

CULTURA *IN VITRO* DE MERISTEMAS DE BATATA-DOCE (*IPOMOEA BATATAS* (L.) LAM.)¹

ONEIDE FERREIRA DE ANDRADE CASTRO² e ARNÓBIO GONÇALVES DE ANDRADE³

RESUMO - Cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) foram avaliadas *in vitro* em relação a sua capacidade de regeneração de plântulas a partir de ápices caulinares e micropropagação. Os ápices caulinares foram inoculados no meio MS suplementado com ANA + BAP + KIN + AG3 e ANA + BAP + AG3. As cultivares RC 1.8, MFT (Mãe-de-Família També), TR 3, 473 e Arroba produziram plântulas de alturas similares, porém com diferentes taxas de regeneração. A suplementação com 0,01 mg/l de ANA + 1,0 mg/l de BAP foi a mais recomendável. A micropropagação dessas plântulas, através de segmentos nodais inoculados em meio MS contendo 1,0 mg/l de AG3 não mostrou diferenças entre as cultivares.

Termos para indexação: cultivar, plântulas, micropropagação, cultura de brotos apicais.

MERISTEM CULTURE OF SWEET POTATO (*IPOMOEA BATATAS* (L.) LAM)

ABSTRACT - *In vitro* sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) was evaluated as to its ability to regenerate into plantlets and micropropagation. Apical meristems were inoculated on MS medium supplemented alternatively with ANA + BAP; ANA + KIN + GA3; and ANA + BAP + GA3. The cultivars RC 1.8, MFT (Mãe-de-Família També), TR 3, 473 and Arroba led plantlets with similar height but different regeneration ratio. The supplementation with 0.01 mg/l of ANA plus 1.0 mg/l of BAP was indicated for Arroba and MFT; however, for TR 3, 473 and RC 1.8, the supplementation with 0.005 mg/l ANA + 0.5 mg/l BAP + 0.25 mg/l AG3 was recommended. Plantlets were propagated through nodal segments using MS medium with 1.0 mg/l of GA3. Differences between cultivars were not observed.

Index terms: cultivar, plantlets, micropropagation, culture *in vitro*.

INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma hortaliça freqüentemente cultivada em países em desenvolvimento, inclusive no Brasil, especialmente no Nordeste, onde constitui a principal hortaliça consumida. É plantada por pequenos produtores,

sendo considerada muito rústica e pouco exigente, razão da escassez de estudos e investimentos tecnológicos, para o melhor aproveitamento do seu potencial agrônômico. É propagada vegetativamente por ramos e raízes, o que favorece a disseminação de doenças causadas por fungos e vírus (Miranda et al., 1989; Souza, 1990) e a proliferação de insetos (Litz & Conover, 1978; Miranda et al., 1989).

A cultura *in vitro* de meristemas é considerada um instrumento valioso na obtenção de plantas livres de vírus e de outros patógenos, na propagação clonal rápida, no desenvolvimento de variedades melhoradas (tolerância a doenças, a herbicidas, a salinidade e a seca), na preservação de germoplasma e no melhor entendimento dos princípios básicos

¹ Aceito para publicação em 2 de junho de 1995.

Extraído da Tese de Mestrado da autora.

² Bióloga, M.Sc.

³ Químico, Dr., Prof. Adj. Dep. Química da UFRPE. Rua D. Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-030 Recife-PE.

relacionados com a fisiologia, a bioquímica e o desenvolvimento das plantas (Vaz, 1986).

O primeiro cultivo *in vitro* de meristemas de batata-doce foi realizado por Nielsen (1960). Posteriormente, Elliott (1969) obteve os primeiros resultados promissores, pela adição de reguladores de crescimento. Mais recentemente, meristemas de batata-doce foram cultivados em meio básico MS suplementado com BAP (Litz & Conover, 1978), com associação de KIN e AIA (Alconero et al., 1975; Litz & Conover, 1978; Kuo et al., 1985; Gama, 1988; Dagnino et al., 1991), BAP e ANA (Love, 1985; Souza, 1990), BAP e AIA (Frison & Ng, 1981) ou com adição de AG3 (Rey & Mroginski, 1985; Dagnino et al., 1991).

Além das condições de incubação e do meio empregado, os resultados do cultivo *in vitro* de meristemas sofrem uma marcada influência do genótipo. Assim, resultados diferentes são observados tanto no cultivo de diferentes espécies quanto de mesma espécie, variando de acordo com a cultivar empregada (Elliott, 1969; Alconero et al., 1975; Litz & Conover, 1978; Frison & Ng, 1981; Kuo et al., 1985; Love, 1985; Gama, 1988; Dagnino et al., 1991). Contudo, existem cultivares que respondem de maneira similar (Rey & Mroginski, 1985).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o comportamento de cultivares de batata-doce, quanto à capacidade de regeneração de plântulas a partir da cultura de ápices caulinares e micropropagação, em três suplementações de fito-hormônios.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas cinco cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) (RC 1.8, Mãe-de-Família També, TR 3, 473 e Arroba) pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O meio básico de cultura empregado foi o de Murashige & Skoog (1962) com as suplementações (mg/l) denominadas de S 1- ANA (0,01) + BAP (1,0) (Souza 1990), S 2- ANA (0,1) + KIN (0,1) + AG3 (1,0) e S 3- ANA (0,005) + BAP (0,25) + AG3 (0,25) (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA). Na fase de micropropagação das plântulas, foi utilizado o meio MS suplementado com 1,0 mg/l de AG3 e pH ajustado para 5,9 (IPA). Os meios foram esterilizados em

autoclave a 121 °C durante 15 minutos e, após a semi-solidificação, foram conservados em câmara fria com temperatura de 4 °C a 8 °C.

Brotos apicais medindo aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram coletados de plantas cultivadas em telado, em recipiente com água destilada esterilizada, e levados ao laboratório. Em câmara de fluxo laminar, em condições estéreis, os brotos foram transferidos para outros frascos contendo álcool etílico a 70% (Brilux), durante 1 a 2 minutos, e, em seguida, para outro com hipoclorito de sódio (água sanitária Brilux a 20%), durante dez minutos. Posteriormente, os brotos foram lavados três vezes em água destilada autoclavada; depois da última lavagem, o material permaneceu na água até ser utilizado.

A excisão dos ápices foi feita sob esteriomicroscopia, com o auxílio de bisturis, estiletos e pinças esterilizados em álcool etílico a 100% (Brilux) e flambados antes de cada operação. Nessas condições, os ápices caulinares foram cuidadosamente seccionados com tamanho de aproximadamente 0,5 mm, contendo um par de primórdios foliares, e rapidamente transferidos para os tubos de ensaio que continham o meio de cultura. Em seguida, os tubos foram vedados com parafilme e incubados em sala de crescimento a 25±3 °C e fotoperíodo de 16 horas (luz do dia plus -40 w, F 30 t 12/LDP).

As avaliações das culturas, após inoculação, foram feitas diariamente, durante as duas primeiras semanas, e, em seguida, semanalmente, até 120 dias do experimento, observando-se o desenvolvimento das gemas, a oxidação, a contaminação, a formação de calos, folhas, raízes, gemas e a morfologia geral das plântulas formadas.

As plântulas obtidas foram removidas dos tubos de ensaio, em câmara de fluxo laminar, e seccionadas com bisturis estéreis em segmentos nodais de aproximadamente 2,0 cm, contendo geralmente três gemas. Os segmentos nodais foram inoculados no meio de micropropagação e incubados em sala de crescimento a 25±3 °C e fotoperíodo de 16 horas (luz do dia plus - 40 w, F 30 t/LDP).

As plântulas desenvolvidas foram aclimatadas para facilitar sua adaptação ao ambiente, que consistia em seccionar a metade de cada folha e raiz, antes de serem cultivadas em bandeja de isopor de 1,0m x 0,5m x 0,15m, com subdivisões de 5,5cm x 5,5cm x 12,0cm, em casa-de-vegetação, com temperatura média, no período chuvoso, de aproximadamente 27 ± 2 °C e, no período seco, de 29 ± 2 °C, fotoperíodo natural no mês de abril (aproximadamente doze horas) e regas automáticas tipo nebulização, de 50 segundos, a intervalos de 20 minutos, com a finalidade de manter a umidade adequada. A avali-

ação da aclimação foi realizada pela contagem das plântulas desenvolvidas, após 30 dias de cultivo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial, utilizando-se cinco cultivares com quatro repetições (cada repetição correspondia a um ápice caulinar inoculado). As alturas das plântulas (cm) foram transformadas segundo a raiz quadrada de $X + 1$, foram avaliadas pela análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey (Zonta & Machado, 1989). Os percentuais de regeneração de plantas foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado e a Prova Exata de Fisher (Dean et al., 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ápices caulinares desenvolveram-se inicialmente, originando gema, em torno da primeira semana de cultivo; em seguida, diferenciou-se em brotação, e, finalmente, desenvolveu-se até plântula com crescimento da parte aérea e formação de raízes. A percentagem média de regeneração de plântulas a partir dos ápices caulinares cultivados foi de 38,3%, sendo: 58,3% (Arroba); 41,7% (TR 3 e RC 1.8); 33,3% (473) e 16,7% (Mãe-de-Família Também) ($p < 0,05$) (Fig. 1).

Quanto ao meio de cultura empregado, foi observado que o S 2 (0,1 mg de ANA/l, 0,1 mg de KIN/l

e 1,0 mg de AG3/l) não regenerou plântulas, enquanto, no S 1 (0,01 mg de ANA/l, 1,0 mg de BAP/l) e no S 3 (0,005 mg de ANA/l, 0,25 mg de BAP/l e 0,25 mg de AG3/l), foram regenerados 70,0% e 45,0%, respectivamente ($p < 0,05$) (Fig. 2).

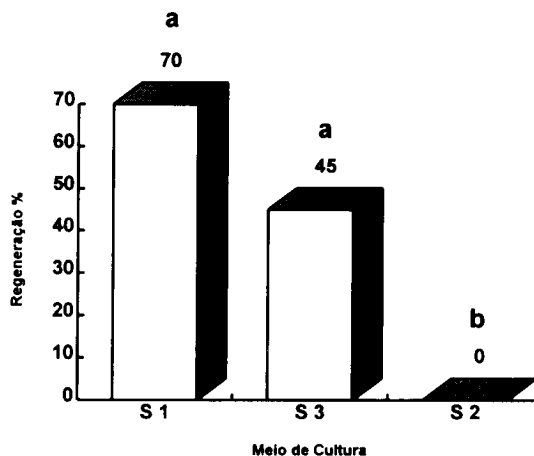


FIG. 2. Percentagem média de regeneração de plântulas a partir do cultivo *in vitro* de ápices caulinares de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) nas cultivares RC 1.8, Mãe-de-Família Também, TR 3, 473 e Arroba, após 120 dias de cultivo, de acordo com o meio.

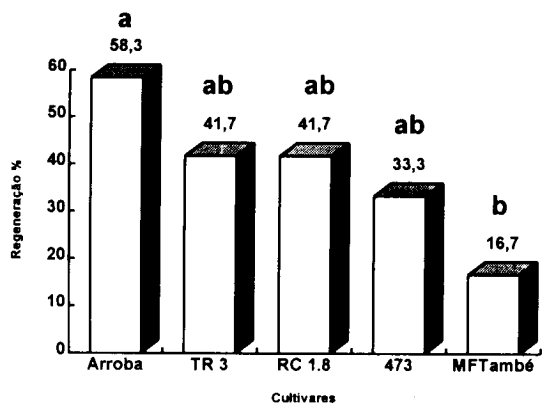


FIG. 1. Percentagem média de regeneração de plântulas a partir do cultivo *in vitro* de ápices caulinares de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), após 120 dias de cultivo nos meios S 1, S 2 e S 3, de acordo com a cultivar.

Calos, observados praticamente em todas as plântulas, dependendo do seu tamanho, causaram dificuldade ao crescimento das plântulas.

Quanto ao tamanho das plântulas desenvolvidas a partir dos ápices caulinares inoculados, embora não tenha sido observada diferença entre as cultivares empregadas, foi evidenciada diferença entre os meios de cultivo e a interação meio x cultivar ($p < 0,05$). Os meios S 1 e S 3 apresentaram tamanhos médios das plântulas de 1,45cm e 0,93cm, respectivamente, não diferindo entre si, enquanto o S 2 não regenerou plântula (Fig. 3). No que diz respeito à interação, a maior altura média das plântulas foi a registrada na cultivar Arroba (4,38cm), cultivada no S 1 ($p < 0,05$). Os ápices caulinares das cultivares TR 3, 473 e RC 1.8 desenvolveram-se de forma semelhante nos meios de cultura S 1 e S 3. A Mãe-de-Família Também só regenerou plântulas no meio S1.

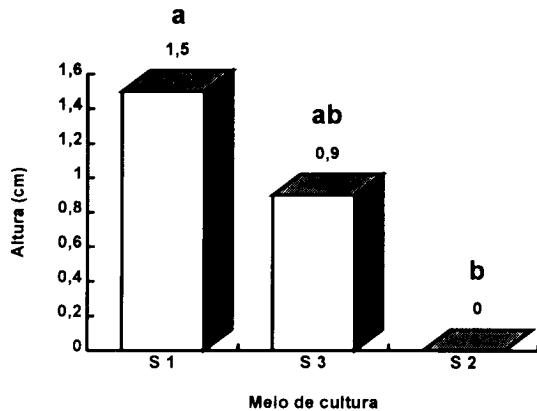


FIG. 3. Altura média das plântulas a partir do cultivo *in vitro* de ápices caulinares de batata-doce (*Ipomea batatas* (L.) Lam.), após 120 dias de cultivo *in vitro*, de acordo com o meio.

As plântulas desenvolvidas foram micropropagadas através de segmentos nodais que, em torno do sétimo dia de cultura, apresentavam início de formação de raízes e broto. Após 24 dias, observava-se desenvolvimento de parte aérea, brotação com gemas bem desenvolvidas e raízes; finalmente, aos 60 dias de cultivo, estavam plenamente desenvolvidas. A percentagem média de regeneração das plântulas foi de 84%, sendo: 100% (Vitória Roxa, Paulistinha e Co-Branca); 80% (Co-Roxa, Mãe-de-Família També, TR 3, Arroba e RC 1.8) e 60% (473). Quanto à altura média das plântulas, não foi evidenciada diferença significativa entre as cultivares; entretanto, numericamente, observou-se que a Vitória Roxa apresentou a maior altura (10,2cm) e a RC 1.8 (2,7 cm), a menor. Observou-se, ainda, que as cultivares Arroba e RC 1.8 assumiram aspectos de touceira com pequenos segmentos nodais, enquanto as demais apresentaram internódios longos, tendendo a formar ramos (Fig. 4).

Foram aclimatadas quatro plântulas por cultivar, originando, após 30 dias de cultivo, 19 (52,8%) plantas, assim distribuídas, de acordo com a cultivar: três (RC 1.8, Co-Roxa e Vitória Roxa), duas (TR 3, 473, Arroba e Co-Branca) e uma (Mãe-de-Família També e Paulistinha).

A percentagem de regeneração de plântulas a partir de ápices caulinares é um bom indicativo da

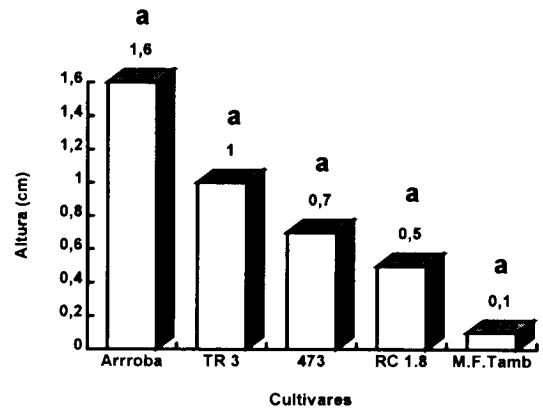


FIG. 4. Altura média das plântulas a partir do cultivo *in vitro* de ápices caulinares de batata-doce (*Ipomea batatas* (L.) Lam.), após 120 dias de cultivo *in vitro*, de acordo com as cultivares.

potencialidade que uma cultura possui ao ser multiplicada *in vitro*. As percentagens de desenvolvimento dos meristemas nos meios S 1 e S 3 foram superiores às observadas por outros autores (Kuo et al., 1985; Gama, 1988). O meio S 2 não regenerou plântulas, não sendo, portanto, recomendado. As percentagens obtidas nas diversas cultivares empregadas, embora tenham sofrido variações, conforme tem sido observado em outros trabalhos (Elliott, 1969; Alconero et al., 1975; Litz & Conover, 1978; Frison & Ng, 1981; Kuo et al., 1985; Love, 1985; Gama, 1988; Dagnino et al., 1991), foram suficientes para fornecer o material necessário à micropropagação no banco de germoplasma do IPA e à produção de material vegetal para outros experimentos.

Em relação aos meios de cultura, as maiores percentagens de regeneração e alturas foram obtidas com as suplementações com ANA e BAP (S 1), como previamente relatado (Souza, 1990), ou com ANA, BAP e AG3 em baixas concentrações (S 3). Contudo, o S 2, contendo ANA, KIN e AG3 em concentrações mais elevadas, não levou à formação de plântulas, sendo, portanto, inadequado para estimular o desenvolvimento dos ápices caulinares das cultivares estudadas. A combinação de auxinas e citocininas tem sido comumente empregada para o cultivo de meristemas de batata-doce com maior taxa de regeneração e altura das plântulas (Alconero

et al., 1975; Kuo et al., 1985; Love, 1985; Gama, 1988). Deve-se considerar que esses trabalhos empregaram vários tipos e concentrações de auxinas e citocininas, além de genótipos variados. Assim, essa diversidade de variáveis e suas possíveis e complexas interações dificultam uma análise comparativa.

A adição de AG3 tem levado a resultados contraditórios, pois Rey & Mroginski (1985) observaram um incremento de 50% no número de meristemas que produziram plântulas completas, pela adição de AG3 no meio de cultura MS suplementado com auxina e citocinina (mesma suplementação que o S2), enquanto Dagnino et al. (1991) observaram que a cultivar Mãe-de-Família respondeu à adição do AG3, produzindo plântulas, e a Coração Alado não respondeu, apresentando apenas calosidade. Essa interação cultivar/meio poderia explicar o insucesso com o S2.

No cultivo, foram utilizados ápices caulinares, com dois primórdios foliares, medindo cerca de 0,5 mm. Esse tamanho tem sido utilizado por vários autores (Frison & Ng, 1981; Hu & Wang, citado por Souza, 1990) e recomendado para obtenção de plântulas livres de doenças (Frison & Ng, 1981; Hu & Wang, citado por Souza, 1990). Tamanhos maiores, embora garantam maior possibilidade de sobrevivência, diminuem as chances de erradicação de infecções virais (Elliott, 1969; Alconero et al., 1975; Frison & Ng, 1981; Kuo et al., 1985; Rey & Mroginski, 1985; Gama, 1988; Souza, 1990; Dagnino et al., 1991).

O padrão de desenvolvimento dos ápices caulinares cultivados no S1 (0,01 mg de ANA/l e 1,0 mg de BAP/l) e S3 (0,005 mg de ANA/l, 0,25 mg de BAP/l e 0,25 mg de AG3/l) foi aquele comumente observado em batata-doce, com presença de calo, formação de parte aérea e, posteriormente, raízes (Litz & Conover, 1978; Gama, 1988). Entretanto, o do S2 (0,1 mg de ANA/l, 0,1 mg de KIN/l e 1,0 mg de AG3/l) apresentou características diferentes, formando apenas calos com raízes de polaridade invertida, sem regeneração de plântulas. Essa inversão na polaridade é uma anomalia do desenvolvimento, tendo sido registrada no cultivo de calos embriogênicos de *Brassica oleracea* (Parrek & Chandra, 1978), e pode ter sido conseqüência da suplementação hormonal e sua interação com as cul-

tivares, pois esse mesmo meio de cultura, empregado no cultivo de ápices caulinares de duas outras cultivares, resultou em alta taxa de formação de plântulas (Rey & Mroginski, 1985). É provável ainda que concentrações iguais de auxina e citocinina tenham interferido negativamente na formação de partes aéreas, por serem capazes de estimular a proliferação de calos (Caldas et al., 1990).

As plântulas obtidas com a cultura de ápices caulinares foram micropropagadas através de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg de AG3/l, em que 84,4% dos propágulos formaram plântulas. Esses resultados são superiores aos observados por Souza (1990), que recomendou o emprego do AG3 na concentração de 10 mg/l, e aos de Kuo et al. (1985), que obtiveram melhores resultados com 0,2 mg de AIA/l e 1,0 mg KIN/l. Os demais autores que trabalharam com cultura de ápices caulinares de batata-doce não apresentaram resultados relativos à fase de micropropagação.

Em relação à altura média das plântulas, não foi observada diferença entre as cultivares. No que diz respeito a esse parâmetro, deve-se levar em consideração a anatomia da plântula, pois as cultivares Arroba e RC 1.8 apresentam segmentos nodais pequenos, assumindo o aspecto de touceira, enquanto as demais apresentam segmentos nodais maiores, tendendo a formar ramos longos. Após a aclimação, obtiveram-se plantas adaptadas às condições de cultivo em casa-de-vegetação, embora em proporção inferior às observadas por Rey & Mroginski (1985) e Souza (1990), que obtiveram 90% a 95% e 86% de plantas aclimatadas, respectivamente.

CONCLUSÕES

1. Pela cultura *in vitro* de ápices caulinares das cultivares Arroba, TR 3, 473, RC 1.8 e Mãe-de-Família Tambémé, foi possível a regeneração de plântulas de batata-doce, que poderão ser micropropagadas rotineiramente.

2. A melhor suplementação do meio MS para a cultura de ápices caulinares das cultivares RC 1.8, Mãe-de-Família Tambémé e Arroba foi 0,01 mg de ANA/l e 1,0 mg de BAP/l, enquanto, para RC 1.8, TR 3 e 473, a suplementação mais adequada foi

0,005 mg de ANA/l, 0,25 mg de BAP/l e 0,25 mg de AG3/l.

3. Na fase de micropropagação (utilizando-se o meio MS suplementado com 1,0 mg de AG3/l), as cultivares Vitória Roxa, Paulistinha, Co-Roxa, Mãe-de-Família Tambémé, TR 3, 473, Arroba e RC 1.8 tiveram comportamento similar.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA e particularmente ao Dr. Ronaldo Sena, pela cooperação na execução do trabalho experimental.

REFERÊNCIAS

- ALCONERO, R.; SANTIAGO, A. G.; MORALES, F. Meristem tip cultures and virus indexing of sweet potatoes. *Phytopathology*, St.Paul, v. 65, p. 769-773, July 1975.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, H. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Associação Brasileira de Cultura de Plantas, 1990. p. 37-70.
- DAGNINO, D. S.; CARELLI, M. L. D.; ARRABAL, R. F. Efeito do ácido giberélico sobre a regeneração de *Ipomoea batatas* a partir de cultura de meristema. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 259-262, fev. 1991.
- DEAN, A. G.; DEAN, J. A.; BURTON, A. H. **Epi Info, Version 5: A Word processing, data base, and statistic program for epidemiology on micro-computers**. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control, 1990.
- ELLIOTT, R. F. Growth of exised meristem-tips of Kumara (*Ipomoea batatas* (Linn.) Poir) in anenic culture. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 7, p. 158-166, June 1969.
- FRISON, E. A.; NG, S. Y. Elimination of sweet potato virus disease agents by meristem tip culture. **Tropical Pest Management**, Hampshire, v. 27, n. 4, p. 452-454, 1981.
- GAMA, M. I. C. S. Produção de plantas de batata-doce livres de vírus por termoterapia e cultura de meristema. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 283-286, out. 1988.
- KUO, C. G.; SHEN, B. J.; SHEN, M. J. Virus-free sweet potato storage roots derived from meristem-tips and leaf-cuttings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 231-340, 1985.
- LITZ, R. E.; CONOVER, R. A. *In vitro* propagation of sweet potato. **HortScience**, Alexandria, v. 13, n. 6, p. 659-660, 1978.
- LOVE, S. L. Improved methods for meristem culture of sweet potatoes. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 4, p. 655, Aug. 1985.
- MIRANDA, J. E. C. de; FRANÇA, F. H.; CARRIJO, O. A. **Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)**. 2.ed. rev. ampl. Brasília: EMBRAPA-CNPB, 1989. 19p. (Circular Técnica, 3).
- MURASHIGE, T. E. ; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NIELSEN, L. W. Elimination of the internal cork virus by culturing apical meristems of infected sweet potatoes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 50, n. 9-12, p. 840-841, Nov. 1960.
- PARREK, L. K.; CHANDRA, N. Somatic embryogenesis in leaf callus from cauliflower (*Brassica oleracea* Var. Botrytis). **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 11, p. 311-316, 1978.
- REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Efecto del ácido giberélico en la regeneración de plantas de batata (*Ipomoea batatas*) por cultivo *in vitro* de meristemas. *Oyton*, v. 45, n. 2, p. 123-127, 1985.
- SOUZA, E. D. **Culturas de meristemas e micropropagação para eliminação de vírus de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.(Lam.) cv. Americana**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1990. 61p. Dissertação de Mestrado.
- VAZ, R. L. Cultura de tecidos: potencial e aplicação. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA-DDT, 1986. p. 9-10.
- ZONTA, E. P. ; MACHADO, A. A. **SANEST - Sistema de análise estatística**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas , 1989.