

JANAI PEREIRA DE ALBUQUERQUE



**TAMANHO DE AMOSTRA NA INFERÊNCIA DO  
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E CONTROLADO  
DE PLANTAS JOVENS DE SANGUE DE GRADO**

RIO BRANCO AC

2017

JANAI PEREIRA DE ALBUQUERQUE

**TAMANHO DE AMOSTRA NA INFERÊNCIA DO  
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E CONTROLADO DE  
PLANTAS JOVENS DE SANGUE DE GRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Frederico H. da S. Costa

RIO BRANCO - AC

2017

© ALBUQUERQUE, J. P., 2017.

ALBUQUERQUE, Janai Pereira de. **Tamanho de amostra na inferência do desenvolvimento embrionário e controlado de plantas jovens de Sangue de grado**. Rio Branco, 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal do Acre, 2017.

---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

A345t      Albuquerque, Janai Pereira de, 1985 -  
            Tamanho de amostra na inferência do desenvolvimento  
            embrionário e controlado de plantas jovens de sangue de grado /  
            Janai Pereira de Albuquerque. – 2017.  
            82 f.; il; 30 cm.

            Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre,  
            Curso de Pós-graduação em Agronomia, Área de concentração  
            em Produção Vegetal. Rio Branco, 2017.

            Incluem referências bibliográficas e apêndice.  
            Orientador: Prof. Dr. Frederico H. da S. Costa.

            1. Desenvolvimento embrionário. 2. Controle de plantas. 3.  
            Sangue de grado (*Croton lechleri Müll Arg.*) I. Título.

CDD: 630

---

Bibliotecária: Alanna Santos Figueiredo – CRB 11: 1003.

JANAI PEREIRA DE ALBUQUERQUE

**TAMANHO DE AMOSTRA NA INFERÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO E CONTROLADO DE PLANTAS JOVENS DE  
SANGUE DE GRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

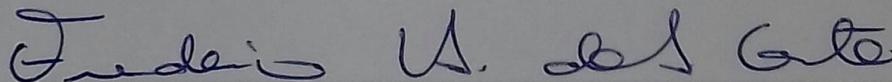
APROVADA em 29 de agosto de 2017.

**BANCA EXAMINADORA**



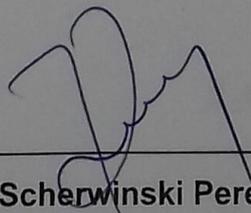
---

**Dr. Frederico Henrique da Silva Costa (Orientador)**  
Universidade Federal do Acre



---

**Dr. João Paulo Ribeiro Oliveira (Membro)**  
Universidade Federal de Uberlândia – Participação por videoconferência



---

**Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira (Membro)**  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

*Aos meus pais, João e Ruth M<sup>a</sup>  
Albuquerque e ao meu irmão Jonatas  
Albuquerque por todo o amor, apoio,  
incentivo e dedicação.*

*Dedico*

*À Ana Sophia, minha amada filha,  
com todo o amor que há em mim.*

*Ofereço*

*“Todos querem viver no topo da  
montanha, mas toda felicidade e  
crescimento ocorrem quando você  
está escalando-a”.*

*William Shakespeare*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao “meu Deus”, que nas suas diversas maneiras, iluminou cada passo dado para essa conquista.

Aos meus pais, João e Ruth, minha eterna gratidão pelo total apoio, compreensão, auxílio e amor, com eles ao meu lado as dificuldades foram vencidas.

Agradeço ao Professor e Orientador Frederico Henrique da Silva Costa por acreditar, incentivar e me conduzir no caminho da pesquisa.

Ao Dr. João Paulo Ribeiro-Oliveira a quem tive a sorte de conhecer e receber ajudas e incentivos tão importantes para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, coordenador do projeto de pesquisa (CNPq Processo nº 405396/2013-9), que fomentou o presente estudo.

Ao meu irmão Jonatas Albuquerque pela amizade, reciprocidade e companheirismo. Sou grata por ter você em minha vida. Meu melhor!

Aos colegas de laboratório: Camilla Pedroza, Clarice Sales, João Bussons, João Marques e Márcio Chaves pelo auxílio. Muito especialmente aos queridos João Bosco, Nadja Rayad e Roger Ventura pelas diversas ajudas.

Às minhas tias Emília, Laura, Luzia e Raab pelo zelo com que cuidaram de mim e de minha filha em diversos momentos.

Aos amigos que compartilharam parte desse caminho comigo e com certeza permanecerão em minha vida: Angelita Butzk, David Aquino, Érica, Giordano Bruno, James Silva, Jessica, João Ricardo, Paulo Braña, Suziane e Ueliton. Em especial à amiga Lúcia Hall, pelo carinho, zelo e cuidados.

À amiga especial Yasmin Carolina, pelo companheirismo e aos amigos Amanda Carvalho, Carlos Alberto, Edilza e Edines Araújo, Fredy Pinheiro, Mayra Sollner, Rogério Correia, Valdemiro Júnior, pelas ajudas e compreensões.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pelo excelente ensino.

A CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado.

**Meu muito obrigada!**

## RESUMO

O Sangue de grado (*Croton lechleri* Müll Arg.), pertence à família Euphorbiaceae. Conhecido por sua atividade medicinal, é usado para diversas enfermidades e explorado de forma predatória, tornando imprescindível o estabelecimento de protocolos de cultivo e crescimento controlado *in vitro* da espécie. Mas, para que seja estabelecido protocolos é necessário, antes, criar-se um norte para o tamanho de amostra. Dessa forma, este trabalho trouxe questionamentos que foram respondidos em cada um dos capítulos. No primeiro capítulo argumentou-se como a variação do tamanho amostral pode influenciar no desenvolvimento embrionário de Sangue de grado *in vitro*? E no segundo, se seria possível estabelecer uma metodologia de crescimento controlado *in vitro* da espécie utilizando-se temperatura de cultivo e concentrações de agentes osmóticos? Para a primeira pergunta concluiu-se que o desenvolvimento de embriões de Sangue de grado acontece independentemente do tamanho da amostra, e da matriz. O desenvolvimento embrionário da espécie em meio de cultura QL, apesar de alcançar excelente porcentagem, acontece de forma desuniforme. Além disso, como esperado, constatou-se que amostras pequenas podem ser um risco estatístico por inflacionar os problemas de parcela perdida. Por meio do segundo questionamento foi possível concluir que o meio de cultura WPM, adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sorbitol a 25 °C, é o mais interessante para o crescimento controlado *in vitro* de Sangue de grado. Além da sacarose e do sorbitol na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> a 15 °C também serem viáveis para o crescimento controlado *in vitro* da espécie.

**Palavras-chave:** *Croton lechleri*; cultivo *in vitro*; tamanhos da amostra; agentes osmóticos; crescimento controlado *in vitro*.

## ABSTRACT

Dragon's blood (*Croton lechleri* Müll Arg.), belongs to the family Euphorbiaceae. Known for its medicinal activity, it is used for various diseases and exploited in a predatory manner, making it imperative to establish protocols for cultivation and controlled growth of the species *in vitro*. But for its protocols it is necessary first to shed some light for the sample size. In this way, this work arised some questions that were answered in each of the chapters. In the first chapter we argued how the variation of sample size can influence the embryonic development of dragon's blood *in vitro*? And in the second, if it would be possible to establish an *in vitro* controlled growth methodology of the species using different temperatures and osmotic agent concentrations? For the first question it was concluded that dragon's blood embryos developed regardless of sample size and array. The embryonic development of the species in QL culture medium, despite achieving high percentage, occurs uniformly. Furthermore, as expected, it was found that small samples can be a statistical risk for induce the problem with lost parcels. The second answer allow to conclude that WPM culture medium, with 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol at 25 °C, is the best for the *in vitro* growth of dragon's blood. Besides sucrose and sorbitol at the concentration of 15 g L<sup>-1</sup> at 15 °C also be viable for *in vitro* controlled growth of the species.

**Keywords:** *Croton lechleri*; *in vitro* culture; sample size; osmotic agents; controlled growth.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1 – Localização das matrizes de Sangue de grado utilizadas na pesquisa..... 35
- Figura 2 – Embrião de Sangue de grado (A) antes do estabelecimento; (B) embrião desenvolvido *in vitro* após 48h; (C) embrião não desenvolvido após 192h de avaliação estabelecidos em meio de cultura QL..... 37
- Figura 3 – Frequência relativa do desenvolvimento embrionário – FRDE *in vitro* de Sangue de grado de duas Matrizes (P) estudados por meio de quatro tamanhos de amostra (T.A.): I: incerteza; Z: sincronia..... 46

### CAPÍTULO II

- Figura 1 – Crescimento controlado de Sangue de grado (A) planta jovem (B) explante estabelecido a partir da planta jovem..... 56
- Figura 2 – Sobrevivência de plantas de Sangue de plantas submetidas ao crescimento controlado *in vitro* em duas temperaturas e concentrações de sacarose e sorbitol..... 60
- Figura 3 – Sangue de grado aos 60 dias de crescimento controlado *in vitro* em sacarose e sorbitol (Tratamentos sobrevivientes). ..... 64
- Figura 4 – Sangue de grado aos 90 dias de crescimento controlado *in vitro* em sacarose e sorbitol (Tratamentos sobrevivientes). ..... 66
- Figura 5 – Sobrevivência de plantas de Sangue de grado submetidas enraizamento *in vitro* após processo de crescimento controlado..... 67
- Figura 6 – Comprimento da parte aérea (CPA) de plantas de Sangue de grado (R.C.) retomada do crescimento; (C.C.) crescimento controlado..... 69
- Figura 7 – Enraizamento *in vitro* de Sangue de grado (A) planta enraizada; (B) planta com menor comprimento da parte aérea e (C) planta com maior comprimento. .... 70

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1 – Coordenadas geográficas das matrizes de Sangue de grado usadas em experimento de desenvolvimento embrionário. UTM: Universal Transverse Mercator. .... 35
- Tabela 2 – Esquema do ensaio fatorial do desenvolvimento embrionário *in vitro* de Sangue de grado sob duas matrizes (P) e quatro tamanhos de amostra (T.A.). .... 37
- Tabela 3 – Habilidade de desenvolvimento embrionário e tempo médio de desenvolvimento embrionário de Sangue de grado *in vitro* de duas matrizes (1 e 2) analisados a partir de diferentes tamanhos de amostra (T.A.). .... 42
- Tabela 4 – Uniformidade e velocidade média de desenvolvimento embrionário de Sangue de grado *in vitro* de duas matrizes (1 e 2) analisados a partir de diferentes tamanhos de amostra (T.A.). .... 43
- Tabela 5 – Incerteza e sincronia de desenvolvimento embrionário de Sangue de grado *in vitro* de duas matrizes (1 e 2) analisados a partir de diferentes tamanhos de amostra (T.A.). .... 44

### CAPÍTULO II

- Tabela 1 – Esquema do ensaio fatorial de temperaturas de cultivo (T.C.) e concentrações de Agentes Osmóticos (A.O.) no crescimento controlado *in vitro* de Sangue de grado. .... 58
- Tabela 2 – Médias do número de brotações (NB) avaliadas aos 30 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro* sob dois agentes osmóticos. .... 62
- Tabela 3 – Médias do número de folhas expandidas (NFE) avaliadas aos 30 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro* sob dois agentes osmóticos e duas temperaturas. 62

- Tabela 4 – Médias do comprimento da parte aérea (CPA) avaliadas aos 30 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro* sob dois agentes osmóticos e duas temperaturas. 63
- Tabela 5 – Número de brotações (NB); Número de folhas expandidas (NFE) e Comprimento da parte aérea (CPA) avaliadas aos 60 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro*. 64
- Tabela 6 – Número de folhas expandidas (NFE) e Comprimento da parte aérea (CPA) avaliadas aos 90 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro*. ..... 66
- Tabela 7 – Número de folhas expandidas (NFE) e Comprimento da parte aérea (CPA) avaliados após o processo de enraizamento pós crescimento controlado *in vitro* de plantas de Sangue de grado utilizando sacarose e sorbitol. .... 69

## LISTA DE APÊNDICES

|            |  |    |
|------------|--|----|
| APÊNDICE A | Valores das estatísticas e probabilidades de testes usados para analisar a robustez das medidas de desenvolvimento embrionário de Sangue de grado <i>in vitro</i> de duas matrizes (P) analisados a partir de diferentes tamanhos de amostra (T.A.). .....   | 78 |
| APÊNDICE B | Resumo da análise de variância de embriões desenvolvidos (ED%), tempo médio de desenvolvimento do embrião ( $\bar{t}$ (horas)) e coeficiente de variação do tempo de desenvolvimento do embrião (CV $\bar{t}$ ) avaliados após 12 horas do estabelecimento <i>in vitro</i> , de Sangue de grado submetidos a avaliação do desenvolvimento em função de duas matrizes (1 e 2) e quatro tamanhos de amostra (5, 25, 50 e 100), em esquema fatorial 2x4 no delineamento em blocos casualizados. ....                | 79 |
| APÊNDICE C | Resumo da análise de variância da velocidade média de desenvolvimento embrionário ( $\bar{v}$ (horas <sup>-1</sup> )), incerteza do desenvolvimento do embrião ( $I$ ) e sincronia do desenvolvimento do embrião ( $Z$ ) avaliadas após 12 horas do estabelecimento <i>in vitro</i> , de Sangue de grado submetidos a avaliação do desenvolvimento em função de duas matrizes (1 e 2) e quatro tamanhos de amostra (5, 25, 50 e 100), em esquema fatorial 2x4 no delineamento em blocos casualizados.....        | 80 |
| APÊNDICE D | Valores das pressuposições de testes usados para analisar o número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) no crescimento controlado <i>in vitro</i> utilizando sacarose e sorbitol de plantas de Sangue de grado. ....  | 80 |
| APÊNDICE E | Resumo da análise de variância do número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) avaliadas aos 30 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado em função de duas temperaturas (15 °C e 25 °C) dois agentes osmóticos (Sacarose e sorbitol) e quatro concentrações (15 gL <sup>-1</sup> ; 30 gL <sup>-1</sup> ; 45 gL <sup>-1</sup> e 60 gL <sup>-1</sup> ;) em esquema fatorial 2x2x4 no delineamento inteiramente casualizado. .... | 81 |
| APÊNDICE F | Resumo da análise de variância do número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) avaliadas aos 60 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado <i>in vitro</i> em delineamento inteiramente casualizado. ....  | 81 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| APÊNDICE G | Resumo da análise de variância do número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) avaliadas aos 90 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado <i>in vitro</i> em delineamento inteiramente casualizado. ....                | 82 |
| APÊNDICE H | Valores das pressuposições de testes usados para analisar o número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) após o processo de enraizamento pós crescimento controlado <i>in vitro</i> de plantas de Sangue de grado utilizando sacarose e sorbitol. .... | 82 |
| APÊNDICE I | Resumo da análise de variância do número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e altura da parte aérea (APA) avaliadas após processo de enraizamento <i>in vitro</i> de plantas de Sangue de grado em delineamento inteiramente casualizado. ....                  | 82 |

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AIB – Ácido Indol-butírico

CDB – Convenção sobre Diversidade Biológica

$CV_t$  – Coeficiente de variação do tempo

ED – Embriões desenvolvidos

$f_i$  – Frequência relativa

g – Grama (unidade de medida de massa)

$g L^{-1}$  – Gramas por litro

h – Hora (unidade de tempo)

$I$  – Incerteza

L – Litro (unidade de medida de volume)

LPCP – Laboratório de Propagação e Conservação *in vitro* de Plantas

mL – Mililitro (unidade de medida de volume)

pH – Potencial hidrogeniônico

QL – Meio de cultivo *in vitro* (QUOIRIN & LEPROIVRE)

$\bar{t}$  – Tempo médio

$\bar{v}$  – Velocidade média de desenvolvimento

WPM – Meio de cultivo *in vitro* (Woody Plant Medium)

Z – Sincronia

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 17 |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 19 |
| <b>2.1 A espécie <i>Croton lechleri</i> Müll Arg.</b> .....   | 19 |
| <b>2.2 Cultura de tecidos em plantas medicinais</b> .....   | 20 |
| <b>2.3 Desenvolvimento de embriões <i>in vitro</i></b> .....  | 21 |
| <b>2.4 Crescimento controlado de plantas <i>in vitro</i></b> .....  | 22 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 24 |
| <b>CAPÍTULO I COMO O TAMANHO DA AMOSTRA PODE INFLUENCIAR AS<br/>INFERÊNCIAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO <i>in vitro</i>? UM<br/>ESTUDO DE CASO A PARTE DE SANGUE DE GRADO</b> ..... | 30 |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 33 |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 35 |
| <b>2.1 Coleta e processamento dos frutos</b> .....  | 35 |
| <b>2.2 Desinfestação de sementes</b> .....  | 36 |
| <b>2.3 Estabelecimento de embriões</b> .....  | 36 |
| <b>2.4 Características avaliadas</b> .....  | 38 |
| 2.4.1 <i>Embriões desenvolvidos (%)</i> .....   | 38 |
| 2.4.2 <i>Tempo médio de desenvolvimento do embrião</i> .....  | 38 |
| 2.4.3 <i>Coeficiente de variação do tempo de desenvolvimento do embrião</i> .....   | 38 |
| 2.4.4 <i>Velocidade média de desenvolvimento do embrião</i> .....   | 39 |
| 2.4.5 <i>Incerteza de desenvolvimento do embrião</i> .....  | 39 |
| 2.4.6 <i>Sincronia de desenvolvimento do embrião</i> .....  | 39 |
| 2.4.7 <i>Frequência relativa de desenvolvimento do embrião</i> .....  | 40 |
| <b>2.5 Delineamento experimental e análise estatística</b> .....  | 40 |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 41 |
| <b>4 CONCLUSÕES</b> .....   | 47 |

|  |    |
|--|----|
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 48 |
| <b>CAPÍTULO II CRESCIMENTO CONTROLADO <i>in vitro</i> DE SANGUE DE GRADO</b> .   | 51 |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 54 |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 56 |
| <b>2.1 Diferentes concentrações de sacarose e sorbitol sob duas temperaturas de cultivo no crescimento controlado <i>in vitro</i> de microestacas de Sangue de grado</b> | 56 |
| <b>2.2 Enraizamento</b> .....  | 57 |
| <b>2.3 Aclimatização</b> .....   | 57 |
| <b>2.4 Análise estatística das características</b> .....   | 58 |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 60 |
| <b>3.1 Avaliação aos trinta dias de crescimento controlado</b> .....   | 61 |
| <b>3.2 Avaliação aos sessenta dias de crescimento controlado</b> .....   | 63 |
| <b>3.3 Avaliação aos noventa dias de crescimento controlado</b> .....  | 65 |
| <b>3.4 Enraizamento</b> .....  | 67 |
| <b>3.5 Aclimatização</b> .....   | 70 |
| <b>4 CONCLUSÕES</b> .....  | 71 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 72 |
| <b>APÊNDICE</b> .....  | 77 |

## 1 INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica abriga grande diversidade de espécies medicinais, utilizadas em muitos casos como único recurso terapêutico por povos nativos. Essa prática desperta o interesse de pesquisadores de diversos países. No entanto, só ganhou destaque e confiabilidade com a elaboração da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo Decreto Presidencial nº 5.813, em 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006). O Acre, localizado no extremo Sudoeste da região Norte, com 100% do seu bioma na Amazônia, possui o maior acervo de plantas da região, com aproximadamente 93% do seu território coberto por florestas (ZEVALLOS-POLLITO; TOMAZELLO FILHO, 2007).

Dentre as diversas famílias do reino Plantae, encontra-se a Euphorbiaceae, que possui aproximadamente 307 gêneros e 6.900 espécies (Oliveira et al., 2007). No Brasil, ocorrem cerca de 72 gêneros e 1.100 espécies (BARROSO et al., 1999). Das Angiospermas, é uma das maiores e mais complexas famílias (SECCO, et al., 2012; SOUZA; LORENZI, 2008), pois, se divide em cinco subfamílias, com exemplares que vão desde herbáceas a árvores (OLIVEIRA; PAOLI, 2016). O gênero *Croton* L., estabelecido por Webster (1993), encontra-se em segundo lugar em tamanho e diversidade dentro dessa família (LIMA; PIRANI, 2008), pertence a subfamília Crotonoideae, com grande parte de suas espécies medicinais (ÖKSÜZ, 1993), com exemplares distribuídos ao longo do continente americano, devido a seiva rica em metabólitos (FARÍAS, et al., 2009). É o gênero mais estudado por pesquisadores de todo o mundo motivados por sua evolução (SECCO et al., 2012), principalmente por se tratar de uma espécie que ainda está em processos de estudos e descobrimentos. No Acre, foram encontradas em torno de cinco espécies pertencentes a esse gênero (ZEVALLOS-POLLITO; TOMAZELLO FILHO, 2007).

O *Croton lechleri* Müll Arg., popularmente conhecido como Sangue de grado é uma planta nativa da Região Amazônica de amplo uso por indígenas e ribeirinhos em razão de suas propriedades curativas. Recebe esse nome devido à cor avermelhada da sua seiva (GRIMARÃES; SECO, 2010), que possui propriedades medicinais justificadas pela presença de diversos compostos fenólicos, principalmente a taspina, conhecida pela capacidade antiinflamatória, antibiótica e cicatrizante (DESMARCHELIER, et al., 1997; GUPTA et al., 2008). É uma planta monóica (CAMPOS, 2009), pode chegar a medir até 20 metros de altura (SMITH, 2006) e

aproximadamente 30 cm de diâmetro, apresentando folhas codiformes, flores esverdeadas e frutos triloculares.

Apesar de sua importância histórica e medicinal, quase não há registros sobre métodos de propagação desta espécie. Fato preocupante, uma vez que o extrativismo predatório de plantas medicinais torna as espécies vulneráveis podendo levá-las ao total desaparecimento (OLIVEIRA, et al., 2016). Mais de 50% das espécies vegetais medicinais são coletadas a partir de populações naturais, o que pode comprometer a viabilidade dos ecossistemas envolvidos (CAMILLO et al., 2009; VEIGA JUNIOR; MELLO, 2008). Há ainda o desmatamento voltado para o cultivo agrícola que destrói grande parte da floresta anualmente, diminuindo espécies de relevante interesse ecológico (SARMENTO; VILLELA, 2010), e de grande importância para a manutenção da vida nesses ecossistemas (CONSERVA, 2007).

A cultura de tecidos vem de encontro a essas problemáticas, pois, as várias técnicas desenvolvidas, garantem a produção em larga escala, com qualidade genética e fitossanitária assegurada e material padronizando. Algumas espécies nativas e lenhosas enfrentam problemas relacionados ao estabelecimento *in vitro*, principalmente de oxidação e contaminação (SATO et al., 2001). A oxidação se dá geralmente pela presença de compostos fenólicos (COSTA et al., 2007). Para diminuir a contaminação, o cultivo de embriões *in vitro* tem se demonstrado bastante eficaz, uma vez que se trata de estrutura formada por tecidos juvenis, capazes de formar plantas saudáveis (SOARES et al., 2011). No entanto, quando se trata de cultura de tecidos, o tamanho da amostra na viabilização das inferências fisiológicas do desenvolvimento dos explantes é um aspecto geralmente ignorado. E, determinar o tamanho amostral, contribui para a obtenção de resultados com maior confiabilidade e melhor qualidade (MORAIS et al., 2014).

Além disso, o crescimento controlado de plantas jovens *in vitro* como estratégia de criação de banco de germoplasma vem sendo desenvolvidas na intenção de consolidar culturas e preservar a viabilidade genética dessas espécies para usos futuros (MORAIS et al., 2014). Este trabalho objetivou definir a dinâmica do processo de desenvolvimento embrionário de Sangue de grado de modo robusto e definir uma metodologia de crescimento controlado *in vitro* da espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A espécie *Croton lechleri* Müll Arg.

Conhecido por suas atividades medicinais, o *Croton lechleri* de nome popular Sangue de grado, é uma espécie lenhosa encontrada na Região Amazônica, principalmente no Equador, Colômbia, Bolívia, Peru e Brasil. É incidente em áreas que sofrem inundações temporárias, às margens de igarapés, rios ou cachoeiras; em florestas secundárias ou em bordas de áreas desmatadas e trilhas de florestas primárias, pois, possui boa adaptação a solos férteis e úmidos (LOPES, et al., 2013; ZEVALLOS-POLLITO; TOMAZELLO FILHO, 2007). Apresenta crescimento rápido, podendo ser usada em sistemas agroflorestais (BRITO et al., 2007).

A seiva do Sangue de grado possui princípio ativo de atividades biológicas de ampla importância para a medicina humana e veterinária, tendo como principal composto fenólico, a taspina, o alcaloide de maior interesse comprovada por meio de ensaios clínicos (LOPES et al., 2013), além de antioxidantes como proantocianadina, phenolas, diterpenas e taninas (BRAGA, 2010). É usado para tratar úlceras, gastrites, diarreias, no aumento da imunidade de pacientes portadores do vírus da AIDS (AZEVEDO et al., 2008) e como antitumoral (ALONSO-CASTRO et al., 2012; GUPTA et al., 2008).

A planta possui folhas codiformes, flores em racimos compridos (CARUZO; CORDEIRO, 2007). Os frutos possuem forma de cápsulas, com três lóculos com 1 semente em cada, de formas semelhantes entre si, e medem aproximadamente 5,37 mm de comprimento, 5,82 mm de largura e 5,80 mm de espessura (MENDONÇA et al., 2014).

Tem comportamento fenológico cíclico com floração e disseminação em períodos secos e chuvosos, respectivamente (AZEVEDO et al., 2008). Trata-se de uma espécie silvestre de propagação por meio de sementes, dispersas através do vento, da água e de pequenos animais, principalmente das formigas que são atraídas por uma substância açucarada presente na base da folha (LOPES et al., 2013).

Estudos comprovam que em várias espécies medicinais, o ambiente, e a morfologia da planta, por exemplo, podem influenciar na presença e/ou concentração de substâncias. Em pesquisa realizada por Zevallos-Pollito e Tomazello Filho (2007), foi averiguado variação morfológica entre plantas de Sangue de grado quando

constatado algumas diferenças relacionadas a idade, distribuição geográfica e adaptação. Em experimentos com o extrato da seiva da casca do *C. lechleri*, foi constatado que esta apresenta potencial mutagênico, mas, pode ser usada como remédio natural, a partir de que se esteja atento a riscos genotóxicos (FÃO et al., 2012).

## **2.2 Cultura de tecidos em plantas medicinais**

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2010), plantas medicinais são as que possuem princípio ativo de ação terapêutica, capazes de tratar doenças e, em alguns casos, levar à cura total. São usadas tradicionalmente por comunidades e populações que transferem a prática entre gerações e, embora sejam utilizadas desde os primórdios, existem poucos estudos relacionados e esse grupo (OLIVEIRA, 2011). Perdem a denominação de plantas medicinais e passam a ser fitoterápicos se forem industrializadas. Segundo Veiga Junior e Mello (2008) a industrialização das plantas medicinais levou os órgãos governamentais a formularem diretrizes relacionadas à produção e comercialização de fitoterápicos. Esses já formam um grupo significativo no Brasil, com aproximadamente 520 tipos, com composições simples e compostas e de variadas formas farmacêuticas (CARVALHO et al., 2008). A mais recente revisão encontrada acerca do assunto demonstra que no mundo, anualmente, esse mercado rende aproximadamente 22 bilhões de dólares/ano (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Após longo período de lutas pela legalização do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais, foram criadas a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo Decreto Presidencial nº 5.813, em 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006). Isso foi feito objetivando garantir à população segurança, racionalidade e sustentabilidade no acesso da biodiversidade, cadeia produtiva e indústria nacional.

No entanto, o crescente uso de plantas medicinais em todas as partes do planeta tem direcionado algumas espécies ao risco de extinção, pois, aproximadamente 30% das drogas avaliadas como fitoterápicos são advindas de produtos naturais (VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008). A maioria dessas espécies são nativas e sofrem o extrativismo predatório, motivado pelo aumento das buscas, provocando o colapso da economia extrativa pela dificuldade de atender a demanda (HOMMA, 2012).

Outros fatores também podem dificultar o uso de plantas medicinais para fins farmacêuticos, como a heterogeneidade dos indivíduos, devido a variação na herança genética e bioquímica (VIEIRA, 2009). O que tem levado, mesmo de forma tímida, pesquisadores a buscar meios de minimizar ou eliminar estes entraves. A cultura de tecidos é uma ferramenta importante e eficaz neste sentido, pois, garante a multiplicação sistematizada, selecionada e segura por meio da micropropagação (MORAIS et al., 2012). É uma das técnicas de grande contribuição no avanço da biotecnologia e pode ser realizada por organogênese ou embriogênese (SOARES et al., 2007).

Na cultura de tecidos, muitos cuidados devem ser adotados. A escolha adequada do meio de cultura e a concentração de nutrientes têm importância direta no resultado final e deve ser aplicada de acordo com a espécie em estudo (PINHAL et al., 2011; RAMAGE; WILLIAMS, 2002;). Segundo Morais et al. (2012), muitos protocolos de micropropagação têm sido estudados para várias espécies medicinais, principalmente para as que apresentam dificuldades de disseminação seminal. Portanto, há ainda muito a descobrir no que se refere à cultura de tecidos e plantas medicinais.

### **2.3 Desenvolvimento de embriões *in vitro***

Quando atinge a maturidade, o embrião de dicotiledôneas apresenta estruturas bem definidas, principalmente o eixo embrionário e os cotilédones, estando assim pronto para emergir e se transformar em planta jovem (CANHOTO, 2010). No entanto, Bewley et al. (2013) afirma que, em muitas espécies, nem todos os embriões estão maduros quando a semente é liberada da planta matriz.

O cultivo *in vitro* de embriões vem sendo empregado como explante de alta capacidade de totipotência e baixo índice de contaminação (MINARDI et al., 2011). De acordo com Jesus et al. (2003), embriões são excelentes para estabelecimentos *in vitro*, por possuírem tecidos jovens e de grande potencial regenerativo. O estabelecimento de plântulas oriundas de embriões zigóticos pode ser eficaz tanto na produção de plantas de alto vigor quanto de qualidade fitossanitária (HORBACH et al., 2011).

Não menos importante que o desenvolvimento de embriões *in vitro* é, conhecer outras características desse processo que podem aprofundar o conhecimento a respeito

do grau de sucesso de determinada espécie. Desenvolvido para a ciência de sementes, mas que pode ser utilizado para toda e qualquer característica binária (SANTANA; RANAL, 2004), por meio de expressões algébricas é possível avaliar o tempo, velocidade, homogeneidade e sincronia (RANAL; SANTANA, 2006), além de incerteza e frequência relativa do desenvolvimento (LABOURIAU; VALADARES, 1976).

O tamanho adequado da amostra experimental é também um fator de grande importância para o desenvolvimento embrionário *in vitro*, pois contribui para a obtenção de resultados com maior confiabilidade e melhor qualidade (MORAIS et al., 2014). Ribeiro-Oliveira et al. (2013), questionam se o tamanho amostral interfere de alguma maneira na medida de germinação. O questionamento é válido também para o desenvolvimento embrionário *in vitro*, uma vez que não foi encontrado na literatura trabalhos dessa natureza, sobretudo voltados para o cultivo de embriões. É possível encontrar uma diversidade de trabalhos que enfatizem essa problemática para a germinação de sementes de espécies domesticadas, no entanto, apesar da grande importância social, econômica e históricas, pouco se sabe sobre a germinação ou emergência de plântulas de espécies vegetais (BRÜNING, 2011). Principalmente pelo fato de muitas serem pouco conhecidas ou apresentarem dificuldades de germinação e desenvolvimento.

#### **2.4 Crescimento controlado de plantas *in vitro***

Os recursos genéticos vegetais possuem grande potencial de uso, principalmente na agricultura e plantas medicinais. Partes desses recursos são destruídos por meio de pragas, condições adversas do ambiente e humana mesmo antes da realização de estudos científicos (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010).

As plantas medicinais sofrem grande impacto relacionado à conservação, tendo em vista que a maioria são nativas e de exploração extrativista. Essa problemática traz a necessidade de realização de práticas de conservação do germoplasma destas espécies para plantios homogêneos visando a recuperação de áreas degradadas (OLIVEIRA et al., 2013). A micropropagação e conservação são aplicadas principalmente em espécies de difícil multiplicação por métodos tradicionais (PELEGRINI et al., 2011); às medicinais (FUMAGALI et al., 2008) e ameaçadas de extinção, para conservação do germoplasma *in vitro* (SOUZA; PEREIRA, 2007).

As diversas técnicas da cultura de tecidos vegetais têm demonstrado eficácia para a multiplicação e conservação *ex situ* de espécies ameaçadas, seja a curto ou médio prazo (FONSECA et al., 2015). Para Sá et al. (2010), a técnica que reduz o metabolismo da planta por modificações físicas e químicas, também chamada de crescimento lento, é uma boa maneira de conservar o material genético. Dessa forma, aumentam-se os intervalos entre os subcultivos e reduz os investimentos à cultura (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010). No entanto, para que seja eficaz e possa ser indicado como protocolo de conservação, os tratamentos devem garantir a máxima sobrevivência da espécie testada e invariabilidade genética (CAMILLO; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2015).

De acordo com Brito et al. (2011), a combinação de sacarose e poliálcoois como o manitol e sorbitol, associados ou não a baixas temperaturas são alternativas eficientes na conservação de germoplasma *in vitro*. Estes atuam no controle de água livre intracelular fazendo com que o crescimento da planta ocorra de forma mais lenta (SHIBLI et al., 2006). Conhecidos também como polióis e reguladores osmóticos, os poliálcoois, além de serem usados na conservação ou crescimento mínimo, são adicionados aos meios de cultura para diversos outros fins da cultura de tecidos vegetais (STEINITZ, 1999). A sacarose é mais comumente utilizada por pesquisadores na cultura de tecidos, isso, por provavelmente ser o açúcar mais encontrado no floema de muitas plantas (FUENTES et al., 2000).

## REFERÊNCIAS

ALONSO-CASTRO, A. J.; ORTIZ-SÁNCHEZ, E.; DOMÍNGUEZ, F.; LÓPEZ-TOLEDO, G.; CHÁVEZ, M.; ORTIZ-TELLO, A. de J.; GARCÍA-CARRANCA, A. Antitumor effect of *Croton lechleri* Müll Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 140, n. 2, p. 438-442, Mar. 2012

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 10, de 9 de Março de 2010.

AZEVEDO, K.; ALECHANDRE, A.; LIMA, A.; LEITE, A.; MELO, T.; COSTA, J.; PEREIRA, M. A.; CAMPOS, C. A.; LIMA, A. de. **Guia para a extração de sangue de grado (*Croton lechleri* Müll. Arg.)**: recomendações técnicas para a extração de látex de sangue de grado (sangue de dragão). Rio Branco-Ac: USAID/IPAM, 2008. 28p.

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de docotiledôneas**. 2000. 443 f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H. (Ed.). Germination. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. Ed. Springer Science & Business Media, 2013. p. 133-153.

BRAGA, R. C.; **Sangue de dragão: *Croton lechleri***. Crônicas do Ouro verde. 2010. Disponível em: <<http://pro.casa.abril.com.br/group/cronicasdoouroverde/forum/topic/sangue-de-dragao-croton-1>>. Acesso em: 21 dez. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**, Brasília, v.2, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRITO, N. D. S. de; LIMA, A. F.; COSTA, J. L. da; TAVEIRA, U. S.; AZEVEDO, K. S. Inventário e estudo da estrutura populacional de Sangue de grado (*cróton lechleri* muell. Arg.) Para o manejo florestal comunitário no leste do estado do Acre, Brasil. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007. p. 1-3.

BRÜNING, F. O. et al. Padrões para germinação, pureza, umidade e peso de mil sementes em análises de sementes de espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 193-202, 2011.

CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* maintenance, under slow-growth conditions, of oil palm germplasm obtained by embryo rescue. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 5, p. 426-429, maio 2015.

- CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 12, n. 2, p. 184-189, abr./jun. 2009.
- CAMPOS, M. S. **Avaliação da biocompatibilidade da seiva do *Croton lechleri* (Sangue de dragão) em tecido subcutâneo de ratos**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado de Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.
- CANHOTO, J. M. Embriogênese Somática. In: \_\_\_\_\_ (Ed.) **Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press, p. 109-148, 2010.
- CARUZO, M. B. R.; CORDEIRO, I. Sinopse da tribo *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae.s.) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 571-585, out./dez. 2007.
- CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 314-319, abr./jun. 2008.
- CONSERVA, A. dos S. **Germinação de sementes, emergência e recrutamento de plântulas de dez espécies arbóreas das várzeas das reservas de desenvolvimento sustentável Amanã e Mamirauá, Amazônia Central**. 2007. 147 f. Tese (Doutorado em Biologia tropical e Recursos Naturais) – Setor de Ecologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.
- COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; MENDONÇA, A.B.; AMANCIO, V.F.; LEDO, A.S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 68-72, jan./mar. 2007.
- DESMARCHELIER, C.; WITTING SCHAUS, F.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Effects of Sangue de Drago from *Croton lechleri* Muell – Arg. on the production of active oxygen radicals. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 58, n. 2, p. 103-108, 1997.
- FÃO, F.; ZAN, R. A.; BRONDANI, F. M. M.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. de O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 7, n. 1, p. 91-98, jan./abr. 2012.
- FARÍAS, F. R.; WILLIAMSON, J. S.; RODRÍGUEZ, S. V.; ANGELES, G.; PORTUGAL, V. O. Bark anatomy in *Croton draco* var. *draco* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 96, n. 12, p. 2155-2167, Dec 2009.
- FONSECA, P. T.; NEPOMUCENO, C. F.; SILVA, T. dos S.; SANTANA, J. R. F. de. Conservação *in vitro* de *Erythrina velutina* a partir de embriões zigóticos. **Revista Sitientibus - Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 15, n. 12 p. 1-8 out./dez. 2015.

FUENTES, S. R. L.; CALHEIROS, M. B.; MANETTI-FILHO, J.; VIEIRA, L. G. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 60, n. 1, p. 5-13, Jan 2000.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641, out./dez. 2008.

GUIMARÃES, L. A. C.; SECCO, R. S. de; As espécies de *Croton* L. sect. *Cyclostigma* Griseb. e *Croton* L. sect. *Luntia* (Raf.) G. L. Webster subsect. *Matourenses* G. L. Webster (Euphorbiaceae s.s.) ocorrentes na Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, Belém, v. 40, n. 3, p. 471-488, jul./set. 2010.

GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R. K. Dragon's blood botany chemistry and therapeutic uses. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 115, n. 3, p. 361-380, Feb. 2008.

HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia? **Estudos avançados**, v. 26, n. 74, p. 167-186, 2012.

HORBACH, M. A.; BISOGNINI, D. A.; KIELSE, P.; QUADROS, K. M. de; FICK, T. A. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 113-119, jan. 2011.

JESUS, A. M. S.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, v. 50, n. 288, p. 183-189, 2015.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 263-284, 1976.

LIMA, L. R. de; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotrópica**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 177-231, abr./jun. 2008.

LOPES, T. V.; FÉLIX, S. R.; SCHONS, S. de V.; NOBRE, M de O. Dragon's blood (*Croton lechleri* Mull., Arg.): an update on the chemical composition and medical applications of this natural plant extract. A review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 07, n. 2, p. 167-191, jul./dez. 2013.

MENDONÇA, M. de N. S. de; ALMEIDA, M. de C.; FIRMINO, J. L.; RAMOS, L. de B.; SANTOS, A. M. dos. Biometria dos frutos e sementes de Sangue de grado *croton lechleri* muell. Arg Euphorbiaceae. – Acre. In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 66., 2014, Rio Branco. **Resumos...** Rio Branco: SBPC, 2014.

MINARDI, B. D.; VOYTENA, A. P. L.; RANDI, A. M.; ZAFFARI, G. R. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. **INSULA Revista de Botânica**, Florianópolis, n. 40, p. 70-81, out. 2011.

- MORAIS, A. R. de; ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M.; PEIXOTO, A. P. B. Estimação do tamanho de parcela para experimento com cultura de tecidos em videira. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 113-124, jan./fev. 2014.
- MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Uberlândia, v. 14, n. 1, p. 110-121, jan./mar. 2012.
- OLIVEIRA, J. H. G. de; PAOLI, A. A. S. Morfologia e desenvolvimento da plântula de *Acalypha gracilis* (Spreng.) Müll. Arg., *Euphorbia connifolia* L. e *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae). **Revista Araldoa**, Trujillo, v. 23, n. 2, p. 443-460, jul./dic. 2016.
- OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras, **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, out./dez. 2013.
- OLIVERIA, R. B. de; GIMENEZ, V. M. M.; GODOY, S. A. P. de. Intoxicações com Espécies da Família Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 69-71, jul. 2007.
- OLIVEIRA, T. G. de. **Micropropagação e Conservação *in vitro* de *Croton antisiphiliticus* Mart.** 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, 2011.
- OLIVEIRA, T. G.; PEREIRA, A. M. S.; COPPEDE, J. S.; FRANÇA, S. C.; MING, L. C.; BERTONI, B. W. Genetic diversity analysis of *Croton antisiphiliticus* Mart. using AFLP molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2016.
- ÖKSÜZ, S.; SHIEH, H. L.; PEZZUTO, J. M.; OZHATAY, N. CORDELL, G. A. Biologically active compounds from the Euphorbiaceae; part 1. Triterpenoids of *Euphorbia nicaeensis* subsp. *Glareosa*. **Planta medica**, v. 59, n. 5, p. 472-473, 1993.
- PELEGRINI, L. L.; RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KOEHLER, H. S. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 9, p.1527-1523, feb. 2011.
- RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. ***In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, Wallingford, v.38, n. 2, p.116-124, Mar. 2002.
- RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-11, jan./mar 2006.
- RIBEIRO-OLIVEIRA, J. P.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. de A amplitude amostral interfere nas medidas de germinação de *Bowdichia virgilioides* Kunth? **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 4, p. 623-634, out./dez. 2010.
- SÁ, A. de J.; LÉDO, A. da S.; LÉDO, C. A. da S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, out. 2010.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Medidas utilizadas para análise da germinação. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Análise da germinação**: um enfoque estatístico. Brasília: Editora Universidade de Brasília, p. 159-206.

SARMENTO, M. B.; VILLELA, F. A. Sementes de espécies florestais nativas do Sul do Brasil. **Informativo Abrates**, v. 20, n. 1,2 p. 039-044, fev. 2010.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Revista Cerne**, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SCHERWINSKI-PEREIRA J.E.; COSTA, F. H. S.; CAMILLO, J.; SILVA, D. B.; ALVES, R. B. N.; VIEIRA, R. F. Tissue cultures storage of Brazilian medicinal plants germoplasm. **Acta horticulturae**, v. 1, n. 38, p. 211-214, fev. 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. da S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. Cap. 7, p. 177-234.

SECCO, R. de S.; CORDEIRO, I.; SENNA-VALE, L. de; SALES, M. F. de; LIMA, L. R. de; MEDEIROS, D.; HAIAD, B. de S.; OLIVEIRA, A. S. de; CARUZO, M. B. R.; CARNEIRO-TORRES, D.; BIGIO, N. C. Panorama dos recentes estudos taxonômicos em Euphorbiaceae s./ no Brasil. **Revista Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 1, p. 227-242, jan./mar.2012.

SHIBLI, R. D.; SHATNAWI, M. A.; SUBAIH, W.S.; AJLOUNI, M. M. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. **World jornal of agricultural sciences**, n. 2, p. 372-382, 2006.

SMITH, B.A. A new species of *Croton* (*Euphorbiaceae*) from Ecuador. Department of Environmental Studies, Emory University, 400 Dowman Drive, Atlanta Georgia. Novon. **A journal for botanical nomenclature from the Missouri Botanical Garden**, v. 16, n. 1, p. 273-274, 2006.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M.; NUNES, C. F.; ARAÚJO, A. G. de. Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 773-778, maio 2011.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 435-440, jan./jul. 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. (Ed.). **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira em APG II. 2. ed. Nova odessa: Plantarum, 2008. 704 p.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, out./dez. 2007.

STEINITZ, B. Sugar alcohols display nonosmotic roles in regulating morphogenesis and metalism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 1-8, Jan 1999.

VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 3, p. 464-471, jul./set. 2008.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.br>>. Acesso em: 21 dez 2016.

WEBSTER. G. L. (Ed.). A provisional Synopsis of the Sections os the Genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon**, v. 42, n. 4, p. 793-823, Nov. 1993.

ZEVALLOS-POLLITO, P. A.; TOMAZELLO FILHO, M. Espécies lenhosas do gênero *Croton L.* (Euphorbiaceae) no Estado do Acre. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 177-179, jul. 2007.

## **CAPÍTULO I**

**COMO O TAMANHO DA AMOSTRA PODE INFLUENCIAR AS  
INFERÊNCIAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO  
*in vitro*? UM ESTUDO DE CASO A PARTE DE SANGUE DE GRADO**

## RESUMO

Objetivou-se demonstrar como a flutuação no tamanho da amostra pode modificar a inferência sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* de Sanguê de grado. Os frutos foram coletados antes da deiscência e as sementes desinfestadas com etanol a 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) de 1,0% a 1,25% de cloro ativo, adicionado de Tween-80 e três enxagues em água de osmose reversa autoclavada. Foi colocado um embrião por tubo de ensaio com 10 mL de meio de cultura QL. O meio foi suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e solidificado com Agar 7 g L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 5,8. Após, mantidos em sala de cultivo a 25 °C e 16 horas de fotoperíodo. Os tratamentos foram dispostos em delineamento em blocos casualizados com arranjo fatorial 2 (matrizes) x 4 (tamanhos de parcela = 1, 5, 10 e 20 embriões), com cinco repetições. Tempo médio, velocidade média, coeficiente de variação do tempo, incerteza, sincronia, habilidade do desenvolvimento e frequência relativa foram avaliados, considerando como desenvolvido o embrião que apresentou curvatura geotrópica da raiz e/ou a pigmentação dos cotilédones. Dentre essas medidas, coeficiente de variação do tempo, incerteza e sincronia demonstraram fragilidade ao incremento no tamanho da amostra. A sincronia, além de ser influenciada pelo tamanho da amostra, também se demonstrou sensível ao acesso das matrizes. A habilidade de desenvolvimento embrionário, tempo médio e velocidade média não tiveram os resultados atingidos pela flutuação no tamanho da amostra, demonstrando que o desenvolvimento de embriões de *Croton lechleri* Müll Arg. não é um recurso enviesado pelo tamanho da amostra, independente da matriz. O desenvolvimento embrionário da espécie em meio de cultura QL, apesar de alcançar excelente porcentagem, acontece de forma desuniforme. Ainda que, amostras muito pequenas podem acarretar em prejuízo estatístico, pois, pode levar a parcela perdida.

**Palavras-chave:** *Croton lechleri*; habilidade de desenvolvimento embrionário; medidas de desenvolvimento; tamanho da amostra.

## ABSTRACT

The objective was to demonstrate how sample size variation can modify the inference on the *in vitro* development of dragon's blood. The fruits were collected before dehiscence and the seeds were disinfected with 70% ethanol for one minute, commercial sodium hypochlorite solution (NaOCl) from 1.0% to 1.25% active chlorine, with Tween-80 followed by three rinses in autoclaved reverse osmosis water. One embryo was placed per test tube with 10 mL of QL culture medium. The medium was supplemented with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>) solidified with Agar 7 g L<sup>-1</sup>. The pH was adjusted to 5.8. Then, kept in culture room at 25 °C and 16 hours of photoperiod. Treatments were arranged in a randomized block design in a factorial scheme 2 (arrays) x 4 (plot sizes = 1, 5, 10 and 20 embryos), with five replications. Mean time, mean velocity, coefficient of variation of time, uncertainty, synchrony, developmental ability and relative frequency were evaluated, considering as developed the embryo that presented geotropic root curvature and/or cotyledon pigmentation. Among these measures, coefficient of variation of time, uncertainty and synchrony showed fragility to increase the sample size. The synchrony, in addition to being influenced by the size of the sample, was also shown to be sensitive to the array. Embryonic development ability, mean time, and mean velocity were not affected by fluctuation in sample size, demonstrating that the development of *Croton lechleri* Müll Arg. embryos is not a resource skewed by sample size, independent of the array. The embryonic development of the species in QL culture medium, despite achieving high percentage, occurs uniformly. Although, very small samples can lead to statistical errors, since can lead to lost parcels.

**Keywords:** *Croton lechleri*; embryonic developmental ability; development measures; sample size.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos possui grande relevância para a produção vegetal. Apesar disso, os protocolos da área repetitivamente ignoram aspectos sobre o tamanho da amostra usado para viabilizar inferências fisiológicas do desenvolvimento dos explantes. Pouco se tem atentado ao assunto e ao que parece, não há um padrão ótimo que represente uma parcela ou amostra. O tamanho adequado da amostra proporciona redução de resultados espúrios (MORAIS et al., 2014) e, portanto, maior fidedignidade científica, permitindo repetitividade e reprodutibilidade aos ensaios (HAESBAERT et al., 2017). Por isso é possível indagar, qual seria o tamanho amostral ideal para análises de cultivo *in vitro*? Essa pergunta é ainda mais representativa ao se pensar que tem sido usado, nas rotinas laboratoriais apenas adequações de acordo com a disponibilidade de material. Isso fica visível quando observado alguns trabalhos de desenvolvimento *in vitro* de embriões, como único embrião usado para determinar o desenvolvimento *in vitro* de *Buthia eriospatha* Mart. (MINARDI et al., 2011), quatro para *Jatropha* L. (JESUS et al., 2003) ou mesmo os oito para tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) (COSTA; ALOUFA, 2007).

A ausência de padronização do tamanho da amostra experimental tende a ser maior quando se trata de espécies nativas que possuem baixa representatividade econômica e elevada representatividade ecológica (RIBEIRO-OLIVEIRA; RANAL, 2014). Esse problema atinge as espécies do gênero *Croton* L., dentre elas o *Croton lechleri* Müll Arg, conhecido por suas propriedades medicinais. A seiva da espécie é usada no tratamento de úlceras, gastrites, diarreias, no aumento da imunidade de pacientes portadores do vírus da AIDS (AZEVEDO et al., 2008) e como antitumoral (DE MARINO et al., 2008; FAYAD et al., 2009). A espécie vem conquistando mercados importantes, incluindo a comercialização em países ocidentais (MONTOPOLI et al., 2012).

Ainda assim, não existem estudos relacionados ao desenvolvimento embrionário *in vitro* para o gênero, fato preocupante, tendo em vista o extrativismo predatório que é praticado com a maioria das espécies nativas medicinais (OLIVEIRA, et al., 2016). No entanto, é possível observar que a flexibilidade nos tamanhos de amostra se estende para as demais pesquisas que envolvem o cultivo *in vitro*. Na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.), foi usado um explante por amostra (LIMA, et al., 2008), na multiplicação *in vitro* de

*Croton antisiphiliticus* Mart., Oliveira, et al., (2011) usaram cinco explantes e 25 sementes por repetição na micropropagação de *Croton floribundus* Spreng. (SILVA, et al., 2013). Moraes et al., (2014) levanta essa questão em micropropagação de videira (*Vitis vinífera* L.) e conclui que para a espécie, doze é um tamanho de amostra ideal para o cultivo *in vitro*.

Para Ribeiro-Oliveira e Ranal (2016), quando se trata de espécies nativas, ainda há muito o que descobrir sobre a quantidade de sementes que represente o tamanho ideal de uma amostra. Para desenvolvimento embrionário *in vitro*, esse assunto se torna mais indefinido ainda, pois, não há relatos na literatura o que motiva o presente trabalho. Nessa transposição de áreas, o embrião representa uma excelente fonte de explante, pois possui tecidos de robusta totipotência (MINARDI et al., 2011), representa uma estrutura com baixo índice de contaminação, garante a obtenção de nova plântula em menor tempo (SOUZA et al., 2012) e alta porcentagem de sucesso no desenvolvimento se manipulado correta e assepticamente. Por isso, é um bom modelo biológico para estudos precursores sobre o tamanho da amostra no cultivo *in vitro*.

É possível, entretanto, que o processo de desenvolvimento embrionário possa ser melhor quantificado quando utilizado medidas precisas. As medidas de germinação e desenvolvimento foram desenvolvidas pela ciência em sementes para reportar com maior acurácia o processo germinativo (LABOURIAU, 1983), que representa o desenvolvimento do embrião através das camadas de revolvimento (tecido de reserva e integumentos). Esse processo é considerado um evento binomial e, portanto, o uso das medidas pode ser viabilizado para outros processos binomiais, como é o caso do desenvolvimento *in vitro* de embriões. Entretanto, existem medidas que apresentam sensibilidade à flexibilidade amostral (RIBEIRO-OLIVEIRA et al., 2013) e, é neste sentido, que as inferências do processo de desenvolvimento embrionário podem conter erros conceituais que minariam as estratégias definidas a partir destes resultados, como a produção de protocolos robustos à espécie. Como não foi desenvolvido nenhuma pesquisa que otimizasse o tamanho da amostra para desenvolvimento embrionário de Sangue de grado, objetivou-se demonstrar como a flutuação no tamanho da amostra pode modificar a inferência sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* da espécie.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

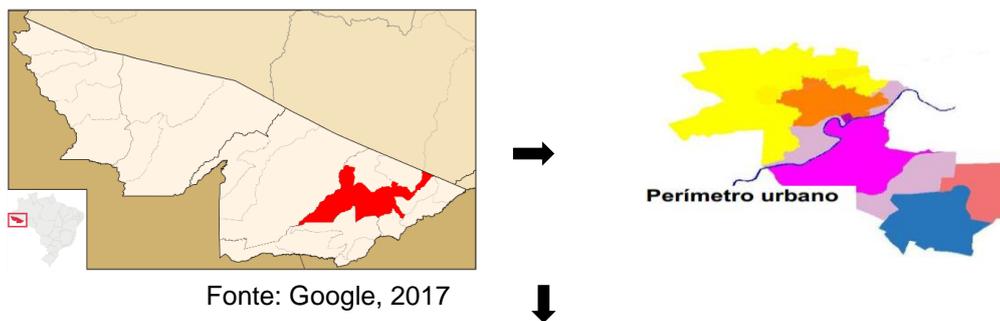
### 2.1 Coleta e processamento dos frutos

Para a realização do experimento, foram utilizados frutos provenientes de plantas matrizes pertencentes a dois acessos (Tabela 1). Os indivíduos estão separados por aproximadamente nove km (Figura 1), uma vez que não foi possível encontrar populações com frutos com maior distância na época da coleta. Apesar que, vinte metros entre árvores do cerrado já são suficientes para evitar fluxo gênico. A coleta foi realizada antes da deiscência dos frutos e a retirada das sementes feita em laboratório, com auxílio de alicates ortodônticos, tesouras e pinças.

Tabela 1 – Coordenadas geográficas das matrizes de Sangue de grado usadas em experimento de desenvolvimento embrionário. UTM: Universal Transverse Mercator.

| Matrizes | Coordenadas geográficas (UTM) |
|----------|-------------------------------|
| 1        | -10.012357; -67.842624        |
| 2        | -9.957514; -67.874764         |

Figura 1 – Localização das matrizes de Sangue de grado utilizadas na pesquisa.



## 2.2 Desinfestação de sementes

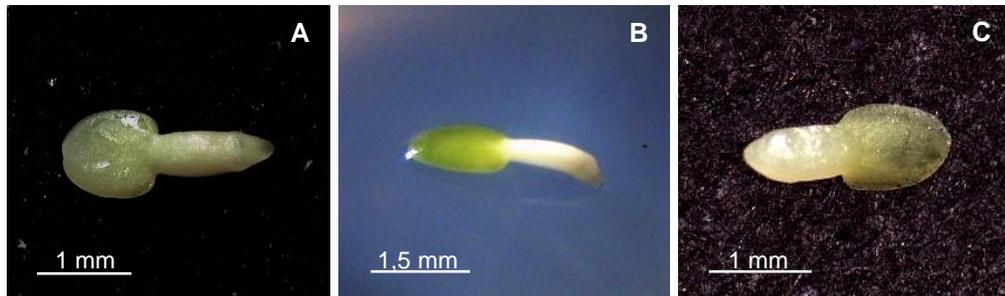
O processo de desinfestação aconteceu em câmara de fluxo laminar. As sementes foram imersas em etanol a 70% por um minuto, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% do composto comercial (NaOCl), adicionado de uma gota de Tween-80 para cada 50 mL por 15 minutos. O processo foi finalizado com três enxagues em água de osmose reversa autoclavada.

## 2.3 Estabelecimento de embriões

A extração dos embriões foi realizada com o auxílio de estereomicroscópio, com imediata transferência para tubos de ensaio (150 mm x 25 mm) com 10 mL de meio de cultura QL (QUOIRIN & LEPROIVRE, 1977). A escolha desse meio se deu em decorrência da maior concentração de nitrogênio total, aproximadamente 39,0 mM importante para o desenvolvimento das plântulas (MACHADO et al., 2007), e principalmente por ser um meio já testado no laboratório de cultura de tecidos para desenvolvimento embrionário *in vitro* de Sangue de grado (dados não publicados). O meio foi suplementado com sacarose 30 g L<sup>-1</sup> e solidificado com Agar 7 g L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 5,8-. Em cada tubo de ensaio foi colocado um embrião, sendo a composição da unidade experimental ( $r = 5$ ) realizada pela aleatorização de número diferente de tubos de ensaio, a fim de perfazer o tamanho de amostra em estudo (Tabela 2). Vale ressaltar que a retirada de embriões é uma atividade extremamente laboriosa, tendo em vista a estrutura da semente ser de alta sensibilidade, por isso foi limitado a vinte embriões por parcela.

Os embriões condicionados ao meio nutritivo foram mantidos em sala de cultivo *in vitro* a 25 °C e fotoperíodo de 16 horas (fornecido por lâmpadas fluorescentes tubulares). As avaliações do desenvolvimento dos embriões foram realizadas a cada 12 horas, nos mesmos horários, até que os eventos alcançassem a estabilização, encerrando-se aos sete dias após o condicionamento. O critério estabelecido para desenvolvimento foi a curvatura geotrópica da raiz e/ou a pigmentação dos cotilédones (Figura 1), que conferem habilidade autotrófica para o estabelecimento do indivíduo vegetal.

Figura 2 – Embrião de Sangue de grado (A) antes do estabelecimento; (B) embrião desenvolvido *in vitro* após 48h; (C) embrião não desenvolvido após 192h de avaliação estabelecidos em meio de cultura QL.



Para a interação, a hipótese nula foi de que o efeito do tamanho da amostra independe do efeito da matriz para a característica em estudo. Quando não houve interação entre os fatores, realizou-se o estudo dos efeitos principais (i) os resultados da característica em estudo não são afetados pelo tamanho da amostra, independente do efeito da matriz; (ii) os resultados da característica em estudo não são afetados pela matriz, independentemente do tamanho da amostra. Foi usado o termo “embriões desenvolvidos”, porque de acordo com Bewley et al., (2013), termo germinação é relativo ao processo de desenvolvimento que inicia com a embebição da semente/diásporo e encerra com protrusão do embrião, e o emergir da plântula através da estrutura que a envolve (material de reserva e integumentos/envoltórios). No presente trabalho, o embrião foi retirado dos envoltórios mecanicamente, e, portanto, não é cabível a nomenclatura de ‘processo germinativo’.

Tabela 2 – Esquema do ensaio fatorial do desenvolvimento embrionário *in vitro* de Sangue de grado sob duas matrizes (P) e quatro tamanhos de amostra (T.A.).

| Tratamentos | P | T.P. | T.A. |
|-------------|---|------|------|
| T1          | 1 | 1    | 5    |
| T2          | 1 | 5    | 25   |
| T3          | 1 | 10   | 50   |
| T4          | 1 | 20   | 100  |
| T5          | 2 | 1    | 5    |
| T6          | 2 | 5    | 25   |
| T7          | 2 | 10   | 50   |
| T8          | 2 | 20   | 100  |

## 2.4 Características avaliadas

Optou-se pela quantificação acurada do processo de desenvolvimento embrionário por meio de medidas desenvolvidas para a ciência de sementes, a fim de contribuir para maior compreensão de como o meio, ainda que artificial, pode interagir com o indivíduo na intenção de elucidar melhores estratégias de perpetuação da espécie, seja para fins comerciais ou convencionais. Foram observadas, as seguintes Características:

### 2.4.1 Embriões desenvolvidos (%)

Em uma transposição de área, a habilidade de um embrião desenvolver pode ser quantificada como a porcentagem de embriões com curvatura geotrópica e/ou pigmentação, em condições experimentais. Isto porque esses aspectos, assim como para a ciência em sementes (SANTANA; RANAL 2004; RANAL; SANTANA 2006), sinalizam capacidade de autotrofia de plantas jovens:  $ED(\%) = \frac{ED}{N}100$

Onde: ED (%): porcentagem de embriões desenvolvidos; ED: número de embriões desenvolvidos; n: número de embriões estabelecidos *in vitro*.

### 2.4.2 Tempo médio de desenvolvimento do embrião

Calculado pela expressão proposta por Labouriau (1983), é a média do tempo de desenvolvimento, onde o número de embriões desenvolvidos nos intervalos de tempo estabelecidos para a coleta de dados é usado como peso de ponderação (Ranal e Santana, 2006):  $\bar{t}(\text{horas}) = \frac{\sum_{i=1}^k ni.ti}{\sum_{i=1}^k ni}$

Sendo:  $\bar{t}(\text{horas})$ : tempo médio de desenvolvimento;  $t_i$ : tempo entre o início do experimento e a i-ésima observação (hora);  $n_i$ : número de embriões que desenvolveram no tempo  $t_i$ ;  $k$ : último tempo de desenvolvimento embrionário.

### 2.4.3 Coeficiente de variação do tempo de desenvolvimento do embrião

Segundo Ranal e Santana (2006), mensura o grau de dispersão do desenvolvimento ao redor do tempo médio, permitindo avaliar a uniformidade do

desenvolvimento embrionário no tempo:  $CV_t = \frac{S_t}{\bar{t}} \cdot 100$

Onde:  $S_t$ : desvio padrão do desenvolvimento;  $\bar{t}$ : tempo médio do desenvolvimento.

#### 2.4.4 Velocidade média de desenvolvimento do embrião

Calculada segundo Labouriau (1970), é uma frequência que permite a observação do desenvolvimento embrionário ao longo do tempo (RANAL; SANTANA, 2006). De acordo com Ribeiro-Oliveira e Ranal (2016), trata-se de uma medida com critério similar ao usado pela cinética química para medir a velocidade das reações:  $\bar{v} = \frac{CV}{100} = \frac{1}{\bar{t}}$

Onde:  $\bar{v}$  : velocidade média de desenvolvimento embrionário; CV: coeficiente de velocidade de desenvolvimento;  $\bar{t}$ : tempo médio de desenvolvimento. Unidade: horas<sup>-1</sup>.

#### 2.4.5 Incerteza de desenvolvimento do embrião

Associada à distribuição da frequência relativa, destaca a variação do desenvolvimento ao longo do tempo, expressa em *bits*, proposta por Labouriau e Valadares (1976). Quanto menor o valor de incerteza, mais previsível será o desenvolvimento:  $I = -\sum_{i=1}^K f_i \log_2 f_i$ , com  $f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^K n_i}$

Sendo:  $f_i$  : frequência relativa de desenvolvimento;  $\log_2$ : logaritmo de base 2; K: último dia de observação.

#### 2.4.6 Sincronia de desenvolvimento do embrião

Calculada segundo Ranal e Santana (2006), avalia a sobreposição de eventos, sendo mais síncrona àquela amostra que representa maior sobreposição e, portanto, com valor mais próximo a 1 (PRIMACK, 1980; RANAL; SANTANA, 2006):

$$Z = \frac{\sum_{i=1}^k C_{ni,2}}{C_{\sum ni,2}}, \text{ com: } C_{ni,2} = n_i \frac{(n_i-1)}{2}$$

Onde:  $C_{ni,2}$ : combinação duas a duas dos embriões desenvolvidos no tempo "i";  $n_i$ : número de embriões desenvolvidos no tempo "i"

#### 2.4.7 Frequência relativa de desenvolvimento do embrião

A frequência relativa foi calculada segundo Labouriau e Valadares (1976),  
 Por meio da expressão matemática:  $f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$

Onde:  $f_i$ : frequência relativa do desenvolvimento embrionário;  $n_i$ : número de embriões desenvolvidos na hora  $i$  e,  $k$ : última hora de observação do desenvolvimento. Por meio da frequência, é possível observar como ocorre o desenvolvimento do embrião ao longo do tempo (SANTANA; RANAL, 2004).

### 2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Os tratamentos foram dispostos em delineamento em blocos casualizados com arranjo fatorial 2 x 4 com cinco repetições. Optou-se pela utilização de blocos mesmo em ambiente controlado devido a junção dos tubos para a formação dos tamanhos de parcelas. Para as análises estatísticas, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para testar a normalidade dos resíduos da ANOVA, Levene para testar a homogeneidade entre as variâncias e Tukey para testar a aditividade entre os blocos, ambos com significância de 0,01 (Apêndice A). Uma vez que essas pressuposições foram aceitas, foi aplicado ANOVA aos dados e o teste de Tukey foi utilizado para comparação entre médias a 0,05 de significância. Optou-se por realizar análise paramétrica da característica embriões desenvolvidos (%) que, mesmo quando transformada, não atendeu a todos os pressupostos, mas reduziu o valor  $F$  do teste de Levene e (ou) aumentou o valor  $W$  do teste de Shapiro-Wilk, conforme preconizado por Ribeiro-Oliveira et al., (2013) e Ribeiro-Oliveira e Ranal (2016).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância não detectou interação entre a matriz estudada e tamanho da amostra para nenhuma das Características observadas (Apêndices B - C), demonstrando que o uso de medidas para determinar o desenvolvimento *in vitro* do embrião de *Croton lechleri* Müll Arg. não necessariamente é um recurso enviesado pelo tamanho da amostra, independente da matriz. Os embriões da espécie apresentam elevada capacidade de desenvolvimento ( $\geq 90\%$ ) (Tabela 3).

Embora a distância entre as matrizes de Sangue de grado seja apenas de aproximadamente 9 km, a diferença na porcentagem de desenvolvimento embrionário pode estar associada a diversos fatores, como a dinâmica da água no solo que influencia diretamente na fauna edáfica e incidência de luz que atuam diretamente na produção, ocasionando diferenças nas medidas avaliadas. Foi constatado uma similaridade na diferença entre acessos por Berger et al., (2014) em emergência de plântulas de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.

O tempo médio e a velocidade média de desenvolvimento embrionário também foram característico da espécie, sendo indiferentes ao tamanho da amostra, isso, provavelmente porque os embriões foram distribuídos isoladamente em tubos unidos para formar o tamanho da parcela em interação interespecífica, independendo da densidade. No entanto, embriões provenientes da Matriz 1 levaram mais tempo para se desenvolverem que os da Matriz 2 (Figura 2). Essa pequena diferença entre as matrizes pode estar relacionada à maturação dos frutos ou à localização das matrizes.

A velocidade média é recíproca do tempo médio de desenvolvimento (RANAL; SANTANA, 2006) e tem baixa sensibilidade ao tamanho da amostra, é uma característica que muda à medida que ocorrem mudanças químicas no processo (RIBEIRO-OLIVEIRA E RANAL, 2016). Segundo Ribeiro-Oliveira e Ranal (2016), as medidas germinabilidade, substituída neste trabalho por desenvolvimento e o tempo médio, são resistentes ao tamanho da amostra e devem ser usados para qualquer estudo de germinação e/ou desenvolvimento.

O tamanho da amostra foi significativo para coeficiente de variação do tempo de desenvolvimento embrionário, incerteza e sincronia do desenvolvimento embrionário (Tabela 4 - 5), demonstrando que essas Características são sensíveis ao número de embriões que compõem a amostra, já que aumentam à medida que é acrescido o tamanho da amostra. A única variável que apresentou sensibilidade à

localização das matrizes foi a sincronia do desenvolvimento embrionário, embriões do acesso 1 desenvolveram-se com mais sincronismo (Tabela 5), por se tratar de uma característica que marca a sobreposição de eventos, quando no mínimo dois embriões desenvolveram juntos.

Tabela 3 – Habilidade de desenvolvimento embrionário e tempo médio de desenvolvimento embrionário de Sangue de grado *in vitro* de duas matrizes (1 e 2) analisados a partir de diferentes tamanhos de amostra (T.A.).

| Característica             | T.A.  | Matrizes |        | Média   |
|----------------------------|-------|----------|--------|---------|
|                            |       | 1        | 2      |         |
| Embriões desenvolvidos (%) | 5     | 100,00   | 100,00 | 100,00a |
|                            | 25    | 92,00    | 100,00 | 96,00a  |
|                            | 50    | 96,00    | 96,00  | 96,00a  |
|                            | 100   | 90,00    | 99,00  | 94,5a   |
|                            | Média | 95,5A    | 98,75A |         |
| $\bar{t}$ (horas)          | 5     | 81,60    | 67,20  | 74,40a  |
|                            | 25    | 55,44    | 53,28  | 54,36a  |
|                            | 50    | 51,67    | 58,32  | 54,99a  |
|                            | 100   | 57,00    | 52,67  | 54,84a  |
|                            | Média | 61,43A   | 57,87A |         |

Notas: 1. As médias seguidas por mesma letra (letra maiúscula na linha e minúscula na coluna), não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. Embriões desenvolvido (%): Habilidade de desenvolvimento embrionário *in vitro*;  $\bar{t}$  (horas): tempo médio de desenvolvimento embrionário.

O trabalho realizado com desenvolvimento de embriões *in vitro* traz grande importância para a cultura de tecidos, pois apresenta outras características do desenvolvimento que vai além de apenas especificar se desenvolveu ou não desenvolveu. As medidas observadas, demonstram a dinâmica e a uniformidade do processo (RANAL; SANTANA, 2006). As respostas adquiridas informam até que ponto o tamanho da amostra pode influenciar nas medidas de desenvolvimento embrionário, ficando evidente que pode haver prejuízo estatístico quando utilizado parcelas muito pequenas, pois pode levar a parcela perdida. Isso pode ter peso sobre inferências fisiológicas, quando a ideia de parcela perdida não é respeitada. As características utilizadas nesta pesquisa foram desenvolvidas e aprimoradas há anos para germinação de sementes (BEWLEY; BLACK, 1994; LABOURIAU, 1983) e passou a ser mais intensamente empregadas nas últimas décadas (RIBEIRO-OLIVEIRA; RANAL, 2016).

Segundo Bewley et al. (2013), a ação visualizada do processo de germinação, na qual ocorre protrusão embrionária, é, na verdade a fase final da germinação, que,

se inicia, de fato, com a absorção de água pela semente. Quando o embrião é retirado da semente de forma mecânica e estabelecido em meio de cultura, não ocorrerá mais o processo de germinação, mas, este estará livre para seguir o processo de desenvolvimento e formação de plântula.

Tabela 4 – Uniformidade e velocidade média de desenvolvimento embrionário de Sangue de grado *in vitro* de duas matrizes (1 e 2) analisados a partir de diferentes tamanhos de amostra (T.A.).

| Característica                   | T.A.  | Matrizes |        | Média  |
|----------------------------------|-------|----------|--------|--------|
|                                  |       | 1        | 2      |        |
| $CV_t$ (%)                       | 5     | 0,00     | 0,00   | -      |
|                                  | 25    | 38,62    | 40,03  | 39,33a |
|                                  | 50    | 50,61    | 45,38  | 47,99b |
|                                  | 100   | 67,81    | 44,47  | 56,14c |
|                                  | Média | 39,26A   | 32,47A |        |
| $\bar{v}$ (horas <sup>-1</sup> ) | 5     | 0,017    | 0,019  | 0,018a |
|                                  | 25    | 0,020    | 0,019  | 0,020a |
|                                  | 50    | 0,020    | 0,019  | 0,019a |
|                                  | 100   | 0,018    | 0,020  | 0,019a |
|                                  | Média | 0,019A   | 0,019A |        |

Notas: 1. As médias seguidas por mesma letra (letra maiúscula na linha e minúscula na coluna), não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.  $CV_t$  (%): coeficiente de variação do tempo de desenvolvimento embrionário;  $\bar{v}$  (horas<sup>-1</sup>): velocidade média de desenvolvimento embrionário.

Não foi possível encontrar na literatura, trabalhos avaliando as interferências do tamanho da amostra nas medidas de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Por isso, é provável que esta seja a primeira pesquisa a demonstrar o quanto a quantidade de embriões utilizada para compor uma repetição pode influenciar no desenvolvimento de embriões *in vitro* da espécie. Sendo assim, é necessário que sejam estudados para outros tipos de explantes extrapolando o tamanho amostral utilizado nesta pesquisa que não contribui para tamanhos maiores que vinte. Vale ressaltar ainda, que a manipulação de embriões é um trabalho delicado e exaustivo, e um maior tamanho de amostra poderá ser desgastante para o pesquisador.

Apesar da satisfatória taxa de desenvolvimento de embriões de Sangue de grado, esse processo ocorreu de maneira desuniforme, independente do acesso e da quantidade de embriões que compunha a amostra ( $32,47\% \leq CV_t \leq 56,14\%$ ) (Tabela 4). Essa heterogeneidade também foi observada por Dorneles et al. (2013) para germinação de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Os autores do referido trabalho atribuem tal comportamento às espécies nativas que estão sujeitas a pressões seletivas do

ambiente. Essa seleção ambiental pode ter causado heterogeneidade no desenvolvimento de embriões de Sangue de grado, pois mesmo padronizando-os por tamanho durante o estabelecimento, o nível e a capacidade de desenvolvimento e/ou maturação dos mesmos dentro da semente não podem ser medidos e/ou avaliados. Isso mostra que as medidas captam até mesmo nuances do processo germinativo, quiçá detalhes quando usando diferentes tratamentos hormonais ou meios de cultura. A contribuição está no fato dessas medidas poderem atribuir maior número de informações a um mesmo teste quando se pensado no que é usual atualmente na área.

A velocidade média do desenvolvimento embrionário não foi sensível ao tamanho da amostra, tão pouco ao acesso das matrizes (Tabela 4). Os embriões provenientes de duas matrizes e distribuídos em tamanhos de parcelas diferentes desenvolveram-se em velocidades bem próximas ( $0,018 \leq \bar{v} \leq 0,020$ ). Segundo Santana e Ranal (2004), essa medida pode crescer e decrescer ao longo das avaliações, sendo, no entanto, inversa ao tempo médio de desenvolvimento.

Tabela 5 – Incerteza e sincronia de desenvolvimento embrionário de Sangue de grado *in vitro* de duas matrizes (1 e 2) analisados a partir de diferentes tamanhos de amostra (T.A.).

| Característica | T.A.  | Matrizes |       | Média  |
|----------------|-------|----------|-------|--------|
|                |       | 1        | 2     |        |
| I (bit)        | 5     | 0,00     | 0,00  | -      |
|                | 25    | 1,06     | 1,34  | 1,20a  |
|                | 50    | 1,48     | 2,17  | 1,83b  |
|                | 100   | 2,25     | 2,16  | 2,21c  |
|                | Média | 1,20A    | 1,42A |        |
| Z              | 5     | 0,00     | 0,00  | -      |
|                | 25    | 0,36     | 0,30  | 0,33a  |
|                | 50    | 0,40     | 0,17  | 0,29ab |
|                | 100   | 0,23     | 0,22  | 0,23b  |
|                | Média | 0,25A    | 0,17B |        |

Notas: 1. As médias seguidas por mesma letra (letra maiúscula na linha e minúscula na coluna), não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. I (bit): incerteza; Z: sincronia do desenvolvimento embrionário.

Vale destacar que as Características coeficiente de variação do tempo, incerteza e sincronia do desenvolvimento embrionário (Tabela 4 - 5), não apresentaram valores para a parcela formada por apenas um embrião. Ambas não puderam ser calculadas, pois, um único indivíduo representou o todo e estas

Características avaliam o processo de desenvolvimento em conjunto representado por no mínimo dois indivíduos. Fato que ratifica a ideia que apenas um embrião para mencionar comportamento de espécie é algo viável do ponto de vista estatístico e fisiológico.

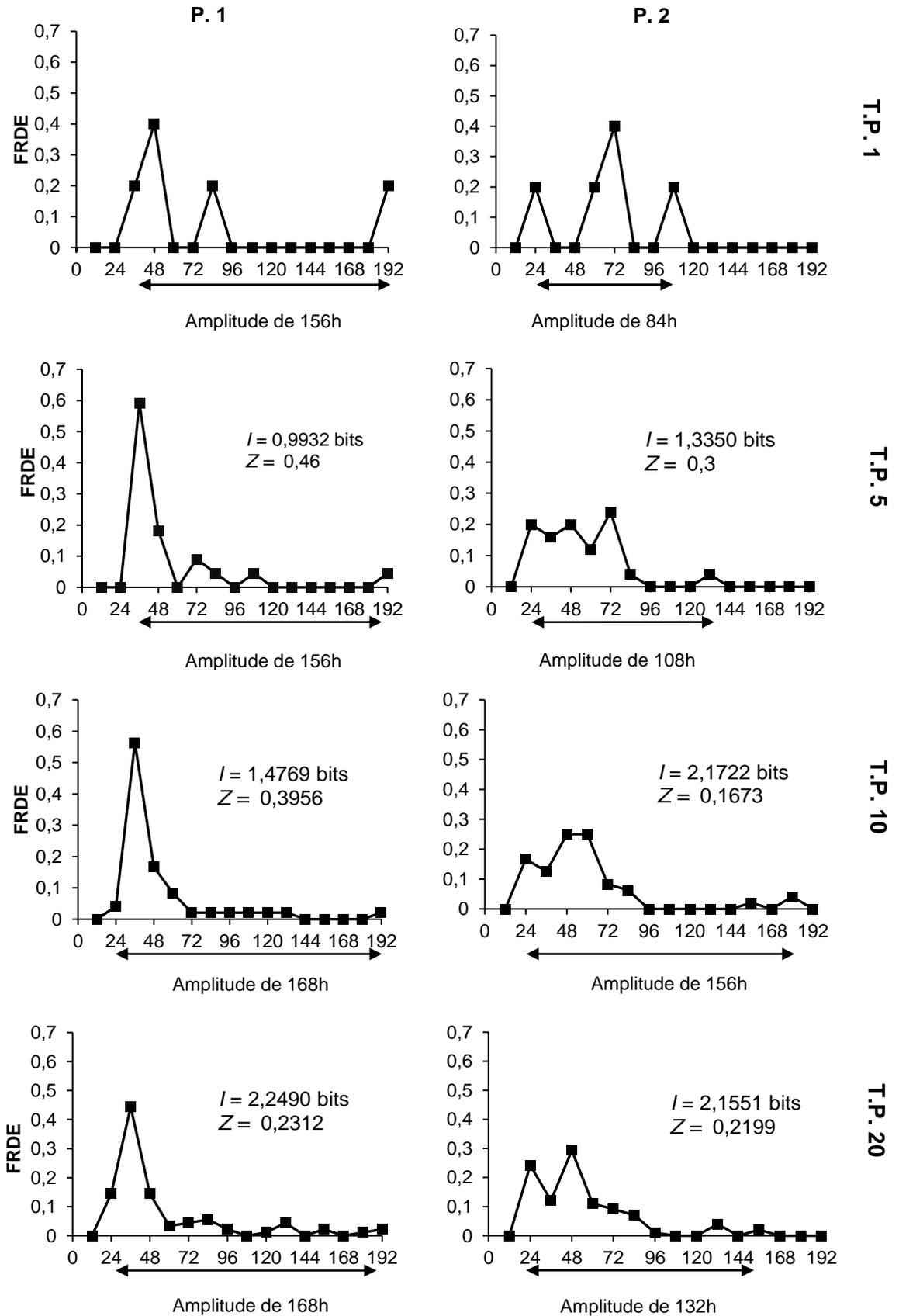
A incerteza da mensagem a ser transmitida, originada da teoria da informação, proposta por Shannon (1948), é uma medida que vem sendo utilizada desde muitos anos por entomólogos e botânicos para avaliar a entropia de sistemas. Recentemente, a medida vem sendo usada pela ciência de sementes, informando o grau de sucesso de uma espécie em espalhar a germinação de suas sementes por meio do tempo (RANAL; SANTANA, 2006). Assim, quanto menor a incerteza no desenvolvimento embrionário, maior a certeza de ocorrência de eventos (Tabela 5). E, quanto maior o pico de frequência relativa do desenvolvimento, mais diverso é o sistema naquele pico (Figura 2).

A Sincronia do desenvolvimento embrionário, varia de zero a um (0 a 1). Quanto mais próximo de um, mais síncrono é o evento e maior é a ocorrência de eventos sobrepostos resultando na tendência de haver maior homogeneidade. Essa medida, certamente foi comprometida pela redução no tamanho da parcela, tendo em vista que amostras muito pequenas podem influenciar na certeza informacional (MELO, 2008; SILVA, 2008).

O tempo inicial do desenvolvimento dos embriões de Sangue de grado nos dois acessos estudados por meio de diferentes tamanhos de amostra variou entre 24h a 36h (Figura 2). Embriões da matriz 2 apresentaram menores frequência relativa e número de picos, enquanto a matriz 1 ocorreu o contrário. Essa relação entre o tamanho e quantidade de picos aconteceu de forma contrária com *Bowdichia virgilioides* kunth, onde o menor número de frequência foi acompanhado do maior número de picos (RIBEIRO-OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, o ocorrido se deu para diásporos que possuíam menor qualidade fisiológica.

A amplitude temporal para o desenvolvimento embrionário de duas matrizes estudadas por diferentes tamanhos de amostras, que demonstra o tempo em horas entre o primeiro e o último desenvolvimento foi de 84 horas a 192 horas (Figura 2). Isso porque, mesmo os frutos sendo selecionados, o amadurecimento e conseqüente desenvolvimento embrionários dos mesmos ocorrem de forma independente quando acondicionados em ambientes separados, além de sofrerem influência de diversos fatores.

Figura 3 – Frequência relativa do desenvolvimento embrionário - FRDE *in vitro* de Sangue de grado de duas Matrizes (P) estudados por meio de quatro tamanhos de amostra (T.P.): *l*: incerteza; *Z*: sincronia.



## 4 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de embriões de Sangue de grado *in vitro* independe do tamanho da amostra, e da matriz, demonstrando que o uso de medidas para determinar o desenvolvimento *in vitro* desses embriões não necessariamente é um recurso enviesado por esses fatores.

O desenvolvimento embrionário da espécie em meio de cultura QL, mesmo alcançando excelente porcentagem, acontece de forma desuniforme. Ainda que, conforme esperado, constatou-se que amostras muito pequenas podem acarretar em prejuízo estatístico, por inflacionar os problemas de parcela perdida.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, K.; ALECHANDRE, A.; LIMA, A.; LEITE, A.; MELO, T.; COSTA, J.; PEREIRA, M. A.; CAMPOS, C. A.; LIMA, A. de. **Guia para a extração de sangue de grado (*Croton lechleri* Müll. Arg.)**: recomendações técnicas para a extração de látex de sangue de grado (sangue de dragão). Rio Branco-AC: USAID/IPAM, 2008. 28p.
- BERGER, A. P. de A.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. de. Variabilidade na dormência relative dos diásporos de *Lithraea molleoides* (Vell.) Eng. **Ciências Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 2, p. 1-13, abr./jun. 2014.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H. (Ed.). Germination. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. Ed. Springer Science & Business Media, 2013. p. 133-153.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, p. 445, 1994.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Germination, Structure, and Composition**. In: \_\_\_\_\_. **Seeds: physiology of development and germination**. London. Springer Science e Business Media, p. 1-25, 1985.
- COSTA, N. M. de S.; ALOUFA, M. A. I. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 38, n. 3, p. 276-279, jul./set. 2007.
- DA SILVA, D. O.; AMARAL, A. C. F.; FERREIRA, J. L. P.; SANTIAGO, L. J. M.; LOURO, R. P. Micropropagation na *in vitro* production of secondary metabolites of *Croton floribundus* Spreng. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Wallingford, v. 49, n. 3, p. 366-372, Jun. 2013.
- DORNELES, M. C.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. de. Germinação de semente e emergência de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschut, Fabaceae, estabelecida em fragmentos florestais do cerrado, MG. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 3, p. 291-304, jul./set. 2013.
- FAYAD, W.; FRYKNAS, M.; BRNJIC, S.; OLOFSSON, M. H.; LARSSON, R.; LINDER, S. Identification of a novel topoisomerase inhibitor effective in cells overexpressing drug efflux transporters. **PMC journals list**, Bethesda, v. 4, n. 10, p. 10-38. Oct. 2009.
- HAESBAERT, F. M.; LOPES, S. J.; MERTZ, L. M.; LUCIO, A. D.; HUTH, C. Tamanho de amostra para determinação da condutividade elétrica individual de sementes de girassol. **Revista Bragantia**, Campinas, v. 76, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2017.
- JESUS, A. M. S.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, Lavras v. 50, n. 288, p. 183-189, nov. 2003.

LABOURIAU, L. G. On the physiology of seed germination in *Vicia graminea* Sm. I. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 235-262, 1970.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da organização dos Estados Americanos, Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 1983. 174 p.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 263-284, 1976.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, A. A. N. Indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill). **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 32, n. 1, p. 17-22, jan./fev. 2008.

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A.; RITTER, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S.; ZANETTE, F. Meios de cultura na micropropagação do porta-enxerto de videira "VR043-43" (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 277-280, jan./fev. 2007.

MAGUIRE, J. D. Speed germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madson, v. 2, p. 176-177, 1962.

MELO, A. S. O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécie e equabilidade em um índice de diversidade? **Revista Biota Neotropica**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 21-27, jul./set. 2008.

MINARDI, B. D.; VOYTENA, A. P. L.; RANDI, A. M.; ZAFFARI, G. R. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia eriospatha* (Mart. Ex Drude) Becc. **Insula Revista de Botânica**, Florianópolis, n. 40, p. 70-81, 2011.

MONTOPOLI, M.; BERTIN, R.; CHEN, Z.; BOLCATO, J.; CAPARROTTA, L.; FROLDI, G. *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. **Journal of ethnopharmacology**, Irelan, v. 144, n. 3, p. 747-753, Oct 2012.

MORAIS, A. R. de; ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M.; PEIXOTO, A. P. B. Estimação do tamanho de parcela para experimento com cultura de tecidos em videira. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 113-124, jan./fev. 2014.

OLIVEIRA, T.G. de; PEREIRA, A. M. S.; COPPEDE, J. S.; FRANÇA, S. C.; MING, L. C.; BERTONI, B. W. Genetic diversity analysis of *Croton antisiphiliticus* Mart. using AFLP molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 1 p. 1-8, jan./mar. 2016.

OLIVEIRA, T. G. de; PINA, P. S. S.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Croton antisiphiliticus* Mart., **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1712-1718, out. 2011.

PRIMACK, R. B.; Variation in the phenology of natural populations of montane shrubs in New Zealand. **Journal of Ecology**, Boston, v.68, n.3, p. 849-862, Nov. 1980.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus. **Acta Horticulturae, Amsterdã**, v.78, p. 437-442, 1977.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-11, jan./mar 2006.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. de; FERREIRA, W. R.; MENDES-RODRIGUES, C. Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 849-855, out.dez. 2009.

RIBEIRO-OLIVEIRA, J. P.; RANAL, M. A. Sementes florestais brasileiras: início precário, presente inebriante e o futuro promissor? **Ciência florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 771-784, jul./set. 2014.

RIBEIRO-OLIVEIRA, J. P.; RANAL, M. A. Sample size in studies on the germination process. **Botany**, v. 94, n. 2, p. 103-115, Nov. 2016.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Medidas utilizadas para análise da germinação. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, p. 159-206.

SOUZA, R. A. V. de; BRAGA, F. T.; AZEVEDO, P. H. de; FERREIRA, J. L.; CANÇADO, G. M. de A. Efeito da luz na germinação in vitro de embriões zigóticos de genótipos de oliveira. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 3, p. 299-304, mai./jun. 2012.

SHANNON, C. E. The Mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, New York, v. 27, p. 379-423, Oct 1948.

TUKEY, J. W. One Degree of Freedom for Non-Additivity. **Biometrics**, v. 5, p. 232-242, 1949.

## **CAPÍTULO II**

**CRESCIMIENTO CONTROLADO *in vitro* DE SANGUE DE GRADO.**

## RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito de temperaturas e concentrações de agentes osmóticos no crescimento controlado *in vitro* de *Croton lechleri* Müll Arg. Para o desenvolvimento do experimento foram utilizados explantes representados por um segmento caulinar de um centímetro com duas gemas axilares, estabelecido verticalmente em meio WPM, solidificado com Agar 7 g L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 5,8. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados com arranjo fatorial 2 (temperaturas) x 2 (Agentes osmóticos = sacarose e sorbitol) x 4 (concentrações = 15 g L<sup>-1</sup>; 30 g L<sup>-1</sup>; 45 g L<sup>-1</sup> e 60 g L<sup>-1</sup>) com doze repetições. Número de brotações, número de folhas expandidas e comprimento da parte aérea foram avaliados a cada trinta dias por noventa dias. A retomada do crescimento foi mediante transferência das plantas para meio WPM adicionado de 0,5 g L<sup>-1</sup> da auxina AIB (Ácido Indol-butírico). Após trinta dias foram avaliados número de raízes, número de brotações, número de folhas expandidas e comprimento da parte aérea, seguido de aclimatização em substrato comercial SUBRAS®. Para crescimento controlado, concentrações de sacarose entre 30 g L<sup>-1</sup> e 60 g L<sup>-1</sup> a 15 °C, resultaram em efeito deletério à espécie. O sorbitol, independente da concentração utilizada e temperaturas testadas, garantiu o crescimento controlado e a sobrevivência das plantas jovens testadas durante os noventa dias avaliados. Ao final da fase de enraizamento, as plantas apresentaram em média duas brotações bem desenvolvidas e entre duas a cinco raízes. Os tratamentos transferidos para a aclimatização apresentaram excelente percentual de sobrevivência. O meio WPM adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sorbitol a 25 °C, demonstrou-se o mais interessante para o crescimento controlado *in vitro* de *Croton lechleri*. A sacarose e o sorbitol na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> a 15 °C também são viáveis para o crescimento controlado *in vitro* da espécie. Concentrações de sacarose superiores a 30 g L<sup>-1</sup> a 15 °C por 90 dias são deletérias à espécie.

**Palavras-chave:** conservação de germoplasma; agentes osmóticos; crescimento controlado *in vitro*; amplitude térmica.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the effect of temperatures and concentrations of osmotic agents on the *in vitro* growth of *Croton lechleri* Müll Arg. To perform the experiment, it was used explants represented by a one-centimeter shoot segment with two axillary buds, established vertically in WPM medium, solidified with 7 g L<sup>-1</sup> Agar. The pH was adjusted to 5.8. Treatments were arranged in a completely randomized design in a factorial scheme 2 (temperatures) x 2 (osmotic agents = sucrose and sorbitol) x 4 (concentrations = 15 g L<sup>-1</sup>, 30 g L<sup>-1</sup>, 45 g L<sup>-1</sup> and 60 g L<sup>-1</sup>) with twelve replicates. Number of shoots, number of expanded leaves and shoot length were evaluated every 30 days for ninety days. Growth resumption was made by transfer the plants to WPM medium with 0.5 g L<sup>-1</sup> of the auxin indole-butyric acid. After 30 days, the number of roots, shoot number, number of expanded leaves and shoot length were evaluated, followed by acclimatization on commercial substrate SUBRAS®. For controlled growth, concentrations of sucrose between 30 g L<sup>-1</sup> and 60 g L<sup>-1</sup> at 15 °C resulted in deleterious effects on the species. Sorbitol, regardless of the concentration and temperatures, ensured the controlled growth and survival of the young plants tested during the ninety days. At the end of the rooting stage, the plants showed two well-developed shoots on average and around two and five roots. The treatments transferred to acclimatization showed high survival percentage. WPM medium with 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol at 25 °C was shown to be the most interesting for *in vitro* controlled growth of *Croton lechleri*. Sucrose and sorbitol at 15 g L<sup>-1</sup> concentration and 15 °C are also practicable for *in vitro* controlled growth of the species. Concentrations of sucrose greater than 30 g L<sup>-1</sup> at 15 °C for 90 days are deleterious to the species.

**Keywords:** germplasm conservation; osmotic agents; *in vitro* controlled growth; thermal amplitude.

## 1 INTRODUÇÃO

A micropropagação é uma técnica da biotecnologia vegetal que apresenta vantagens quando comparada aos métodos tradicionais de multiplicação e preservação de recursos genéticos. O cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos possibilita a multiplicação clonal massal de matrizes selecionadas em condições assépticas e menor espaço físico, limpeza clonal, conservação e intercâmbio de germoplasma, além de garantir a perpetuação de espécies com dificuldades de germinação ou que correm risco de extinção (ENGELMANN, 2011; OLIVEIRA et al., 2013). Apesar de ser uma estratégia promissora, culturas micropropagadas necessitam de contínuas transferências para meio fresco, com dependência de mão-de-obra especializada e gastos de recursos (TREJGELL et al., 2015), além de aumentar os riscos de contaminação (LAMBARDI; OZUDOGRU, 2013) e fazer com que as plantas cultivadas percam o vigor (PASA, et al., 2012).

A conservação de plantas *in vitro*, por meio do crescimento lento possibilita a manutenção de grande quantidade de exemplares em espaço reduzido e livre de imprevistos climáticos e ataques de pragas (FARIA et al., 2006). As plantas são mantidas em condições de controles físicos e químicos por tempos prolongados (SOUZA et al., 2009). É uma técnica que vem ganhando visibilidade na implantação de bancos ativos de germoplasma de numerosas espécies (SAN JOSÉ, et al., 2015) por ter se mostrado tão promissora.

Os principais métodos de conservação utilizam a adição de reguladores osmóticos ao meio de cultura e diminuição da temperatura (VIEIRA et al., 2012). São geralmente utilizados como reguladores a sacarose, o manitol, sorbitol, que agem no meio de cultura modificando o potencial hídrico e gradiente osmótico (ARRIGONI-BLANK et al., 2014; SILVA, et al., 2016). Esses reguladores possuem efeito significativo no crescimento e resposta fisiológica das plantas *in vitro* (FLORES et al., 2013), no entanto, as concentrações dos reguladores no meio de cultura devem ser de acordo com as necessidades de cada espécie estudada (RIBEIRO et al., 2011). A utilização de temperaturas mais baixas e diminuição da intensidade da luz em combinação com os agentes osmóticos também são ótimas opções, pois agem na redução do metabolismo (LÉDO et al., 2007; LIMA-BRITO et al., 2011; SARASAN et al., 2006).

Protocolos de conservação *in vitro* só são considerados eficientes se as etapas de recuperação do crescimento e multiplicação forem bem estabelecidas. Meios básicos com menores concentrações de sais como o WPM podem ser favoráveis ao enraizamento adventício de plantas (ALOUFA, 2003). Algumas espécies lenhosas apresentam dificuldades nesse processo, inerentes à presença ou ausência de auxinas, que são suplementadas ao meio como forma de controlar o balanço hormonal das plantas (PASA, et al., 2012).

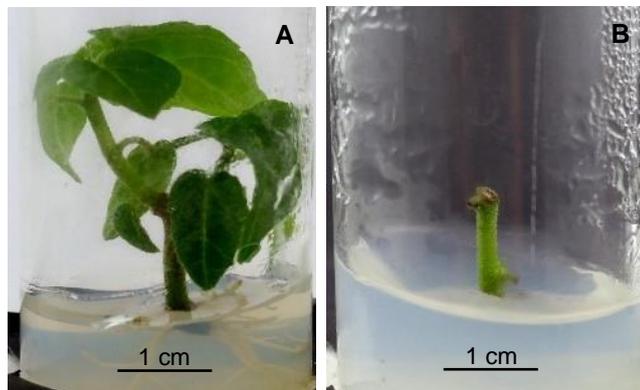
O Sangue de grado (*Croton lechleri* Müll Arg.), é uma espécie nativa, encontrada em alguns países da América latina e tem sua seiva usada por indígenas e ribeirinhos para tratar diversas enfermidades (DE MARINO et al., 2008). Apesar de sua importância histórica relativa a etnomedicina, existem poucos estudos referentes à espécie. Esses são, no geral, direcionados ao potencial mutagênico e aplicação da seiva (CAMPOS, 2009; MONTOPOLI et al., 2012; ROSSI, et al., 2013). Ainda não foram estudadas formas de conservação para a espécie. Fato que motivou este estudo, uma vez que o aumento da busca por produtos de origem vegetal pela indústria farmacêutica surge como forte ameaça às plantas medicinais (CAMILLO et al., 2009).

As pequenas populações encontradas principalmente em Rondônia e no Acre, enfrentam a extração incorreta do látex, a eliminação de espécimes pela competição com a agricultura familiar e agropecuária (OSAKADA; YUYAMA, 2008). O estabelecimento de metodologias de crescimento controlado *in vitro* para o Sangue de grado é necessário, como forma alternativa e complementar à conservação de germoplasma. Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar a manutenção do *Croton lechleri* em condições de crescimento controlado *in vitro* sob o efeito de sacarose e sorbitol e temperaturas de cultivo. Pensou-se nesse experimento pelo pressuposto de que a sacarose e poliálcoois como o sorbitol, quando adicionados ao meio de cultura, atuam externamente removendo o excesso da água intracelular por gradiente osmótico, reduzindo assim o crescimento das plantas jovens (Dumet et al., 1993).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Após o crescimento e desenvolvimento, as plantas com altura medindo entre 2 cm e 3 cm (Figura 1), foram submetidas a três subcultivos com intervalos de 35 dias em meio de multiplicação. A cada subcultivo, as estacas foram estabelecidas em tubo de ensaio (150 mm x 25 mm) com tampa plástica contendo 10 mL de meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e solidificado com Agar 7 g L<sup>-1</sup>. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e esterilizado em autoclave a 121 °C, sob pressão de 1 atm. por 15 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de cultivo *in vitro* a 25 °C e 16 horas de fotoperíodo (fornecido por um par de lâmpadas fluorescentes tubulares). Os subcultivos foram realizados como parte do processo para obter a quantidade de explantes suficientes para a implantação dos experimentos.

Figura 1 - Crescimento controlado de Sangue de grado. (A) planta jovem (B) explante estabelecido a partir da planta jovem.



### 2.1 Diferentes concentrações de sacarose e sorbitol sob duas temperaturas de cultivo no crescimento controlado *in vitro* de microestacas de Sangue de grado.

Os explantes foram representados por um segmento caulinar com uma a duas gemas axilares, medindo aproximadamente um centímetro (Figura 1 - B), estabelecido verticalmente em meio WPM (*Woody Plant Medium*), pH 5,8, Agar 7 g L<sup>-1</sup> e adicionado o agente osmótico (tabelas 1). A temperatura de 25 °C foi representada por uma sala de cultivo artificial com 16 horas de fotoperíodo. Para 15 °C foi utilizada uma estufa com 12 horas de fotoperíodo. A diferença entre os fotoperíodos se deu pela mudança de

ambiente e não há interferência no experimento, uma vez que esta característica não entrou como fator no experimento. O meio nutritivo WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981), tem sido bastante usado em espécies lenhosas por se tratar de um meio que possui redução de 75% de nitrato e amônia com relação ao MS e altos teores de íons de sulfato (QUISEN; ANGELO, 2014).

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados com arranjo fatorial 2 x 2 x 4 (duas temperaturas, dois agentes osmóticos e quatro concentrações de cada agente osmótico), com doze repetições representadas por um tubo de ensaio com um explante, totalizando 192 unidades experimentais (Tabela 1).

As avaliações ocorreram aos 30, 60 e 90 dias do estabelecimento. Foi avaliado o percentual de sobrevivência e as seguintes Características respostas: número de brotações; número de folhas expandidas; e comprimento da parte aérea medida até a inserção da última folha. Decorrido os 90 dias, as plantas sobreviventes foram transferidas para meio fresco igual aos utilizados nos subcultivos para obtenção de material e após 30 dias as mesmas foram avaliadas e aclimatizadas.

## 2.2 Enraizamento

Decorrido o período de avaliação para crescimento controlado *in vitro*, as plantas foram transferidas para meio fresco: WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), solidificado com Agar 7 g L<sup>-1</sup>, suplementado com sacarose 30 g L<sup>-1</sup>. Adicionado de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido Indol-butírico (AIB), dispostas em delineamento inteiramente casualizados.

Após 30 dias foram avaliadas as Características: sobrevivência; número de raízes; número de brotações; número de folhas expandidas; e comprimento da parte aérea, afim de saber qual dos açúcares são eficientes na redução do crescimento para a espécie. Uma vez que essa eficiência só pode ser confirmada se a etapa de recuperação tiver sucesso.

## 2.3 Aclimatização

Decorridos 30 dias após a transferência para meio fresco de enraizamento, as plantas foram avaliadas quanto a sobrevivência, submetidas a lavagem e acondicionadas em copos plásticos descartáveis, transparentes, contendo substrato comercial SUBRAS®. Após a transferência para o substrato, as plantas foram

mantidas por 28 dias na sala de cultivo do Laboratório em delineamento inteiramente casualizado, nas mesmas condições do cultivo *in vitro* e após esse período, foram transferidas para casa de vegetação em cobertura de polietileno transparente, sombreadas com sombrite para aclimatização nas condições de luminosidade natural. Após 60 dias foi avaliado a sobrevivência.

Tabela 1 – Esquema do ensaio fatorial de temperaturas de cultivo em °C (T.C.) e concentrações de Agentes Osmóticos (A.O.) no crescimento controlado *in vitro* de Sangue de grado.

| Tratamentos | T.C.  | A.O.     | Concentração         |
|-------------|-------|----------|----------------------|
| T1          | 25 °C | Sacarose | 15 g L <sup>-1</sup> |
| T2          | 25 °C | Sacarose | 30 g L <sup>-1</sup> |
| T3          | 25 °C | Sacarose | 45 g L <sup>-1</sup> |
| T4          | 25 °C | Sacarose | 60 g L <sup>-1</sup> |
| T5          | 25 °C | Sorbitol | 15 g L <sup>-1</sup> |
| T6          | 25 °C | Sorbitol | 30 g L <sup>-1</sup> |
| T7          | 25 °C | Sorbitol | 45 g L <sup>-1</sup> |
| T8          | 25 °C | Sorbitol | 60 g L <sup>-1</sup> |
| T9          | 15°C  | Sacarose | 15 g L <sup>-1</sup> |
| T10         | 15°C  | Sacarose | 30 g L <sup>-1</sup> |
| T11         | 15°C  | Sacarose | 45 g L <sup>-1</sup> |
| T12         | 15°C  | Sacarose | 60 g L <sup>-1</sup> |
| T13         | 15°C  | Sorbitol | 15 g L <sup>-1</sup> |
| T14         | 15°C  | Sorbitol | 30 g L <sup>-1</sup> |
| T15         | 15°C  | Sorbitol | 45 g L <sup>-1</sup> |
| T16         | 15°C  | Sorbitol | 60 g L <sup>-1</sup> |

#### 2.4 Análise estatística das características

Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) para testar a normalidade dos resíduos da ANOVA e Bartlett (1937), para testar a homogeneidade entre as variâncias ambos com significância de 0,01 (Apêndices D - H). As características que não apresentaram normalidade e/ou homogeneidade dos erros foram submetidas à transformação dos dados. Uma vez que essas suposições foram aceitas, foi realizada a análise de variância pelo o teste

de Tukey (TUKEY, 1949) a 0,05 de significância para estudar o efeito isolado de cada fator ou tratamento e a interação entre os mesmos.

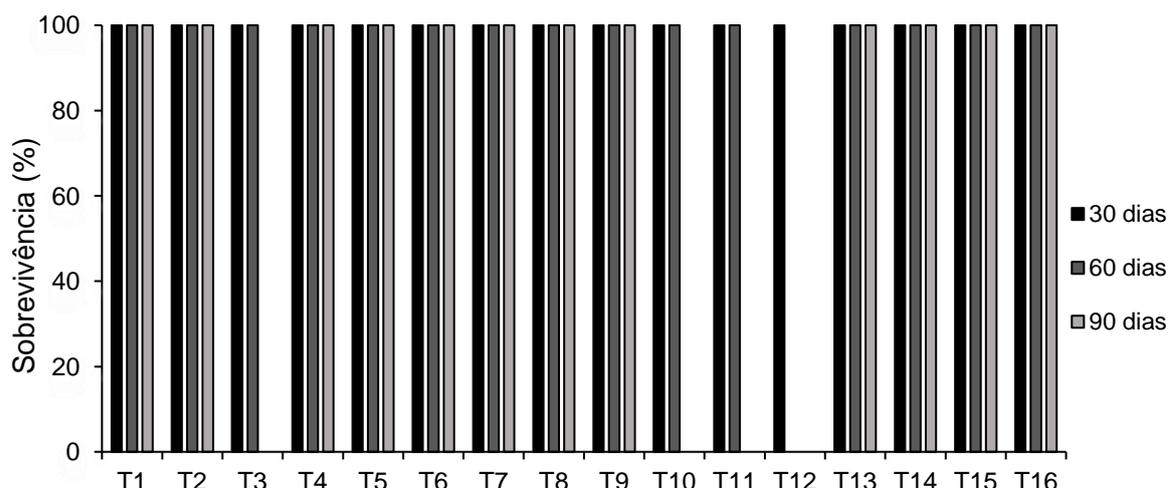
Quando ocorrido perdas de tratamentos, a ANAVA ficou impossibilitada da realização em arranjo fatorial, passou-se então a usar apenas o DIC simples. Quando na regressão, não houveram modelos clássicos lineares ou quadráticos que pudessem explicar a variação dos dados, estes foram ocultados da discussão (APÊNDICE E).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sobrevivência das plantas jovens de Sangue de grado mantidas em crescimento controlado por 90 dias foi influenciada pelos efeitos dos tratamentos (Figura 2). Microestacas estabelecidas em meio enriquecido com concentrações entre 30 g L<sup>-1</sup> e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose a 15 °C não resistiram a esse período. Por outro lado, 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose na mesma temperatura demonstrou-se excelente na redução do crescimento. A redução da quantidade desse açúcar proporcionou resultados similares em *Manihot esculenta* Crantz (MACIA, 2011). Autores como Lédo et al. (2007) e Sá et al. (2010) relataram o efeito tóxico de altas concentrações de agentes osmóticos em conservação de plantas.

Aos trinta dias, todos os tratamentos resistiram aos fatores avaliados com cem por cento de sobrevivência (Figura 2). O sorbitol, independente da concentração utilizada e temperaturas testadas, garantiu a redução do crescimento e a sobrevivência de todas as plantas jovens testadas durante os noventa dias de avaliação (Figura 2). Experimento de conservação *in vitro* utilizando sorbitol apresentou resultado similar para *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) (FLORES et al., 2013).

Figura 2 - Sobrevivência de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro* em duas temperaturas e concentrações de sacarose e sorbitol.



T1 - Sacarose (15 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T2 - Sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T3 - Sacarose (45 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T4 - Sacarose (60 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T5 - Sorbitol (15 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T6 - Sorbitol (30 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T7 - Sorbitol (45 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T8 - Sorbitol (60 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T9 - Sacarose (15 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T10 - Sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T11 - Sacarose (45 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T12 - Sacarose (60 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T13 - Sorbitol (15 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T14 - Sorbitol (30 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T15 - Sorbitol (45 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T16 - Sorbitol (60 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C.

Mesmo que a sobrevivência dos explantes durante o período de observação para crescimento controlado tenha sido excelente, não foi garantia de sucesso para todos, pois alguns tratamentos adicionados de sorbitol apresentaram bons resultados na redução do crescimento aos noventa dias (T5, T7 e T16), no entanto, não resistiram à fase de retomada do crescimento. Isso porque o sorbitol é um poliálcool que geralmente não é metabolizado pelas plantas (GEORGE, 1993), apenas interfere na absorção de nutrientes por meio de estresse hídrico (PIRES, 2017). Da mesma forma que outros tratamentos, não apresentaram os melhores resultados como inibidor de crescimento para todas as características avaliadas, mas, foram excelentes na retomada do crescimento (T9 e T13).

É provável que esta seja a primeira pesquisa envolvendo o crescimento controlado *in vitro* da espécie e futuramente poderá servir como base para outros estudos que visem a conservação *in vitro* de germoplasma de *Croton lechleri*. No entanto, a pesquisa não contribuiu para concentrações de sacarose e sorbitol menores que 15 g L<sup>-1</sup> e/ou maiores que 60 g L<sup>-1</sup>. Vale ainda ressaltar que alguns dos tratamentos não resistiram aos fatores testados, como exemplo, a adição da sacarose entre 30 g L<sup>-1</sup> e 60 g L<sup>-1</sup> a 15 °C.

### 3.1 Avaliação aos trinta dias de crescimento controlado

Não foi constatado efeito significativo da interação tripla entre os fatores temperatura de cultivo, agentes osmóticos (sacarose e sorbitol) e as concentrações para nenhuma variável aos trinta dias de crescimento controlado *in vitro* de Sangue de grado (Apêndice E). No entanto, ocorreram interações duplas entre todos os fatores para algumas características observadas, demonstrando que a conservação de plantas *in vitro* pode sim ser influenciada por fatores químicos e físicos e enfatiza a importância citada por Sarkar e Naik (1998) de testar esses fatores conjuntamente.

Explantes estabelecidos em meio enriquecido com sorbitol, independente da concentração, apresentaram menor quantidade de brotações. Isso provavelmente porque se trate de um poliálcool que não é usualmente metabolizado pelas plantas. Atua frequentemente na modificação do potencial osmótico do meio de cultura (GEORGE, 1993). Não houve efeito significativo para as concentrações dos osmorreguladores, tão pouco para a temperatura. Foi constatado maior número de brotações nos explantes estabelecidos em meio enriquecido com sacarose (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias do número de brotações (NB) avaliada aos 30 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro* sob dois agentes osmóticos.

| Agente osmótico | NB     |
|-----------------|--------|
| Sacarose        | 1,52 b |
| Sorbitol        | 1,17 a |

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

2. Análise de variância no APÊNDICE E

O número de folhas expandidas foi influenciado tanto pela temperatura de cultivo quanto pelo osmorregulador. Plantas mantidas a 15 °C, independente do agente osmótico mantiveram o menor número de folhas. Assim como, o sorbitol como osmorregulador, independente da temperatura manteve a redução das folhas das plantas em 30 dias (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias do número de folhas expandidas (NFE) avaliada aos 30 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro* sob dois agentes osmóticos e duas temperaturas.

| Agente osmótico | Temperatura de cultivo |         |
|-----------------|------------------------|---------|
|                 | 25 °C                  | 15 °C   |
| Sacarose        | 4,13 bB                | 1,29 aA |
| Sorbitol        | 2,17 aA                | 0,79 aA |

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra, (letra maiúscula na linha e minúscula na coluna), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

2. Análise de variância no APÊNDICE E

Houve interação entre agente osmótico e temperatura para o comprimento da parte aérea, demonstrando que a redução do crescimento de plantas pode ser influenciada tanto por fatores físicos quanto químicos. Plantas mantidas em 15 °C tiveram seu crescimento reduzido independente do osmorregulador. A redução do crescimento de plantas a partir da modificação da temperatura do ambiente foi observada por Lima-Brito et al. (2011) na conservação de *Syngonanthus mucugensis* Giul. e por Silva e Scherwinski-Pereira (2011) na conservação de *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* C.

O sorbitol, independente da temperatura de cultivo reduziu o comprimento da parte aérea de plantas de Sangue de grado (Tabela 4). Esse poliálcool, foi também o

melhor regulador de crescimento na conservação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes (SANTOS, 2010).

Tabela 4 - Médias do comprimento da parte aérea (CPA) avaliada aos 30 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro* sob dois agentes osmóticos e duas temperaturas.

| Agente osmótico | Temperatura de cultivo |         |
|-----------------|------------------------|---------|
|                 | 25 °C                  | 15 °C   |
| Sacarose        | 2,14 bB                | 1,29 aA |
| Sorbitol        | 1,21 aA                | 1,14 aA |

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra (letra maiúscula na linha e minúscula na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

2. Análise de variância no APÊNDICE E

### 3.2 Avaliação aos sessenta dias de crescimento controlado

A Sacarose a 25 °C proporcionou maior desenvolvimento às plantas, expresso pelo aumento no número de folhas e comprimento da parte aérea (Figura 3), por ser uma fonte de carbono importante para o desenvolvimento de plantas *in vitro* (MARCIA, 2011), pois favorece o consumo dos nutrientes pela planta (SANTOS et al., 2012). Resultado observado também por Ribeiro et al. (2011) ao testar concentrações de sacarose em meio de cultura para avaliação da taxa de crescimento de *Manihot esculenta* (Crantz). Já em temperatura reduzida a 15 °C, houve redução do comprimento da parte aérea, no entanto a concentração de 60 g L<sup>-1</sup> (Tratamento 12) foi letal para as plantas. (Tabela 5).

Plantas mantidas em meio enriquecido com sorbitol, independente das concentrações e temperaturas, promoveram o menor comprimento da parte aérea. Esse resultado leva a acreditar que o sorbitol seja o melhor inibidor de crescimento de Sangue de grado em sessenta dias. Resultado similar com o sorbitol da conservação de mangabeira foi encontrado por Pires (2017). Diminuição no número de brotações com sorbitol a 20 g L<sup>-1</sup> e 40 g L<sup>-1</sup> também foi observado em *Passiflora giberti* N. E. Brown por Faria et al. (2006). As plantas acondicionadas em estufa de fotoperíodo a 15 °C demonstraram o menor crescimento e desenvolvimento para todas as características avaliadas.

Tabela 5 - Número de brotações (NB); Número de folhas expandidas (NFE) e Comprimento da parte aérea (CPA) avaliados aos 60 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro*.

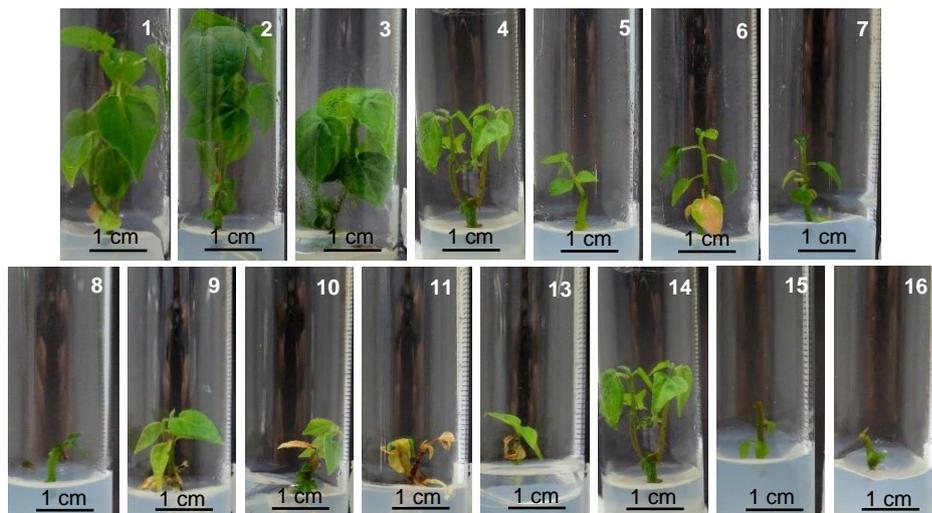
| Tratamentos | NB      | NFE        | CPA    |
|-------------|---------|------------|--------|
| T1          | 1,50 ab | 4,92 g     | 3,08 b |
| T2          | 1,67 ab | 4,33 fg    | 3,38 b |
| T3          | 1,42 ab | 3,42 efg   | 3,42 b |
| T4          | 1,50 ab | 3,25 defg  | 3,00 b |
| T5          | 1,33 ab | 3,08 cdef  | 1,62 a |
| T6          | 1,42 ab | 3,25 cdef  | 1,50 a |
| T7          | 1,33 ab | 2,58 bcde  | 1,33 a |
| T8          | 1,92 ab | 1,50 abc   | 1,28 a |
| T9          | 2,25 b  | 2,83 bcdef | 1,43 a |
| T10         | 1,75 ab | 1,83 abcde | 1,40 a |
| T11         | 1,92 ab | 1,50 abc   | 1,51 a |
| T12         | *       | *          | *      |
| T13         | 1,17 a  | 1,75 abcde | 1,32 a |
| T14         | 1,25 ab | 1,67 abcd  | 1,23 a |
| T15         | 1,42 ab | 1,17 ab    | 1,26 a |
| T16         | 1,00 a  | 0,83 a     | 1,26 a |

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

2. Análise de variância no APÊNDICE F

\* Não avaliados estatisticamente por morrerem.

Figura 3 - Sangue de grado aos 60 dias de crescimento controlado *in vitro* em sacarose e sorbitol (Tratamentos sobreviventes).



T1 - Sacarose (15 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T2 - Sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T3 - Sacarose (45 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T4 - Sacarose (60 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T5 - Sorbitol (15 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T6 - Sorbitol (30 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T7 - Sorbitol (45 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T8 - Sorbitol (60 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T9 - Sacarose (15 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T10 - Sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T11 - Sacarose (45 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T13 - Sorbitol (15 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T14 - Sorbitol (30 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T15 - Sorbitol (45 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T16 - Sorbitol (60 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C.

### 3.3 Avaliação aos noventa dias de crescimento controlado

Aos noventa dias de avaliação, não houve efeito significativo para o número de brotações (NB) de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro* (Apêndice G), foi observado em média duas brotações por planta, demonstrando que as concentrações de agentes osmóticos e redução de temperatura não são fatores limitantes para essa característica da espécie (Apêndice G). Plantas mantidas em meio enriquecido com sorbitol, independente da concentração de agente osmótico, temperatura e luminosidade apresentaram menores taxas de crescimento (Tabela 6). Resultado similar foi observado com *Pfaffia tuberosa* Spreng, em estudo realizado por Flores et al. (2013).

O meio adicionado com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose a 15 °C também se demonstrou excelente na redução do crescimento de *Croton lechleri*. (Tabela 6). Isso porque manteve o crescimento reduzido, mas garantiu quantidade de folhas suficiente para a regeneração da planta. Essa observação mencionada por Vieira et al. (2012), em estudo do efeito do sorbitol na conservação *in vitro* de *Manihot esculenta* Crantz. As demais concentrações de sacarose em 15 °C, não resistiram ao período de 90 dias.

As plantas que mais cresceram e apresentaram maior quantidade de folhas expandidas foram as estabelecidas em meio de cultura enriquecido com sacarose e mantidas a 25 °C (Figura 4), isso provavelmente porque se trata de um carboidrato de fácil assimilação para fornecimento de energia (KRISHNA et al., 2016) e, dependendo da concentração, tem efeitos diretamente relacionados ao crescimento da planta (ROCHA, 2005). Efeitos similares envolvendo sacarose e o desenvolvimento de plantas foram encontrados por Santos et al. (2011) e Pires (2017) em segmentos nodais de mangabeira.

Faria et al. (2006), observaram que é possível conservar microplantas de maracujazeiro (*Passiflora giberti* N. e. Brown) pelo período de quatro meses em meio de cultura MS suplementado com 10 ou 20 g. L<sup>-1</sup> de sorbitol em temperatura de 27 °C. Em experimentos com *Manihot esculenta* Crantz, Vieira et al. (2012) constataram que a ausência de sacarose reduz o crescimento das plantas. A concentração de 5 g. L<sup>-1</sup> de sorbitol em ausência de sacarose foi a mais eficiente para a conservação do acesso avaliado por seis meses (180 dias) para a espécie citada.

Tabela 6 - Número de folhas expandidas (NFE) e Comprimento da parte aérea (CPA) avaliados aos 90 dias, de plantas de Sangue de grade submetidas ao crescimento controlado *in vitro*.

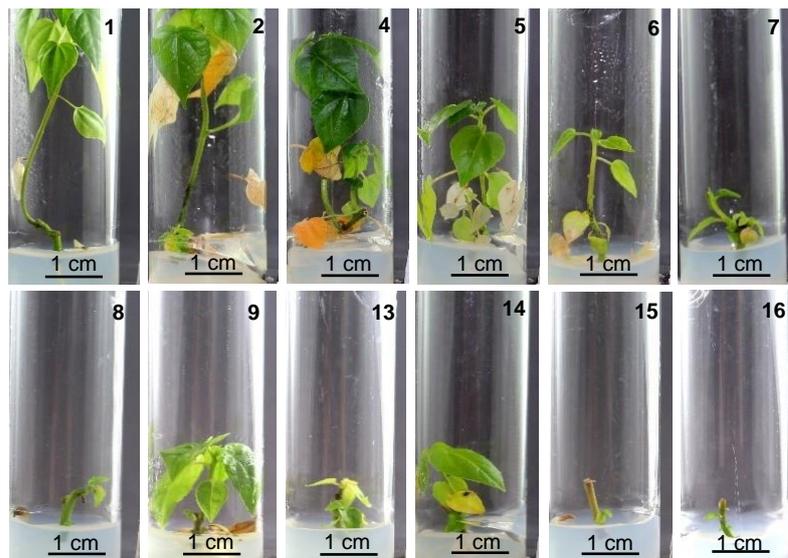
| Tratamentos | NFE       | CPA    |
|-------------|-----------|--------|
| T1          | 3,92 d    | 3,83 b |
| T2          | 3,83 d    | 3,71 b |
| T3          | *         | *      |
| T4          | 2,33 abcd | 3,54 b |
| T5          | 3,00 cd   | 2,01 a |
| T6          | 2,75 bcd  | 1,82 a |
| T7          | 2,42 abcd | 1,40 a |
| T8          | 1,67 abc  | 1,29 a |
| T9          | 2,75 bcd  | 1,83 a |
| T10         | *         | *      |
| T11         | *         | *      |
| T12         | *         | *      |
| T13         | 2,08 abc  | 1,49 a |
| T14         | 1,83 abc  | 1,33 a |
| T15         | 1,20 ab   | 1,38 a |
| T16         | 0,82 a    | 1,37 a |

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

2. Análise de variância no APÊNDICE G

\* Não avaliados estatisticamente por morrerem.

Figura 4 - Sangue de grado aos 90 dias de crescimento controlado *in vitro* em sacarose e sorbitol (Tratamentos sobreviventes).



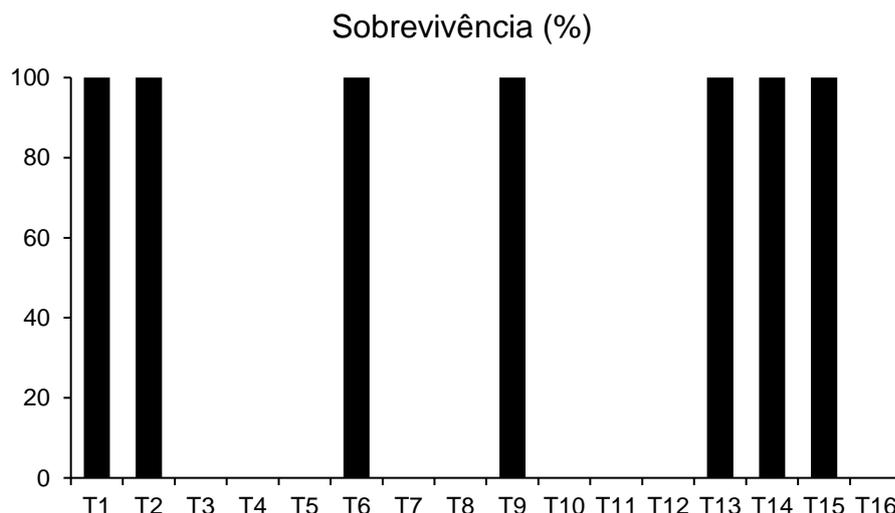
T1 - Sacarose (15 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T2 - Sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T4 - Sacarose (60 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T5 - Sorbitol (15 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T6 - Sorbitol (30 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T7 - Sorbitol (45 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T8 - Sorbitol (60 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T9 - Sacarose (15 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T13 - Sorbitol (15 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T14 - Sorbitol (30 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T15 - Sorbitol (45 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T16 - Sorbitol (60 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C.

### 3.4 Enraizamento

Dos doze tratamentos submetidos ao processo de enraizamento, sete responderam de forma positiva com 100% de sobrevivência (Figura 5). Vale ressaltar que os tratamentos no qual houveram morte para a maioria das repetições do tratamento ou mesmo que não responderam à fase de enraizamento, foram retirados da ANOVA, uma vez que já são considerados ineficientes para o crescimento controlado da espécie. Plantas de Sangue de grado sem raízes não respondem ao processo de aclimatização (dados não publicados), isso porque o estresse osmótico causado pelos carboidratos adicionados ao meio de cultura, podem ainda influenciar nas respostas fisiológicas das plantas (SILVA; SHERWINSKI-PEREIRA, 2011).

Plantas estabelecidas em meio de cultura adicionado com concentrações de sacarose acima de 30 g. L<sup>-1</sup> não resistiram à fase de enraizamento (Tabela 7), isso provavelmente por que o aumento da concentração desse carboidrato no meio prejudica a absorção de água e nutrientes pela planta jovem, ocasionado pela diminuição do potencial hídrico, podendo, no entanto, reduzir o crescimento (LÉDO et al., 2007) e em alguns casos levar à morte.

Figura 5 - Sobrevivência de plantas de Sangue de grado submetidas ao enraizamento *in vitro* após processo de crescimento controlado.



T1 - Sacarose (15 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T2 - Sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T3 - Sacarose (45 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T4 - Sacarose (60 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T5 - Sorbitol (15 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T6 - Sorbitol (30 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T7 - Sorbitol (45 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T8 - Sorbitol (60 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T9 - Sacarose (15 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T10 - Sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T11 - Sacarose (45 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T12 - Sacarose (60 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T13 - Sorbitol (15 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T14 - Sorbitol (30 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T15 - Sorbitol (45 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T16 - Sorbitol (60 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C.

O ácido Indol-butírico (AIB) é uma das auxinas mais utilizadas para o enraizamento *in vitro* (SOUZA; PEREIRA, 2007), e se demonstrou eficiente na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup> para o enraizamento de Sangue de grado. A concentração do fitorregulador foi confirmada com o estudo realizado por Fermino-Junior e Scherwinski-Pereira (2012) para enraizamento *in vitro* de *Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith. Em propagação *Rubus* spp. 'Xavante', o meio WPM, adicionado de concentrações menores que 3 µM de AIB, induziram maiores médias de enraizamento (LEITZKE, et al., 2009).

Plantas submetidas ao crescimento controlado *in vitro* em meio enriquecido com sorbitol, representaram maior quantidade de tratamentos que resistiu a retomada do crescimento (Tabela 7). Além de ter apresentado maiores comprimentos da parte aérea em relação ao final do período de crescimento controlado (Figura 6).

A análise de variância não apresentou significância para o número de brotações, tão pouco para o número de raízes (Apêndice I). As Plantas, ao final da fase de enraizamento, apresentaram em média duas brotações bem desenvolvidas e de duas a cinco raízes bem desenvolvidas, medindo aproximadamente 2 cm (Figura 7-A).

Maior comprimento da parte aérea foi observado em plantas mantidas por noventa dias em meio enriquecido com sacarose nas concentrações 15 g L<sup>-1</sup> e 30 g L<sup>-1</sup> e sorbitol a 30 g L<sup>-1</sup> ambos os agentes osmóticos em temperatura a 25 °C (Tabela 7). No entanto, vale ressaltar que a sacarose nas condições citadas não inibiu o crescimento. O contrário do ocorrido com plantas mantidas em meio adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sorbitol em 25 °C, que aos 90 dias de crescimento controlado ficou entre o melhor agrupamento de média para redução do crescimento e na fase de enraizamento e retomada de crescimento ficou entre os melhores com mais significativo aumento do comprimento da parte aérea das plantas (Figura 7).

Os tratamentos nove e treze formados por sacarose e sorbitol respectivamente, na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> e temperatura a 15 °C, tanto apresentaram redução do crescimento na fase anterior quanto uma excelente retomada do crescimento, com presença de raízes, brotações com os melhores números de folhas expandidas e bom comprimento da parte aérea (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) avaliados após o processo de enraizamento *in vitro* de plantas de Sangue de grado.

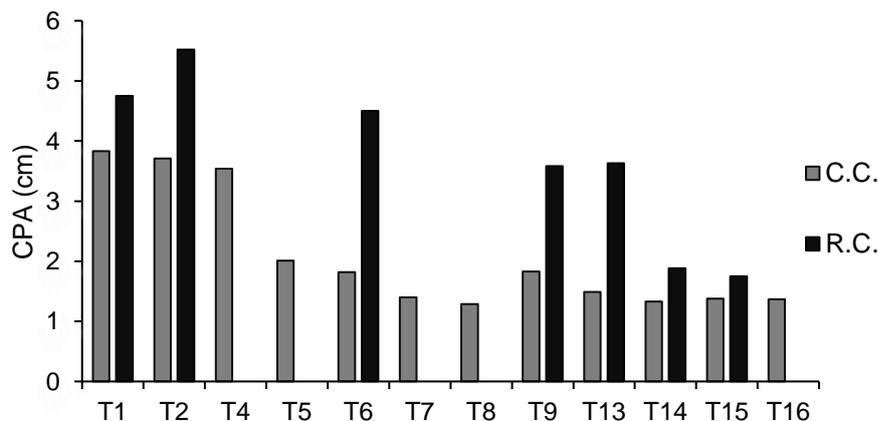
| Tratamentos | NFE     | CPA     |
|-------------|---------|---------|
| T1          | 3,33 b  | 4,75 ab |
| T2          | 3,33 b  | 5,52 a  |
| T3          | *       | *       |
| T4          | *       | *       |
| T5          | *       | *       |
| T6          | 3,92 b  | 4,50 ab |
| T7          | *       | *       |
| T8          | *       | *       |
| T9          | 6,83 a  | 3,58 b  |
| T10         | *       | *       |
| T11         | *       | *       |
| T12         | *       | *       |
| T13         | 5,08 ab | 3,63 b  |
| T14         | 4,50 ab | 1,88 c  |
| T15         | 3,92 b  | 1,75 c  |
| T16         | *       | *       |

Notas: 1. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

2. Análise de variância no APÊNDICE I.

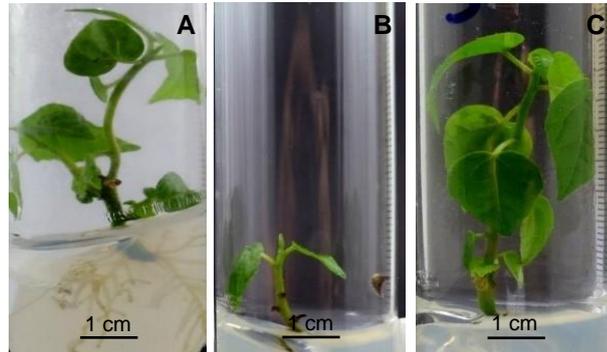
\* Não avaliados estatisticamente por morrerem.

Figura 6 - Comprimento da parte aérea (CPA) de plantas de Sangue de grado (R.C.) retomada do crescimento; (C.C.) crescimento controlado.



T1 - Sacarose (15 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T2 - Sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T4 - Sacarose (60 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T5 - Sorbitol (15 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T6 - Sorbitol (30 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T7 - Sorbitol (45 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T8 - Sorbitol (60 g L<sup>-1</sup>) em 25 °C; T9 - Sacarose (15 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T13 - Sorbitol (15 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T14 - Sorbitol (30 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T15 - Sorbitol (45 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C; T16 - Sorbitol (60 g L<sup>-1</sup>) em 15 °C.

Figura 7 - Enraizamento *in vitro* de Sangue de grado (A) planta enraizada (B) planta com menor comprimento da parte aérea (C) planta com maior comprimento.



### 3.5 Aclimatização

Foi observado a sobrevivência de 100% das plantas jovens transferidas para a aclimatização, no entanto, não foi realizado ANAVA para comparação entre as médias dos tratamentos (Figura 8). Sendo assim, é necessário a realização de estudos mais aprofundados sobre a aclimatização da espécie.

Segundo Horbach et al, (2010), a aclimatização é um fator limitante para maioria das espécies micropropagadas, devido à alta taxa de mortalidade. Nesta etapa, a presença de raiz é imprescindível para a obtenção de plantas vigorosas e resistentes às mudanças de ambiente (OLIVEIRA, 2011). De acordo com Silva et al. (2008) e Sungkumlong e Deb (2009) a presença de raízes nas plantas está diretamente relacionado ao sucesso na aclimatização de plantas cultivadas *in vitro*.

#### 4 CONCLUSÕES

A partir do trabalho realizado é possível concluir que meio WPM adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sorbitol a 25 °C, é o mais interessante para o crescimento controlado *in vitro* de Sangue de grado.

Tanto a sacarose quanto o sorbitol na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> a 15 °C também são viáveis para o crescimento controlado *in vitro* de plantas jovens de Sangue de grado.

A espécie não resiste a concentrações superiores a 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose em temperatura de 15 °C por noventa dias.

## REFERÊNCIAS

- ALOUFA, M. A. I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, 2003. p. 3-5.
- ARRIGONI-BLAANK, M. de F.; TAVARES, F. F.; BLANK, A. F.; SANTOS, M. C. dos; MENEZES, T. S. A.; SANTANA, A. D. D. de. *In vitro* conservaton of sweet potato genotypes. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 1, p. 1-7, 2014.
- CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 12, n. 2, p. 184-189, abr./jun. 2009.
- CAMPOS, M. S. **Avaliação da biocompatibilidade da seiva do *Croton lechleri* (Sangue de dragão) em tecido subcutâneo de ratos.** 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.
- DE MARINO, S.; GALA, F.; ZOLLO, F.; VITALINI, S.; FICO, G.; VISIOLI, F.; IORIZZI, M. Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. **Molecules**, Basel, v. 13, n. 6, p. 1219-1229, Jun. 2008.
- DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, London, n. 14, p. 243-250, 1993.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plantbiodiversity. **In vitro Cellular and Developmental Biology–Plant**, Columbia v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. de C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 267-270, ago. 2006.
- FERMINO-JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, jan./mar. 2012.
- FLORES, R.; ULIANA, S. C.; PIMENTEL, N.; GARLET, T. M. B. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 4, n. 3, p. 192-199, Aug. 2013.

GEORGE, F. E. The componentes of culture media. In GEORGE, F. E. (ED). **PLant propagation by tissue culture**, London: Exegetics, 1993. p. 273-343.

GEORGE, E. F. (Ed.) **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. – The technology. 2 ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.

GRUBBS, F. E. "Procedures for detecting outlying observations in samples". **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 1-21, Feb. 1969.

HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE, P.; QUADROS, K. M. de; FICK, T. A. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 113-119, jan. 2011.

KRISHNA, H.; ALIZADEH, M.; SINGH, D.; SINGH, U.; CHAUHAN, N.; EFTEKHARI, M.; SADH, R. K. Somaclonal Variations and Their Applications in Horticultural Crops Improvement. **3 Biotech**. v. 6, n. 54, p. 1-18, Jun. 2016.

LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A. Advances in the safe storage of micropropagated woody plants at low temperature. **Acta Horticulturae**, p. 29-42, Apr. 2013.

LÉDO, A. da S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 346-351, out./dez. 2007.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de Amoreira-preta e Framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, jun. 2009.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M. M. S.; ALVIM, B. F. M.; RESENDE, S. V.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. de. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, ago. 2011.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalennia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators Society Combined Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

MACIA, R. J. **Conservação *in vitro* de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2011. 67f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 2011.

MONTOPOLI, M.; BERTIN, Z.; CHEN, Z.; BOLCATO, J.; CAPARROTA, L.; FROLDI, G. *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon câncer HT29 cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 144 p. 747-753, Oct. 2012.

OLIVEIRA, T. G. de. **Micropropagação e Conservação *in vitro* de *Croton antisyphiliticus* Mart.** 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, 2011.

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, out./dez. 2013.

OSAKADA, A.; YUYAMA, K. Propagação vegetativa de Sangue-de-dragão (*croton lechleri* müll. arg.) na Amazônia Central In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 59., 2008, Natal. **Anais...** Natal: Sociedade Botânica do Brasil, 2008. p. 91.

PASA, M. da S.; CARVALHO, G. L.; SCHUCH, M. W.; SCHMITZ, J. D.; TORCHELSEN, M. de M.; NICKEL, G. K.; SOMMER, L. R.; LIMA, T. S.; CAMARGO, S. S. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, ago. 2012.

PEIXOTO, A. P. B.; FARIA, G. A.; MORAIS, A. R. de. Modelos de regressão com platô na estimativa do tamanho de parcelas em experimento de conservação *in vitro* de maracujazeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1907-1913, nov. 2011.

PIRES, D. C. M. **Conservação *in vitro* por crescimento lento de Mangabeira do Cerrado (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2017. 56 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. da S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia ocidental**. Manaus: Embrapa, 2008. 44 p. (Documentos 61). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc>. Acesso em 25 maio. 2017.

REIBEIRO, E. B.; ALVES, K. A.; IZZO-NETO, A.; ANDRADE, L. F.; DURÃES, N. N. L.; SILVEIRA, E. K. C. P.; LONDE, L. N.; SOUZA, A. da S. Efeito de concentrações de sacarose e de meio de cultura (8S) sobre a taxa de crescimento de mandioca Olho roxo (BMG 0036) conservadas *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2011, Búzios. **Anais...** Búzios: Sociedade Brasileira de Melhoramento de plantas, 2011. P. 1-4.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose e sacarose na micropropagação da bananeira Prata Anã: alterações morfoanatómicas**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 2005.

ROSSI, D.; GUERRINI, A.; PAGANETTO, G.; BERNACCHIA, G.; CONFORTI, F.; STATTI, G.; MAIETTI, S.; POPPI, I.; TACCHINI, M.; SACCHETTI, G. Croton lechleri Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil as possible mutagen-protective food ingredient against heterocyclic amines from cooked food. **Journal Food Chemistry**, v. 139, p. 439-447, Feb. 2013.

SÁ, A. de J.; LÉDO, A. da S.; LÉDO, C. A. da S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, out. 2010.

SAN JOSÉ, M. C.; JANEIRO, L. V.; COREDOIRA, E. Simple strategy for the *in vitro* conservations of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Germoplasm. **Trees Structure and Function**, v. 29, n. 2, p. 539-549, 2015.

SANTO, M. da C. **Conservação in vitro de Mangabeira nativa da região Nordeste do Brasil**. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sergipe, 2010.

SANTOS, M. C.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. S.; SOUZA, F. V. D.; SILVA JÚNIOR, J. F. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 735-741, jul./set. 2011.

SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; BLANK, A. F. Propagação e conservação *in vitro* de vetiver. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 30, n. 3, p. 507-513, jul./set. 2012.

SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M. M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J. K. Conservation *in vitro* of threatened plants-Progress in the past decade. **In vitro Cellular e Developmental Biology - Plant**, v. 42, n. 3, p. 206-214, May 2006.

SARKAR, D.; NAIK, P. S. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. **Euphytica**, v. 102, p. 275-280, 1998.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. **Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance**, Biometrics v.30, p. 507-512, 1974.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, Dec. 1965.

SILVA, F. A. B.; PEREIRA, L. A. R.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 6, p. 1103-1114, Nov./Dec. 2008.

SILVA, N. D. G. da; DUTRA, L. F.; BIANCHI, V. J.; SOMMER, L. R.; VARGAS, D. P.; PETERS, J. A. Conservação *in vitro* de amoreira-preta: Crescimento lento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 7-12, maio. 2016.

SILVA, T. L. da; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 384-389, 2011.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, set. 2007.

SOUZA, A. S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SERTANEJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; DA PAZ, O. P.; MONTARROYOS, A. V. V.; SANTOS, V. da S.; MORAIS, L. S. **Preservação de Germoplasma Vegetal, com ênfase na conservação in vitro de variedades de mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 24 p. (Circular Técnica, 90).

SUNGKUMLONG; DEB, C. R. Regeneration competence of *Tainia latifolia* (Lindl.) Benth ex Hook pseudobulb segments: An *in vitro* study. **Indian Journal of biotechnology**, New Delhi, v. 8, n. 1, p. 121-126, Jan. 2009.

TREJGELL, A.; KAMINSKA, M.; TRETYN, A. *In vitro* slow growth storage of *Senecio macrophyllus* shoots. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 11, p. 234, Nov. 2015.

TUKEY, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance. **International Biometric Society**, Washington, v. 5, n. 2, p. 99-144, 1949.

VIEIRA, L. de J.; SANTANA, J. R. F. de; VIDAL, A. M.; ALVES, A. A. C.; SOUZA, F. V. D. Efeito do sorbitol na conservação *in vitro* de *Manihot esculenta* Crantz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos do Brasil, 2012. P. 1 - 4.

## APÊNDICE

APÊNDICE A - Valores das estatísticas e probabilidades de testes usados para analisar a robustez das medidas de desenvolvimento embrionário de Sangue de grado *in vitro* de duas matrizes (P) analisados a partir de diferentes tamanhos de amostra (T.A.).

|                                  | Estatísticas <sup>1</sup>  |  |
|----------------------------------|--|--|
|                                  | Pressuposição  | Paramétrica (ANOVA fatorial)   |
| Embriões desenvolvidos (%)       | $W(P) = 0.962(0.193)$<br>$^1F(P) = \mathbf{4.721(0.001)}$<br>$^2F(P) = \mathbf{20,848(0,000)}$ | $^3F(P)$ Acesso = 4.085 (0.0529)<br>$^2F(P)$ T.A. = 1.261 (0.3068)<br>$^2F(P)$ T.A.*Acesso= 1.440(0.2520)    |
| $\bar{t}$ (horas)                | $W(P) = 0.924(0.010)$<br>$^1F(P) = 2.688(0.26)$<br>$^2F(P) = 3,666(0,066)$                     | $^3F(P)$ Acesso = 0.051 (0.8222)<br>$^2F(P)$ T.A. = 0.740 (0.5372)<br>$^2F(P)$ T.A.*Acesso= 0.152(0.9276)    |
| $CV_t$ (%)                       | $W(P) = 0.951(0.084)$<br>$^1F(P) = 2.059(0.78)$<br>$^2F(P) = 3,592(0,069)$                     | $^3F(P)$ Acesso = 2.117 (0.1568)<br>$^2F(P)$ T.A. = 28.427 (0.000)<br>$^2F(P)$ T.A.*Acesso=1.1492(0.2383)    |
| $\bar{v}$ (horas <sup>-1</sup> ) | $W(P) = 0.927(0.012)$<br>$^1F(P) = 2.323(0.049)$<br>$^2F(P) = 1,790(0,192)$                    | $^3F(P)$ Acesso = 0.066 (0.7997)<br>$^2F(P)$ T.A. = 0.273 (0.8442)<br>$^2F(P)$ T.A.*Acesso = 0.142(0.9340)   |
| $I$ (bit)                        | $W(P) = 0.983(0.787)$<br>$^1F(P) = 3.200(0.011)$<br>$^2F(P) = 0,648(0,428)$                    | $^3F(P)$ Acesso = 2.846 (0.1027)<br>$^2F(P)$ T.A. = 419.583 (0.0000)<br>$^2F(P)$ T.A.*Acesso = 1.300(0.2940) |
| $Z$                              | $W(P) = 0.951(0.080)$<br>$^1F(P) = 1.635(0.161)$<br>$^2F(P) = 0,565(0,459)$                    | $^3F(P)$ Acesso = 5064 (0.0325)<br>$^2F(P)$ T.A. = 19.882 (0.0000)<br>$^2F(P)$ T.A.*Acesso = 1.521(0.2307)   |

2: Os valores em negrito representam a rejeição de hipótese nula.  $W$ : estatística do teste de Shapiro-Wilk para normalidade residual ( $P > 0,01$ );  $^1F$ : estatística do teste de Levene para homogeneidade de variância ( $P > 0,01$ );  $^2F$ : estatística do teste Tukey para aditividade. Embriões desenvolvido (%): Habilidade de desenvolvimento embrionário *in vitro*;  $\bar{t}$  (horas): tempo médio de desenvolvimento embrionário;  $CV_t$  (%): coeficiente de variação do tempo de desenvolvimento embrionário;  $\bar{v}$  (horas<sup>-1</sup>): taxa média de taxa média de desenvolvimento embrionário;  $I$  (bit): incerteza;  $Z$ : sincronia do desenvolvimento embrionário.

APÊNDICE B - Resumo da análise de variância de embriões desenvolvidos (ED%), tempo médio de desenvolvimento do embrião ( $\bar{t}$  (horas)) e coeficiente de variação do tempo de desenvolvimento do embrião (CV $t$ ) avaliados após 12 horas do estabelecimento *in vitro*, de Sangue de grado submetidos a avaliação do desenvolvimento em função de duas matrizes (1 e 2) e quatro tamanhos de amostra (5, 25, 50 e 100), em esquema fatorial 2x4 no delineamento em blocos casualizados.

| Fonte de variação | GL  | Quadrado médio      |                                  |                     |
|-------------------|-----|---------------------|----------------------------------|---------------------|
|                   |     | ED% <sup>(1)</sup>  | $\bar{t}$ (horas) <sup>(2)</sup> | CV $t$              |
| Matrizes          | 1   | 0,486 <sup>ns</sup> | 0,002 <sup>ns</sup>              | 0,046 <sup>ns</sup> |
| Tam. da amostra   | 3   | 0,150 <sup>ns</sup> | 0,022 <sup>ns</sup>              | 0,619 <sup>**</sup> |
| ACESSO x TDA      | 3   | 0,171 <sup>ns</sup> | 0,005 <sup>ns</sup>              | 0,032 <sup>ns</sup> |
| BLOCO             | 4   | 0,303 <sup>ns</sup> | 0,048 <sup>ns</sup>              | 0,039 <sup>ns</sup> |
| Erro              | 112 | 0,119               | 0,030                            | 0,022               |
| Total             | 119 | -                   | -                                | -                   |
| CV (%)            | -   | 1,89                | 7,79                             | 41,14               |

Notas: 1. <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* significativo a 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* significativo a 1% ( $p < 0,01$ ),  
 2. ACESSO (localização das matrizes); TDA (tamanho da amostra)  
 3. Características transformadas: <sup>(1)</sup> (arco seno de  $\sqrt{x/100}$ ); <sup>(2)</sup> ( $\sqrt[5]{x}$ )

APÊNDICE C - Resumo da análise de variância da velocidade média de desenvolvimento embrionário ( $\bar{v}$ (horas<sup>-1</sup>)), incerteza do desenvolvimento do embrião ( $I$ ) e sincronia do desenvolvimento do embrião ( $Z$ ) avaliadas após 12 horas do estabelecimento *in vitro*, de Sangue de grado submetidos a avaliação do desenvolvimento em função de duas matrizes (1 e 2) e quatro tamanhos de amostra (5, 25, 50 e 100), em esquema fatorial 2x4 no delineamento em blocos casualizados.

| Fonte de variação | GL  | Quadrado médio                                  |                     |                     |
|-------------------|-----|---|---------------------|---------------------|
|                   |     | $\bar{v}$ (horas <sup>-1</sup> ) <sup>(1)</sup> | $I$ <sup>(2)</sup>  | $Z$ <sup>(3)</sup>  |
| Acesso            | 1   | 0,000040 <sup>ns</sup>                          | 0,022 <sup>ns</sup> | 0,240*              |
| Tam. da amostra   | 3   | 0,000167 <sup>ns</sup>                          | 3,257**             | 0,943**             |
| ACESSO x TDA      | 3   | 0,000087 <sup>ns</sup>                          | 0,010 <sup>ns</sup> | 0,072 <sup>ns</sup> |
| BLOCO             | 4   | 0,000821 <sup>ns</sup>                          | 0,011 <sup>ns</sup> | 0,038 <sup>ns</sup> |
| Erro              | 112 | 0,000610  | 0,008               | 0,047               |
| Total             | 119 | -   | -                   | -                   |
| CV (%)            | -   | 18,16   | 10,40               | 49,28               |

Notas: 1. <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* significativo a 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* significativo a 1% ( $p < 0,01$ ),  
 2. ACESSO (localização das matrizes); TDA (tamanho da amostra)  
 3. Características transformadas: <sup>(1)</sup> ( $\sqrt{x}$ ); <sup>(2)</sup> ( $\sqrt[4]{x}$ ); <sup>(3)</sup> (Log de x)

APÊNDICE D - Valores das pressuposições de testes usados para analisar o número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) no crescimento controlado *in vitro* utilizando sacarose e sorbitol de plantas de Sangue de grado.

| Tempo   | Testes       | Pressuposições |        |        |
|---------|--------------|----------------|--------|--------|
|         |              | NB             | NFE    | CPA    |
| 30 dias | Shapiro-Wilk | 0,0155         | 0,0209 | 0,2371 |
|         | Bartlet      | 0,8608         | 0,0188 | 0,0918 |
| 60 dias | Shapiro-Wilk | 0,084          | 0,1942 | 0,4767 |
|         | Bartlet      | 0,451          | 0,0267 | 0,1474 |
| 90 dias | Shapiro-Wilk | 0,2429         | 0,0651 | 0,2491 |
|         | Bartlet      | 0,5175         | 0,1874 | 0,0115 |

APÊNDICE E - Resumo da análise de variância do número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) avaliadas aos 30 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado em função de duas temperaturas (15 °C e 25 °C) dois agentes osmóticos (Sacarose e sorbitol) e quatro concentrações (15 gL<sup>-1</sup>; 30 gL<sup>-1</sup>; 45 gL<sup>-1</sup> e 60 gL<sup>-1</sup>;) em esquema fatorial 2x2x4 no delineamento inteiramente casualizado.

| Fonte de variação    | GL  | Quadrado médio      |                     |                     |
|----------------------|-----|---------------------|---------------------|---------------------|
|                      |     | NB                  | NFE <sup>(1)</sup>  | CPA <sup>(2)</sup>  |
| Temperatura          | 1   | 1,688 <sup>ns</sup> | 32,103**            | 4,716**             |
| Agente osmótico      | 1   | 6,021**             | 11,257**            | 9,332**             |
| Concentração         | 3   | 0,188 <sup>ns</sup> | 3,668**             | 0,033 <sup>ns</sup> |
| TEMP x AG.OS.        | 1   | 1,688 <sup>ns</sup> | 2,379**             | 6,024**             |
| TEMP x CONC          | 3   | 1,243 <sup>ns</sup> | 0,221 <sup>ns</sup> | 0,266**             |
| AG.OS. x CONC        | 3   | 0,688 <sup>ns</sup> | 0,230 <sup>ns</sup> | 0,178*              |
| TEMP x AG.OS. x CONC | 3   | 0,632 <sup>ns</sup> | 0,155 <sup>ns</sup> | 0,023 <sup>ns</sup> |
| Erro                 | 176 | 0,566               | 0,394               | 0,061               |
| Total                | 191 | -                   | -                   | -                   |
| CV (%)               | -   | 56,00               | 52,53               | 49,06               |

Notas:1. <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* significativo a 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* significativo a 1% ( $p < 0,01$ ),

2. TEMP (temperatura); AGOS (agente osmótico); CONC (concentração)

3. Características transformada <sup>(1)</sup>  $\sqrt{x}$ ; <sup>(2)</sup>  $\log(x-1)$

APÊNDICE F - Resumo da análise de variância do número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) avaliadas aos 60 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro* em delineamento inteiramente casualizado.

| Fonte de variação | de GL | Quadrado médio |          |                    |
|-------------------|-------|----------------|----------|--------------------|
|                   |       | NB             | NFE      | CPA <sup>(1)</sup> |
| Tratamento        | 14    | 1,279**        | 17,032** | 1,669**            |
| Erro              | 165   | 0,552          | 1,469    | 0,043              |
| Total             | 179   | -              | -        | -                  |
| CV (%)            | -     | 48,79          | 47,95    | 77,39              |

Notas:1. <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* significativo a 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* significativo a 1% ( $p < 0,01$ ),

2. Características transformadas: <sup>(1)</sup>  $\log(x-1)$

APÊNDICE G - Resumo da análise de variância do número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) avaliadas aos 90 dias, de plantas de Sangue de grado submetidas ao crescimento controlado *in vitro* em delineamento inteiramente casualizado.

| Fonte de variação | de GL | Quadrado médio      |           |                    |
|-------------------|-------|---------------------|-----------|--------------------|
|                   |       | NB                  | NFE       | CPA <sup>(1)</sup> |
| Tratamento        | 11    | 0,578 <sup>ns</sup> | 10,272 ** | 1,486 **           |
| Erro              | 129   | 0,475               | 1,404     | 0,041              |
| Total             | 140   | -                   | -         | -                  |
| CV (%)            | -     | 43,01               | 49,14     | 169,25             |

Notas:1. <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* significativo a 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* significativo a 1% ( $p < 0,01$ ),  
2. Características transformadas: <sup>(1)</sup> Log (x-1)

APÊNDICE H - Valores das pressuposições de testes usados para analisar o número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e comprimento da parte aérea (CPA) após o processo de enraizamento pós crescimento controlado *in vitro* de plantas de Sangue de grado utilizando sacarose e sorbitol.

| Tempo   | Testes       | Pressuposições |        |        |        |
|---------|--------------|----------------|--------|--------|--------|
|         |              | NR             | NB     | NFE    | CPA    |
| 30 dias | Shapiro-Wilk | 0,2633         | 0,0201 | 0,3987 | 0,4855 |
|         | Bartlet      | 0,052          | 0,9178 | 0,2535 | 0,4215 |

APÊNDICE I - Resumo da análise de variância do número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas expandidas (NFE) e altura da parte aérea (APA) avaliadas após processo de enraizamento *in vitro* de plantas de Sangue de grado em delineamento inteiramente casualizado.

| Fonte de variação | GL | Quadrado médio      |                     |          |                    |
|-------------------|----|---------------------|---------------------|----------|--------------------|
|                   |    | NR                  | NB                  | NFE      | CPA <sup>(1)</sup> |
| Tratamento        | 6  | 5,075 <sup>ns</sup> | 0,595 <sup>ns</sup> | 18,278** | 1,864**            |
| Erro              | 77 | 3,450               | 0,399               | 4,295    | 0,108              |
| Total             | 83 | -                   | -                   | -        | -                  |
| CV (%)            | -  | 64,20               | 37,65               | 46,93    | 17,79              |

Notas:1. <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq 0,05$ ); \* significativo a 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* significativo a 1% ( $p < 0,01$ ),  
2. Características transformada: <sup>(1)</sup>  $\sqrt{x}$