente significativa ($p < 0,0001$), demonstrando elevada correlação entre as duas variáveis. A análise geral da variância (tabela 2) indicou um valor de F altamente significativo ($\alpha < 0,0001 = 0,01\%$). Observou-se que, as diferenças entre tratamentos e cultivares na composição das médias da massa fresca, não são casuais, exercendo efeito expressivo entre si. Os resultados do teste de Tukey apontaram diferença altamente significativa ($\alpha < 0,0001 = 0,01\%$) entre as médias da massa fresca das cultivares. Entre 'Red Lion' e 'Orange Sovereign', o valor de "p" para as médias da massa fresca foi de 0.0546 ($\alpha = 0,0546 = 5,46\%$). Apesar de próximo da significância de 5%, nesse caso, não é possível rejeitar a hipótese de igualdade entre essas duas cultivares, que não diferiram entre si e se comportaram de forma homogênea. Assim, 'Apple Blossom' (média geral da massa fresca de 6,64 g), teve menor potencial de conservação *in vitro* do que 'Red Lion' (média geral da massa fresca de 5,87 g) e 'Orange Sovereign' (média geral da massa fresca de 5,72 g). Por meio de análise fatorial avaliaram-se as interações e efeitos nos tratamentos de um a doze (tabela 3). A fim de uniformizar o número de parcelas, utilizaram-se

apenas sete repetições por tratamento, descartando-se as parcelas perdidas.

Houve efeito altamente significativo ($F < 0,0001$) das variáveis "cultivar", "sacarose", "temperatura" e "meio MS" sobre a composição das médias da massa fresca; demonstrando que tais variáveis influenciaram a conservação *in vitro* de amarílis. A interação entre "cultivares" e "sacarose" ($F = 2,11\%$) foi significativa a 5% de probabilidade. As variáveis, "sacarose" e "temperatura" ($F < 0,0001$), "sacarose" e "meio" ($F < 0,0001$), "temperatura" e "meio" ($F < 0,0001$) e "cultivares" e "temperatura" ($F = 0,19\%$), interagiram entre si de forma altamente significativa. As variáveis "cultivares" e "meio" responderam de forma homogênea e não diferiram entre si na composição das médias da massa fresca nos tratamentos de um a doze.

O teste "t" posicionou as cultivares em grupos distintos (grupos A, B e C), demonstrando efeito significativo entre si. Ao se excluírem as parcelas perdidas por contaminação, apesar de o número de repetições da análise ter sido diminuído de dez para sete, permitiu-se maior homogeneidade dos dados (tabela 4). Com isso, verificou-se influência significativa de cada cultivar na composição das médias da massa fresca das plantas *in vitro* (6,05 g em 'Apple Blossom'; 5,18 g em 'Red Lion' e 4,98 g em 'Orange Sovereign'). Como cada cultivar exerceu efeito próprio na produção (massa fresca) das plantas *in vitro*, elas comportaram-se de maneira distinta na conservação *in vitro*. 'Orange Sovereign' teve o melhor potencial de conservação. Já 'Red Lion' proporcionou resultado intermediário e 'Apple Blossom' demonstrou menor capacidade para conservação, em períodos mais prolongados. Portanto, ao trabalhar com bancos de germoplasma de *Hippeastrum*, recomenda-se planejar as condições de conservação *in vitro* mais adequadas para cada cultivar, de acordo com o período de tempo que se espera conservar o material e os objetivos da pesquisa.

As concentrações de sacarose de 20 e 40 g L⁻¹, ambas pertencentes ao grupo A do teste "t", tiveram resultados semelhantes, diferindo significativamente de 10 g L⁻¹ (grupo B). A temperatura de 18 °C e 25 °C e do meio MS completo e incompleto foram também classificados em grupos distintos do teste "t", indicando efeito diferencial na composição das médias da massa fresca. A padronização dos dados permitiu indicar as condições fisiológicas mais propícias à conservação *in vitro* para as três cultivares testadas: concentração de 10 g L⁻¹ de sacarose, temperatura de incubação de 18 °C e 50% da concentração de macro e micronutrientes do meio de MURASHIGE e SKOOG (1962).

Realizou-se, por meio da análise fatorial, avaliação da interação entre as três cultivares e os 14 tratamentos de conservação, comparando-se as médias e desvios-padrão da variável massa fresca (tabela 4). Para uniformizar os dados, foram computadas apenas sete repetições por tratamento, incluindo-se os tratamentos testemunhas. A interação entre cultivares e tratamentos demonstrou-se altamente significativa ($F < 0,0001$). Por meio do teste "t" constatou-se diferença significativa das três cultivares entre si, sendo cada qual inserida em um grupo "t" específico. O teste "t" ordenou os tratamentos

em 10 grupos distintos. Considerando-se todos os tratamentos de conservação *in vitro*, observa-se (figura 1) que o tratamento 3 (10 gramas.litro⁻¹ de sacarose, 18 °C e 50% de meio MS) permitiu o maior patamar de conservação *in vitro* das mudas micropropagadas de amarílis. Assim, como cada cultivar foi classificada em um grupo distinto do teste “t” e os dados contemplam a média da massa fresca para as 3 cultivares, pode-se comprovar, quantitativamente, que esse tratamento foi o mais efetivo à conservação *in vitro* para as três cultivares em estudo. Os tratamentos controles do experimento (13 e 14) foram aqueles que tiveram a menor dispersão de dados e propiciaram o menor patamar de conservação *in vitro*. Os tratamentos intermediários entre o grupo controle e o grupo 3, caracterizaram-se por elevada dispersão dos dados. Os tratamentos 5 e 2 (grupo D do teste “t”) exerceram a mesma influência na conservação *in vitro* de amarílis, fato esse também observado entre os tratamentos 1, 7 e 12.

4. CONCLUSÕES

1. Na micropropagação de amarílis, o meio de cultura composto da solução salina MS, suplementada com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,0 mg L⁻¹ de glicina e 30 g L⁻¹ de sacarose, sem adição de reguladores de crescimento, proporciona adequado desenvolvimento dos explantes para ‘Apple Blossom’, ‘Red Lion’ e ‘Orange Sovereign’;

2. A associação da termoterapia com a cultura de ápices caulinares demonstra relativa eficiência na limpeza de vírus nas três cultivares de amarílis estudadas;

3. O meio de cultura contendo a metade da concentração dos macro e micronutrientes do meio de MURASHIGE e SKOOG (1962), acrescido de 10 g L⁻¹ de sacarose, não prejudica o desenvolvimento dos explantes conservados *in vitro*. Associando-se esse meio de cultura à temperatura de 18 °C em sala de crescimento, os explantes reduzem o desenvolvimento vegetativo e mantêm-se viáveis por 90 dias sem a necessidade de novos subcultivos, enquanto a frequência de sub-cultivos pelo método convencional é a cada 30 dias.

REFERÊNCIAS

- BALASINGAM, G.; ELLISON, N.; MILNE, K.S.; FORSTER, R.L.S. Sensitive and specific detection of two filamentous viruses from nerines using cloned cDNA probes. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.234, p.267-274, 1988.
- BAPAT, V.A.; NARAYANASWAMY, M. Growth and organogenesis in explant tissues of *Amaryllis* in culture. Bulletin of the **Torrey Botanical Club**, Bronx, v. 103, n.2, p.53-56, 1976.
- CHARRIER, A.; DEREUDDRE, J.; ENGELMANN, F. The implications of biotechnology in germplasm conservation and utilization. Crop Genetic Resources of Africa. Vol II. N.Q. Ng, P. Perrino, F. Attere, H. Zedan ed., Ibadan, Nigeria, IITA/IBPGR/UNEP/CNR, In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CROP GENETIC RESOURCES OF AFRICA. Nigéria, 1991. **Proceedings...** Nigeria, 1991, p.279-286.
- CHO, J.J.; MAU, R.F.L.; GONSALVES, D.; MITCHELL, W.C. Reservoir weed host of tomato spotted wilt virus. **Plant Disease**, Saint Paul, v.70. 1986.
- CONCI, V.C.; NOME, S.F. Vírus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.132, p. 186-192, 1991.
- DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 2nd. ed. Cambridge, Estados Unidos: Cambridge University Press, 1993.
- DORION, N.; KADRI, M.; BIGOT, C. In vitro preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.298, p.291-300, 1991.
- DUTILH, J.H.A. **Investigações citotaxonômicas em populações brasileiras de *Hippeastrum Herb.*** 1987, Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Campinas, UNICAMP: Instituto de Biologia,
- LOEBENSTEIN, G.; LAWSON, R.H.; BRUNT, A.A. **Virus and Virus-like Diseases of Bulb and flower Crops**. Wiley Publisher., 1995. 543 p.
- MOREL, G.; MARTIN, C. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. **Comptes Rendues Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences**, Paris, v.235, 1952.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.437-497, 1962.
- QUAK, F. Meristem culture and vírus free plants. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.598-618.
- TOMBOLATO, A.F.C.; EGLIT, A.C.; COSTA, A.M.M. Amarílis (*Hippeastrum* sp.) In: TOMBOLATO, A.F.C. & COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. p.15-17. (Boletim técnico, 174)

Tabela 1. Médias das notas dos tratamentos de conservação *in vitro* de três cvs. de amarílis: Aple Blossom (AB), Red Lion (RL) e Orange Sovereign (OS). Instituto Agronômico (IAC), 2004.

Table 1. Treatments averages in the *in vitro* conservation of three amaryllis cultivars: Apple Blossom (AB), Red Lion (RL) and Orange Sovereign (OS). Instituto Agronômico (IAC), 2004.

TRATAMENTOS <i>Treatments</i>	Sacarose <i>Sucrose</i> (g L ⁻¹)	Temperatura <i>Temperature</i> (°C)	MS*	NOTAS <i>Grades</i>		
				AB	RL	OS
1	10	18	1	7,88	5,00	6,00
2	10	25	1	8,88	7,60	7,11
3	10	18	½	5,22	4,55	4,37
4	10	25	½	6,30	4,66	4,77
5	20	18	1	8,22	7,33	7,55
6	20	25	1	9,66	9,12	8,50
7	20	18	½	7,55	6,30	6,66
8	20	25	½	8,11	7,11	6,87
9	40	18	1	8,62	6,87	7,12
10	40	25	1	9,28	9,57	9,00
11	40	18	½	6,75	4,88	5,50
12	40	25	½	7,37	5,50	6,00
13	30	18	1	10,00	10,00	10,00
14	30	25	1	10,00	10,00	10,00

* 1= 100% e ½= 50% da solução salina MS (Murashige e Skoog, 1962).

1= 100% e ½= 50% of MS nutrients solution (Murashige & Skoog, 1962).

Tabela 2. Análise da variância dos tratamentos de conservação *in vitro* em 3 cv. de amarílis, Instituto Agronômico (IAC), 2004

Table 2. Variance analysis in the *in vitro* conservation treatments of three amaryllis cultivars, Instituto Agronômico (IAC), 2004.

F.V. <i>Source</i>	G.L. <i>Degrees of Freedom</i>	S.Q. <i>Sum of Square</i>	Q.M. <i>Mean Square</i>	F <i>F. Value</i>	Pr > F
Modelo/Model	15	1783.234500	118.882300	491.23	< 0.0001
Erro/Error	344	83.250520	0.242007		
Total	359	1866.485020			

	Coef. Det. <i>R-Square</i> R ²	Coef. Var. <i>Coeff Var.</i> %	Desvio Padrão <i>Std. Deviation</i>	Média Massa Fresca <i>Fresh mass mean</i> (g)
	0.955397	8.174554	0.491942	6.017972

Médias por quadrados mínimos - Ajuste por Comparações Múltiplas: Tukey-Kramer
Averages by minimum squares - Tukey-Kramer Multiple Comparison Procedure

Cultivar	MF LSMEAN	MF LSMEAN
Apple Blossom	6.64352507	1
Red Lion	5.87586736	2
Orange Sovereign	5.72823004	3

Médias por quadrados mínimos para efeito de cultivar

<i>Averages by minimum squares to effect cultivar</i>			
i/j	1	2	3
Apple Blossom		<.0001	<.0001
Red Lion	<.0001		0.0546
Orange Sovereign	<.0001	0.0546	

Tabela 3. Análise fatorial da influência das variáveis fisiológicas, em 3 cv. de amarflis, na composição das médias da massa fresca (MF) dos tratamentos de 1 a 12. Instituto Agrônômico (IAC), 2004**Table 3.** Factorial analysis of the influence of physiological variables, in three amaryllis cultivars, on the composition of the fresh mass averages of the treatments 1 to 12. Instituto Agrônômico (IAC), 2004.

F.V. <i>Source</i>	G L. <i>Degrees of Freedom</i>	S.Q. <i>Sum of Square</i>	Q.M. <i>Mean Square</i>	F <i>F. Value</i>	Pr > F
Modelo/Model	19	652,7125246	34,3532908	108,19	< 0,0001
Erro/Error	232	73,6677940	0,3175336		
Total	251	726,3803187			

Coef. Det. <i>R-Square</i> R ²	Coef. Var. <i>Coeff Var.</i> %	Desvio Padrão <i>Std. Deviation</i>	Média Massa Fresca <i>Fresh mass mean</i> (g)
0,898582	10,42043	0,563501	5,407659

F.V. <i>Source</i>	G L. <i>D.F.</i>	Anova SS <i>Anova SS</i>	Q.M. <i>M.S.</i>	F <i>F.Value</i>	Pr > F <i>Pr > F</i>
Cultivar	2	53,8868579	26,9434290	84,85	<,0001
Sacarose	2	107,0282389	53,5141194	168,53	<,0001
Temperatura	1	120,9590004	120,9590004	380,93	<,0001
Meio MS	1	269,7891153	269,7891153	849,64	<,0001
Cult*Sac	4	3,7411111	0,9352778	2,95	0,0211
Cult*Temp	2	4,0761675	2,0380837	6,42	0,0019
Cult*Meio	2	0,0000000	0,0000000	0,00	1,0000
Sac*Temp	2	18,6984913	9,3492456	29,44	<,0001
Sac*Meio	2	15,5302494	7,7651247	24,45	<,0001
Temp*Meio	1	60,0066699	60,0066699	188,98	<,0001

Teste t para MF cult - Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes a 5% de probabilidade

Test "t" for FM cult - Averages with the same letter are not significantly different (probability=0.05)

Grupo t <i>Group t</i>	Média <i>Mean</i>	N	Cultivar <i>Cultivar</i>
A	6,05155	84	Apple Blossom
B	5,18476	84	Red Lion
C	4,98667	84	Orange Sovereign

Teste t para MF Sac - Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes

Test "t" for FM Sac - Averages with the same letter are not significantly different

Grupo t <i>Group t</i>	Média <i>Mean</i>	N	Sacarose <i>Sucrose</i>
A	5,91643	84	2
A	5,81881	84	4
B	4,48774	84	1

Teste t para MF Temp - Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes

Test "t" for FM Temp - Averages with the same letter are not significantly different

Grupo t <i>Group t</i>	Média <i>Mean</i>	N	Temperatura °C <i>Temperature</i>
A	6,10048	126	25
B	4,71484	126	18

Teste t para MF Meio MS - Médias com a mesma letra não diferem significativamente

Test "t" for FM MS MEDIUM - Averages with the same letter are not significantly different

Grupo t <i>Group t</i>	Média <i>Mean</i>	N	Meio MS <i>Medium MS</i>
A	6,43417	127	1
B	4,36472	125	½

Tabela 4. Comparação das médias e desvios-padrão entre cultivares e os 14 tratamentos de conservação *in vitro* em três cv. de amarílis, Instituto Agronômico (IAC), 2004.

Table 4. Comparison of averages and standard deviation among cultivars and the 14 treatments of *in vitro* conservation of 3 *amaryllis* cultivars. Instituto Agronômico (IAC), 2004.

F.V. <i>Source</i>	G.L. <i>Degrees of Freedom</i>	S.Q. <i>Sum of Square</i>	Q.M. <i>Mean Square</i>	F <i>F. Value</i>	Pr > F
Modelo/Model	41	1543,304116	37,641564	367,91	< 0,0001
Erro/Error	252	25,782743	0,102312		
Total	293	1569,086859			

Coef. Det. <i>R-Square</i> R ²	Coef. Var. <i>Coeff Var.</i> %	Desvio Padrão <i>Std. Deviation</i>	Média Massa Fresca <i>Fresh mass mean</i> (g)
0,983568	5,246848	0,319863	6,096293

F.V. <i>Source</i>	G.L. <i>D.F.</i>	Anova SS <i>Anova SS</i>	Q.M. <i>M.S.</i>	F <i>F. Value</i>	Pr > F <i>Pr > F</i>
Cultivar	2	45,562646	22,781323	222,66	<,0001
Tratamento	13	1453,885659	111,837358	1093,10	<,0001
Cult*Trat	26	43,855812	1,686762	16,49	<,0001

Teste t para MF cult - Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes
Test "t" for FM cult - Averages with the same letter are not significantly different

Grupo t	Média	N	Cultivar
A	6,64592	98	Apple Blossom
B	5,89827	98	Red Lion
C	5,74469	98	Orange Sovereign

Teste t para Tratamentos (MF) - Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes a 5% de probabilidade
Test "t" for Treatments (FM) - Averages with the same letter are not significantly different (probability=0.05)

Grupo t	Média	N	Tratamento
A	10,29571	21	S30 T25 MS
A	10,16048	21	S30 T18 MS
B	9,03238	21	S40 T25 MS
C	8,15762	21	S20 T25 MS
D	5,72286	21	S10 T25 MS
D	5,58857	21	S20 T18 MS
E	5,38143	21	S40 T18 MS
F	5,15476	21	S20 T18 MS
G	4,76476	21	S20 T18 MS½
G	4,76429	21	S10 T18 MS
G	4,60619	21	S40 T25 MS½
H	4,25524	21	S40 T18 MS½
I	3,92905	21	S10 T25 MS½
J	3,53476	21	S10 T18 MS½

S = sacarose /sucrose (g L⁻¹)

T = temperatura / temperature(°C)

MS = solução salina / nutrients solution MURASHIGE e SKOOG (1962)

MS½ = metade da solução salina / half of nutrients solution MURASHIGE e SKOOG (1962)

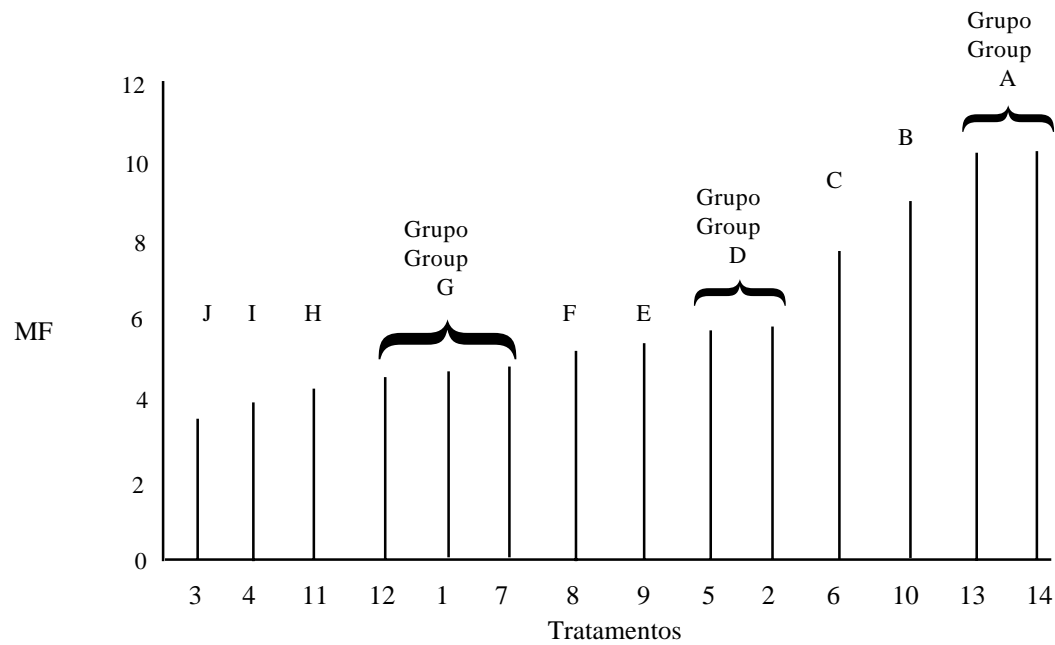


Figura 1. Grupos do teste “t” para os tratamentos de conservação *in vitro* em 3 cvs. de amarílis, sendo Grupo A (13 e 14), Grupo B (10), Grupo C (6), Grupo D (5 e 2), Grupo E (9), Grupo F (8), Grupo G (7, 1 e 12), Grupo H (11), Grupo I (4) e Grupo J (3); realizados no IAC, em 2004, sendo:

Figure 1. “t” test groups for the *in vitro* conservation treatments of three amaryllis cultivars, in which Group A (13 and 14), Group B (10), Group C (6), Group D (5 and 2), Group E (9), Group F (8), Group G (7, 1 and 12), Group H (11), Group I (4) and Group J (3); carried out at IAC, in 2004, in which:

Tratamentos <i>Treatments</i>	Sacarose <i>Sucrose</i> (g L ⁻¹)	Temperatura <i>Temperature</i> (°C)	MS*
1	10	18	1
2	10	25	1
3	10	18	½
4	10	25	½
5	20	18	1
6	20	25	1
7	20	18	½
8	20	25	½
9	40	18	1
10	40	25	1
11	40	18	½
12	40	25	½
13	30	18	1
14	30	25	1

* 1= 100% e ½= 50% da solução salina MS (Murashige e Skoog, 1962)

* 1= 100% e ½= 50% of MS nutrients solution (Murashige & Skoog, 1962).