


JOÃO BOSCO DE OLIVEIRA JÚNIOR



ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DE *Croton lechleri* Muell.
Arg. CULTIVADO IN VITRO: SISTEMAS DE VEDAÇÃO, TIPOS DE
EXPLANTES E HIPERIDRICIDADE

RIO BRANCO - AC

2019

JOÃO BOSCO DE OLIVEIRA JÚNIOR

ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DE *Croton lechleri* Muell.
Arg. **CULTIVADO *IN VITRO*: SISTEMAS DE VEDAÇÃO, TIPOS DE
EXPLANTES E HIPERIDRICIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Frederico H. da Silva Costa

RIO BRANCO - AC

2019

JOÃO BOSCO DE OLIVEIRA JÚNIOR

ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DE *Croton lechleri* Muell.
Arg. **CULTIVADO *IN VITRO*: SISTEMAS DE VEDAÇÃO, TIPOS DE
EXPLANTES E HIPERIDRICIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

APROVADA em 25 de março 2019.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Frederico Henrique da Silva Costa
Universidade Federal do Acre

Dr. Marcio de Oliveira Martins
Universidade Federal do Acre

Dra. Tatiane Loureiro da Silva
Instituto Federal do Acre

RIO BRANCO - AC

2019

Aos meus pais, João Bosco de Oliveira (*in memorian*) e Luzineide M. de Oliveira, aos meus irmãos, Tony J. de Oliveira e Anne E. de Oliveira, e à minha esposa, Danna Sousa de França, o meu eterno respeito e gratidão pelo apoio para a concretização deste sonho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João Bosco de Oliveira (*in memorian*) e Luzineide Medeiros de Oliveira por todo o amor, exemplo de boa educação e perseverança.

Aos meus irmãos Tony John de Oliveira e Anne E. de Oliveira, pelo apoio, incentivo, companheirismo e ajuda nos momentos difíceis.

À minha esposa Danna S. de França, pela paciência, amor, companheirismo, dedicação e aos ensinamentos a mim atribuídos durante toda a caminhada nessa jornada, e principalmente, por fazer parte da minha vida.

À família de Tadeu Marinho e Lucia Marinho pelo apoio nos momentos difíceis, pelo incentivo e, principalmente, por fazerem parte da minha vida.

Ao Professor Dr. Frederico Henrique pela parceria e todos os anos de paciência e orientação em pesquisas científicas, e principalmente pela oportunidade e conhecimentos transmitidos a minha pessoa.

À Universidade Federal do Acre, professores e pessoas que contribuíram direta e indiretamente na realização desse trabalho e na minha formação profissional.

Ao amigo Filipe por transmitir os conhecimentos necessários para os estudos anatômicos.

Aos amigos e colegas de trabalho, Camilla Pedrosa, Clarice Sales, Roger Ventura, Janaína Vasconcelos e Jeyson Miranda por fazerem do ambiente de trabalho um lugar agradável, pela troca de conhecimentos e principalmente pelos nossos momentos de confraternização e cafezinhos da tarde.

RESUMO

Em sistemas convencionais de cultivo *in vitro*, a utilização de plástico filme de policloreto de vinila (PVC) para a vedação dos recipientes impõe limites às trocas gasosas. Como consequência, podem ocorrer distúrbios morfofisiológicos e estruturais como a hiperidricidade, que causa perdas econômicas e, em alguns casos, o insucesso na aplicação das técnicas de cultura de tecidos vegetais. Portanto, o uso de membranas comerciais permeáveis aos gases, ou o desenvolvimento de sistemas alternativos de vedação, são necessários para melhorias dos processos fisiológicos, aspectos anatômicos e o crescimento das plantas *in vitro*. No presente estudo, é proposto um sistema de vedação alternativo com tecido de máscara cirúrgica tripla (MC), de baixo custo e fácil aquisição, para aumentar as trocas gasosas, promover o crescimento e melhorar a qualidade de *Croton lechleri* cultivado *in vitro*. Além disso, são apresentadas as principais modificações anatômicas e fisiológicas decorrentes da hiperidricidade que possam auxiliar em futuras pesquisas para a espécie. Para tanto, foram realizados dois experimentos, o primeiro com o objetivo de avaliar um sistema alternativo de vedação associado a influência do tipo de explante; e o outro para analisar os efeitos da hiperidricidade na fisiologia e anatomia de *C. lechleri*. Considerando os resultados observados, o sistema de vedação proposto apresentou eficiência em inibir contaminações por fungos ou bactérias. Comparado ao sistema com policloreto de vinila (PVC), o fechamento dos tubos de ensaio com o tecido indicado aumentou as trocas gasosas e a biossíntese de clorofilas e carotenoide, além de proporcionar melhorias anatômicas e de algumas características de crescimento. Plantas hiperídricas tiveram maior área com espaços intercelulares no mesofilo, ausência de parênquimas fundamentais para a sustentação e desenvolvimento como colênquima e esclerênquima, e procâmbio. A hiperidricidade também causou maior dano de membrana e as brotações hiperídricas tiveram maior conteúdo relativo de água e menores teores de pigmentos. Por fim, plantas que reverteram a condição de hiperidricidade, tiveram formação de raízes, melhoria no arranjo estrutural das células colenquimáticas e presença de esclerênquima e formação de procâmbio, além de poucos espaços intercelulares comparada às brotações hiperídricas.

Palavras-chave: *Croton lechleri*. Sistema de vedação. Hiperidricidade. Aspectos fisiológicos e anatômicos.

ABSTRACT

In conventional *in vitro* culture systems, the use of Polyvinyl Chloride (PVC) plastic for the sealing of the containers imposes limits on gas exchange. As a consequence, it can occur morphophysiological and structural disturbances such as hyperhydricity, which causes economic losses and, in some cases, failure in the application of plant tissue culture techniques. Therefore, the use of gas-permeable commercial membranes or the development of alternative sealing systems are necessary for improvements on *in vitro* physiological processes, anatomical aspects and plant growth. In the present study, it is proposed an alternative sealing system with triple surgical mask (MC) tissue, of low cost and easy acquisition, to improve the gas exchange, and to promote growth and quality of *in vitro* culture of *Croton lechleri*. In addition, the main differences in the anatomical and physiological aspects of hyperhydricity that may help in future researches for the species are presented. For that, two experiments were carried out, the first with the objective of evaluating an alternative sealing system associated to the influence of explant type; and the other to analyze the effects of hyperhydricity on the physiology and anatomy of *C. lechleri*. Considering the observed results, the proposed sealing system showed efficiency in inhibiting contamination by fungi or bacteria. Compared to the Polyvinyl Chloride (PVC) system, the closure of the test tubes with the indicated tissue increased the gas exchange and the biosynthesis of chlorophyll and carotenoid, as well as providing better anatomical development and some growth characteristics. Hyperhydric plants had greater area with intercellular spaces in the mesophyll, absence of fundamental parenchyma for the sustentation and development such as colenchyma and sclerenchyma and procambium. Hyperhydricity also caused greater membrane damage and the hyperhydric shoots had higher relative water content and lower pigment contents. Finally, plants that reverted the hyperhydricity condition had roots formation, improvement in the structural arrangement of the colenchymatic cells and sclerenchymatic cells and procambium formation, in addition to a few intercellular spaces compared to the hyperhydric shoots.

Keywords: *Croton lechleri*. Sealing system. Hyperhydricity. Physiological and anatomical aspects.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 -	Material botânico e procedimentos utilizados para a obtenção e padronização das sementes de <i>Croton lechleri</i> , Rio Branco, Acre	25
Figura 2 -	Esquema do processo de desinfestação das sementes e extração do embrião zigótico de <i>Croton lechleri</i> , Rio Branco, Acre	26
Figura 3 -	Esquema representativo do material vegetal e tratamentos (tipo de explante e sistema de vedação) utilizados na propagação <i>in vitro</i> de <i>Croton lechleri</i> , Rio Branco, Acre	27
Figura 4 -	Máscara cirúrgica com tripla camada (MC) e filme de PVC (PVC), utilizados como vedação na propagação <i>in vitro</i> <i>Croton lechleri</i> , e imagens estereomicroscópicas da superfície de cada componente, Rio Branco, Acre	28
Figura 5 -	Plantas matrizes de <i>Croton lechleri</i> , oriundas do desenvolvimento de embriões zigóticos <i>in vitro</i> e cultivadas a campo (<i>in vivo</i>), usadas nos estudos anatômicos, Rio Branco, Acre	29
Figura 6 -	Aspecto inicial de planta normal, hiperídrica e revertida de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> , indicando as estruturas botânicas (ápice, folhas e base caulinar) utilizadas nos estudos anatômicos, Rio Branco, Acre	30
Figura 7 -	Aspecto geral das plantas de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> em função do sistema de vedação (MC: tecido de máscara cirúrgica e PVC: policloreto de vinila) e tipo de explantes (AP: apical e ME: mediano), Rio Branco, Acre	34
Figura 8 -	Taxa de perda de vapor d'água, avaliada até os 53 dias de cultivo, nos tubos vedados com policloreto de vinila (PVC) e tecido de máscara cirúrgica tripla (MC), Rio Branco, Acre	36
Figura 9 -	Secções transversais do limbo foliar de plantas de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> em função dos sistemas de vedação e tipos de explante, Rio Branco, Acre	38
Figura 10 -	Secções transversais do caule da região mediana de brotação lateral de <i>Croton lechleri</i> cultivado <i>in vivo</i> , Rio Branco, Acre	41
Figura 11 -	Secções transversais da nervura central de plantas de <i>Croton lechleri</i> cultivadas <i>in vivo</i> (campo), Rio Branco, Acre	42
Figura 12 -	Secções transversais do caule de plantas normais, hiperídricas e revertidas de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre ..	43

Figura 13 -	Secção transversal da nervura central de plantas normais, hiperídrica e revertidas de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre	44
Figura 14 -	Secção longitudinal do ápice caulinar e gema axilar de plantas normais, hiperídricas e revertidas de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre	46
Figura 15 -	Secção transversal do limbo foliar de plantas de <i>Croton lechleri</i> cultivadas em campo e propagadas <i>in vitro</i> (normais, hiperídricas e revertidas), Rio Branco, Acre	47
Figura 16 -	Dano de membrana (DM) e conteúdo relativo de água (CRA) de plantas normais, hiperídricas e revertidas de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre	49
Figura 17 -	Teores de pigmentos fotossintéticos de plantas normais, hiperídricas e revertidas de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre	50

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Número de folhas expandidas (NF), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) de plantas de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> em função do sistema de vedação e tipo de explante, Rio Branco, Acre	35
Tabela 2 - Pigmentos fotossintéticos de plantas de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> em função do sistema de vedação e tipo de explante, Rio Branco, Acre	37
Tabela 3 - Anatomia foliar de plantas de <i>Croton lechleri</i> propagadas <i>in vitro</i> em função do sistema de vedação e tipo de explante, Rio Branco, Acre ...	39
Tabela 4 - Anatomia foliar de plantas de <i>Croton lechleri</i> cultivadas em campo e propagadas <i>in vitro</i> (normais, hiperídricas e revertidas), Rio Branco, Acre	48

LISTA DE APÊNDICES

- APÊNDICE A - Resumo da análise de variância para número de folhas expandidas (NF), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) de plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação e tipo de explante, no experimento 1 66
- APÊNDICE B - Resumo da análise de variância para a concentração de pigmentos fotossintéticos de plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação e tipo de explante, no experimento 1 66
- APÊNDICE C - Resumo da análise de variância para anatomia foliar de plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação e tipos de explante no experimento 1 67
- APÊNDICE D - Resumo da análise de variância para taxa de perda de vapor d'água, até os 53 dias de cultivo, nos tubos vedados com policloreto de vinila (PVC) e tecido de máscara cirúrgica tripla (MC), no experimento 1 67
- APÊNDICE E - Resumo da análise de variância para dano de membrana (DM) e conteúdo relativo de água (CRA) de plantas normais, hiperídricas e revertidas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro*, no experimento 2 67
- APÊNDICE F - Resumo da análise de variância para concentração de pigmentos fotossintéticos de plantas normais, hiperídricas e revertidas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro*, no experimento 2 68
- APÊNDICE G - Resumo da análise de variância para anatomia foliar de plantas de *Croton lechleri* cultivadas em campo e propagadas *in vitro* (normais, hiperídricas e revertidas), no experimento 2 68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	14
2.2 <i>Croton lechleri</i>	15
2.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	17
2.4 MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS	18
2.5 HIPERIDRICIDADE	19
2.5.1 Aspectos morfoanatômicos	20
2.5.2 Aspectos fisiológicos e bioquímicos	21
2.5.3 Causas e métodos de controle da hiperidricidade	22
2.6 SISTEMA DE VEDAÇÃO DOS RECIPIENTES	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	25
3.2 ESTABELECIMENTO DE PLANTAS IN VITRO E CONDIÇÃO DE CULTIVO .	26
3.3 EXPERIMENTO 1	27
3.3.1 Descrição dos sistemas de vedação e caracterização dos materiais utilizados nas trocas gasosas	27
3.3.2 Taxa de perda de vapor d'água	29
3.3.3 Características de crescimento	29
3.4 EXPERIMENTO 2	29
3.4.1 Análises anatômicas	31
3.4.2 Conteúdo relativo de água e dano de membrana	31
3.4.3 Determinação dos teores de clorofilas e carotenoides	32
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 EXPERIMENTO 1	33
4.2 EXPERIMENTO 2	40
5 CONCLUSÕES	51
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES	65

1 INTRODUÇÃO

A hiperidricidade é um importante distúrbio morfofisiológico observado durante o cultivo *in vitro* de plantas (FERNADEZ-GARCIA et al., 2011), caracterizado pela retenção excessiva de água no interior das células e tecidos (VASCONCELOS et. al., 2012; TIAN et al., 2017) causando a perda significativa da morfogênese vegetal. Os principais efeitos incluem redução do potencial de multiplicação e diferenciação celular, ausência de raízes, alterações anatômicas e fisiológicas associadas ao processo fotossintético, e alta mortalidade do material micropropagado na fase de aclimatização *ex vitro* (VASCONCELOS et. al., 2012).

Além dos danos econômicos (GAO et al., 2018), a hiperidricidade limita as aplicações das técnicas de cultura de tecidos (TABART et al., 2015; TIAN et al., 2016; VAN DEN DRIES et al., 2013; WU et al., 2009), como observado na conservação *in vitro* de germoplasma de espécies ameaçadas de extinção (PENCE; FINKE; NIEDZ, 2014). Outro aspecto importante diz respeito aos múltiplos fatores associados à condição hiperídrica, o que inclui tipo de explante, composição do meio de cultura, sistemas de vedação dos recipientes e condições ambientais inerentes à atmosfera no interior dos frascos de cultivo (LIU et al., 2017), dificultando a prevenção e controle.

Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos para prevenção ou controle da hiperidricidade é crucial para redução das perdas econômicas e desperdício de recursos vegetais (GAO et al., 2017), com consequente sucesso na propagação e conservação *in vitro*. Os métodos de prevenção dependem da espécie vegetal, uma vez que as exigências nutricionais e ambientais são espécie-dependente (LIU et al., 2017), tornando a ocorrência de hiperidricidade pouco previsível, principalmente em plantas nativas.

Croton lechleri (Euphorbiaceae) é uma espécie arbórea popularmente conhecida como Sangue de dragão, a partir da qual é extraída uma seiva avermelhada (OSAKADA, 2009) contendo o alcaloide taspina, com propriedades anti-inflamatórias, antibióticas e cicatrizantes comprovadas cientificamente para diversas sintomatologias (MEZA; AYALA, 1998; FORERO et al., 2000; JONES, 2003). No projeto de Reflorestamento Econômico, Consorciado e Adensado (RECA), localizado no distrito de Nova Califórnia, estado de Rondônia, a seiva extraída é comercializada como um produto medicinal. Comunidades Amazônicas relatam a utilização da seiva para o tratamento de feridas e, adicionado à água, para tratar processos inflamatórios.

Os métodos extrativistas e predatórios utilizados na extração da seiva, somados à reprodução espontânea da espécie, nas áreas cultivadas e em terras de várzea, são fatores de risco a sobrevivência de *C. lechleri*. Até o presente momento, não há estudos científicos sobre técnicas mais eficientes de propagação *ex vitro* ou *in vitro* desenvolvidos no Brasil. O cultivo *in vitro* é indicado e muito utilizado em plantas com potencial medicinal comprovado (OLIVEIRA et al., 2011; PIATTI et al., 2011), e a micropropagação é o principal método para produzir massivamente plantas certificadas e padronizadas, com vantagens econômicas e reconhecida eficácia. No entanto, desordens morfofisiológicas como a hiperidricidade podem ocorrer durante a propagação *in vitro*, com perdas econômicas e até comprometer o potencial morfogenético da espécie vegetal. As causas dessa anormalidade incluem múltiplos fatores, como a elevada umidade, reduzidas trocas gasosas e constante acúmulo de gases como o etileno dentro dos recipientes de cultivo, além de estresse osmótico, elevada concentração de nitratos, uso de fitorreguladores e aspectos relacionados à fonte de luz (ABREU et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2012).

Estudos prévios visando a propagação de Sangue de Dragão têm evidenciado a ocorrência de hiperidricidade, com perdas de até 90% do material cultivado, o que é agravado com os sucessivos subcultivos (dados não publicados). Entretanto, os resultados já observados são inconclusivos, e experimentos realizados na tentativa de reverter essa a condição hiperídrica não foram exitosos.

Pelo exposto, o objetivo deste trabalho é propor um sistema de vedação alternativo com tecido de máscara cirúrgica tripla (MC), de baixo custo e fácil aquisição, para aumentar as trocas gasosas, promover o crescimento e melhorar a qualidade de *Croton lechleri* Muell. Arg. propagado *in vitro*. Mais especificamente, pretende analisar as principais alterações anatômicas e fisiológicas decorrentes da hiperidricidade, como também inovar em tecnologias para a produção e padronização de matérias primas de espécies nativas da flora brasileira de importância farmacológica comprovada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O uso de plantas medicinais constitui uma cultura milenar entre os mais diversos povos, e os conhecimentos dessa prática no tratamento de sintomatologias foi passado de geração a geração. *Croton lechleri* conhecida como sangue de dragão, produz uma seiva avermelhada contendo o alcaloide taspina, com propriedades medicinais comprovadas cientificamente. A cultura de tecidos vegetais, tem por base a teoria da totipotência celular, possibilitando a obtenção de grande número de novos propágulos a partir de uma única célula, tecido ou órgão. As vantagens dessa técnica incluem a multiplicação clonal massal, padronização de matérias-primas de espécies com potencial medicinal, além de possibilitar o estabelecimento de bancos de germoplasma e coleções *in vitro*. Porém, algumas condições impostas durante o cultivo *in vitro* causam modificações morfofisiológicas e anatômicas nas plantas formadas. Entre as anormalidades observadas em plantas cultivadas *in vitro*, se destaca a hiperidricidade, um distúrbio morfofisiológico caracterizado por retenção excessiva de água, no interior das células e nos espaços intercelulares dos tecidos vegetais que resultam em perdas econômicas e limitam o potencial de aplicações dos métodos de pesquisas científicas.

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

O conhecimento adquirido sobre plantas medicinais e seu uso é transmitido de geração a geração há milhões de anos para o tratamento, prevenção e cura de enfermidades. O uso de fitoterápicos, assim denominado o tratamento com plantas medicinais (SCHENKEL et al., 2003), destaca-se principalmente nos países em desenvolvimento com enfoque nos cuidados primários em saúde (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) desenvolveu políticas para ampliar as opções terapêuticas oferecidas aos usuários, mediante o uso de plantas medicinais, fitoterápicos e outros serviços relacionados (BALBINO; DIAS, 2010). Conforme Almasy Júnior et al. (2005), uma espécie vegetal é caracterizada como planta medicinal quando possui ação terapêutica independente da forma como é administrada no indivíduo.

Devido a produção de metabólitos secundários, as plantas medicinais constituem uma excelente alternativa de substâncias bioativas (SILVA, et al., 2014). De acordo

com o Ministério da Saúde (2012), produtos à base de plantas medicinais são utilizados por 82% da população brasileira, desde o conhecimento tradicional de comunidades indígenas até os medicamentos fitoterápicos disponibilizados à população. Acrescenta, ainda, que aproximadamente 25% dos medicamentos usados e disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos a partir de extratos de plantas, chegando a ultrapassar 60%, no caso de medicamentos como os antitumorais e antimicrobianos.

Na busca por princípios ativos em espécies vegetais, que originaram novos medicamentos, destaca-se diversas áreas do conhecimento que abrangem aspectos agrônômicos, botânicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos (BRANDÃO et al, 2010) e biotecnológicos.

De acordo com Mito (2010), o mercado econômico mundial de fitoterápicos é estimado em US\$ 44 bilhões, enquanto no Brasil estaria entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões. O autor destaca que, dentre os fitoterápicos registrados na Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), apenas uma minoria é oriunda de plantas nacionais, portanto, além de pesquisas, são necessários maiores investimentos para domesticar as espécies e tornar viável a produção e o desenvolvimento de medicamentos dentro do território nacional.

Através de pesquisas científicas, tendo como base o conhecimento empírico, foram comprovadas as propriedades medicinais de diversas espécies de plantas, inclusive a espécie em estudo (OLIVEIRA et al., 2011; LIMA et al., 2006; SHIBATA et al., 1996). Vale ressaltar que o uso de remédios em certos casos pode ser oneroso, enquanto a medicina popular, por meio de plantas medicinais, é uma terapêutica acessível às classes sociais mais baixas. Desta forma, evidencia-se a importância social e econômica das plantas medicinais no contexto populacional.

2.2 *Croton lechleri*

O gênero *Croton* representa o segundo maior na família Euphorbiaceae, compreendendo aproximadamente 1.200 espécies com maiores ocorrências e distribuição nas regiões tropicais do mundo (GOVAERTS et al., 2000). Devido à grande diversidade na Região neotropical, concentra-se maior número de espécies, principalmente, no Brasil, na região das Antilhas e no México (OSAKADA, 2009). No Brasil, há uma estimativa de aproximadamente 350 espécies distribuídas em vários ambientes e

diferentes biomas (BERRY et al., 2005), inclusive no Acre (MEZA; AYALA, 1998; FORERO et al., 2000).

O gênero apresenta potencial ecológico, e econômico, especialmente para a indústria farmacêutica, devido à presença de metabólitos secundários, tais como alcaloides, flavonoides, terpenoides, taninos e saponinas, que conferem propriedades terapêuticas em muitas espécies (SANTOS et al., 2015).

Na medicina popular, plantas do gênero *Croton* são utilizadas para tratar infecções fúngicas, doenças gastrointestinais, hipertensão, febre, malária, inflamação, diabetes, dor, doenças do trato respiratório e como cicatrizante (ALBUQUERQUE et al., 2007; COSTA et al., 2008; SANTOS et al., 2008; SANTOS et al., 2009, SONG et al., 2015). Dentre as atividades farmacológicas comprovadas pode-se destacar as ações antioxidante (MORAIS et al., 2006; SHUKLA et al., 2009; ROCHA et al., 2008), anti-inflamatória e antinociceptiva, leishmanicida (LIMA et al., 2015) citotóxica, antimicrobiana, antiviral e antidiabética (RODRIGUES et al., 2012; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007; VEIGA-JUNIOR et al., 2008).

A espécie *C. lechleri* Muell. Arg., popularmente conhecida como sangue de dragão, é uma árvore pioneira e heliófita de porte médio a grande que pode alcançar até 20 m de altura, com diâmetro de 20 a 40 cm. Algumas de suas características botânicas incluem: fuste cilíndrico ou cilíndrico irregular; copa em formato de para-sol, com ramos distribuídas de forma irregular; casca externa de coloração bege-cinza, casca interna de coloração branca ou creme; folhas simples, alternas, palmatinervada com mais de sete pares de nervuras; consistência papirácea; cor verde clara na superfície abaxial e verde escuro na superfície adaxial, com abundantes pelos nas nervuras e na superfície das folhas (OSAKADA, 2009).

A planta inicia a floração ao completar um ano de idade, com produção de inflorescências grandes do tipo racimo, flores masculinas abundantes e femininas em menor quantidade na parte basal, ambas de cor bege-creme (OSAKADA, 2009). Os frutos possuem coloração verde a verde-amarelada, de formato trilocular, deiscentes, cobertos com tricomas, sendo as sementes pequenas, globosas e oleaginosas (POLLITO, 2004; POLLITO; TOMAZELLO FILHO, 2007).

Ao sofrer injúrias/incisões mecânicas na periderme ocorre secreção abundante de seiva de cor vermelha, de sabor adstringente e viscoso (OSAKADA, 2009), contendo o alcaloide taspina, cujas propriedades anti-inflamatórias, antibióticas e cicatrizantes já

foram comprovadas cientificamente para diversas sintomatologias (MEZA; AYALA, 1998; FORERO et al., 2000; JONES, 2003), além do amplo uso pelos povos nativos.

Considerando que a extração da seiva, em muitos casos, ainda ocorre de forma predatória, através da derrubada da planta ou retirada da casca, isto pode causar injúrias irreversíveis e até a morte da árvore. Aliado a estas questões, a espécie foi incluída na categoria CR (perigo crítico), pois é encontrada de forma pontual em áreas expostas (terras de várzea), de forma que os agricultores a consideram invasora ou daninha pela competição com as culturas agrícolas (FORERO et al., 2000; POLLITO, 2004).

A forma de propagação dessa espécie, geralmente, ocorre através da germinação de sementes e por coleta de mudas em ambientes naturais, podendo também ser propagados por estaquia. No entanto, Palomino e Barra (2003) constataram que a propagação por estacas não apresenta resultados positivos. Vale ressaltar que esses tipos convencionais de propagação são disseminadores de patógenos causadores de doenças, logo, torna-se importante e necessário, a aplicação de novas técnicas de propagação e, conseqüentemente, a domesticação e conservação desta espécie.

2.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Pode ser definida como o cultivo, em ambiente artificial e asséptico, de células, tecidos ou órgãos isolados de matrizes selecionadas, com o objetivo principal de produzir plantas inteiras (XIAO et al., 2011). A técnica tem por base a teoria da totipotência celular, que tem a capacidade e contém informações genéticas necessárias para formar uma planta completa, o que pode ocorrer via organogênese ou mediante a formação de embriões somáticos (BHOJWANI; DANTU, 2013).

A cultura de tecidos é uma área da biotecnologia vegetal que compreende métodos de propagação e conservação de recursos genéticos vegetais em laboratório, com aplicações em estudos de metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução clonal, massal ou não (LAKSHMANAN et al., 2005). Aliado a isso, pode ser empregada na produção de metabólitos secundários de interesse e aplicações terapêuticas e que, por algum impedimento, não são sintetizados (ARNALDOS et al., 2001; PEREIRA, 2003), ou a produção é não satisfatória e/ou onerosa.

As técnicas de cultivo *in vitro* são relevantes como alternativas às limitações em métodos convencionais de multiplicação de plantas, a exemplo das sementes com características recalcitrantes e/ou que apresentam dormência. De acordo com Pinhal et

al. (2011) o cultivo *in vitro* possibilita a produção de plantas micropropagadas em larga escala, além de fazer inclusão de espécies em bancos de germoplasma e possibilitar a troca de recursos genéticos entre instituições.

Vários fatores determinam o sucesso do cultivo *in vitro*, o que inclui a qualidade da planta matriz e sua condição de cultivo, além de fatores inerentes ao ambiente de cultivo *in vitro*, escolha do explante (meristemático ou não) e composição do meio de cultura. No caso do explante, a utilização do embrião zigótico destaca-se, pois, apresenta tecidos meristemáticos, natureza juvenil e alto potencial regenerativo (HU; FERREIRA, 1998), o que possibilita a elucidação de aspectos fisiológicos de desenvolvimento *in vitro* (TRIQUES et al., 1997). Além disso, garante a uniformidade e o controle asséptico do material vegetal, dessa forma, auxilia em trabalhos de micropropagação, os quais vêm se destacando na cultura de tecidos pela ampla aplicação prática (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A eficiência da cultura *in vitro* de embriões depende de fatores inerentes à espécie vegetal e/ou condições artificiais impostas ao explante. Os fatores mais citados pela literatura incluem: maturidade fisiológica do fruto e semente, protocolo de desinfestação, habilidade do manipulador na excisão do embrião, condições ambientais de cultivo, qualidade de luz, composição orgânica e inorgânica do meio de cultura e adição de fitoreguladores (NEVES et al., 2002).

A aplicação das técnicas e métodos de cultura de tecidos vegetais é citada em espécies da família Euphorbiaceae e do gênero *Croton*, a saber: micropropagação de *Croton antisiphiliticus*, subarbusto conhecido como pé-de-perdiz e alcanfoeira (OLIVEIRA et al., 2011); indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água (*Croton urucurana* Bail.) (LIMA et al., 2006); micropropagação em grande escala de *Croton sublyratus* Kurz. (SHIBATA et al., 1996); organogênese a partir de embrião zigótico de *Hevea brasiliensis* (MICHAUX-FERRIÈRE et al., 1992).

2.4 MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS

A micropropagação é indicada para as plantas que apresentam potencial econômico e científico (OLIVEIRA et al., 2011; PIATTI et al., 2011), além de ser amplamente utilizada no controle e prevenção de disseminação de pragas e doenças, especialmente em plantas de propagação vegetativa (MAFIA et al., 2012; ZUZARTE et al., 2010; REIS et al., 2009). Essa técnica contribui significativamente quando os

métodos de propagação convencionais são inviáveis do ponto de vista regenerativo de espécies vegetais que apresentam limitações de reprodução natural. Além disso, possui relevância na limpeza clonal e conservação em bancos de germoplasma de espécies exóticas e nativas (MACHADO et al., 2013; PIATTI et al., 2011).

Para o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação, cada espécie requer a definição do melhor meio de cultura, tipo e origem do explante (COSTA et al., 2007; JESUS et al., 2010; SUZUKI, 2010) condições de cultivo entre outros fatores. Além disso, o crescimento e desenvolvimento vegetal são controlados por hormônios vegetais, sintetizados pela planta, como também pela utilização de reguladores de crescimento, que funcionam como inibidores ou estimulantes. Sendo assim, a indução de novas brotações a partir de gemas axilares é intensificada pela adição de citocininas ao meio de cultivo (AREMU, et al., 2012), sendo o BAP (6-benzillaminopurina) a mais utilizada devido seu custo benefício (ASMAR et al., 2011).

As plantas cultivadas *in vitro* também são influenciadas pelas condições do ambiente no interior dos recipientes de cultivo, que na maioria das vezes desencadeiam estresse, podendo ocorrer desenvolvimento anormal na estrutura dos tecidos formados e no metabolismo celular. Como consequência, desordens morfofisiológicas são observadas durante a micropropagação de plantas, como por exemplo, a hiperidricidade, causada entre outros fatores, pela elevada umidade relativa dentro dos recipientes, dosagem alta de carboidrato e reguladores de crescimento, baixa intensidade de luz (PALMA, et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2012).

2.5 HIPERIDRICIDADE

A hiperidricidade é uma das principais anormalidades observadas em plantas cultivadas *in vitro* (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2011). É um distúrbio morfofisiológico caracterizado por retenção excessiva de água no interior das células e tecidos (VASCONCELOS et. al., 2012; TIAN et al., 2017), resultando em dificuldades na multiplicação e diferenciação celular, ausência ou reduzida formação de raízes e alta mortalidade do material *in vitro* ou *ex vitro*, principalmente na fase de aclimatização.

Este fenômeno, além de causar danos econômicos (GAO et al., 2018), limita as aplicações dos métodos de pesquisas científicas uma vez que compromete o desenvolvimento das plantas. As características fenomenológicas deste distúrbio já

foram mencionadas e estudadas em várias espécies vegetais (TIAN et al., 2015; GAO et al., 2017; TABART et al., 2015; VAN DEN DRIES et al., 2013). Para melhor compreensão e caracterização da hiperidricidade, serão abordadas as características morfoanatômicas, fisiológicas, bioquímicas, como também as principais causas e métodos de controle.

2.5.1 Aspectos morfoanatômicos

Plantas e brotações hiperídricas apresentam caules e folhas túrgidos, espessos, enrugados, torcidos, translúcidos, rígidos e facilmente quebráveis (GAO et al., 2017; LIU et al., 2017; BARBOSA, et al., 2013; TIAN et al., 2015), além de encurtamento dos entrenós e excesso de água no interior dos tecidos (VASCONCELOS et. al., 2012; TIAN et al., 2017). Os caules exibem hipertrofia do parênquima cortical e medular, hipolignificação, diminuição ou aspecto anormal do sistema vascular, vasos e traqueídes pouco lignificados (KEVERS; GASPAR, 1986, BERNARD et al., 2015). Nas brotações observa-se tricomas epidérmicos deformados, estômatos fechados na superfície caulinar, colapso nos tecidos vasculares, parede celular pouco espessada nas células corticais e cilindro vascular desordenado (GAO et al., 2017).

Os brotos altamente hiperídricos apresentam caules túrgidos e folhas enroladas (retorcidas), multiplicam-se com dificuldade, são curtos e quebradiços e as folhas enrugadas são amareladas e as plantas podem apresentar crescimento lento (TIAN et al. 2015). Ademais, as folhas hiperídricas possuem um tecido epidérmico imperfeito com uma fina cutícula intermitente, pouca ou nenhuma cera epicuticular e mau funcionamento dos estômatos (GAO et al., 2017, 2018; BARBOSA, et al., 2013; IVANOVA; STADEN, 2010). O tecido paliádico é reduzido, o mesofilo com aspecto esponjoso e com grandes espaços intercelulares, além disso, as células epidérmicas são enrugadas, as células guarda danificadas, estômatos irregulares com abertura reduzida, células do mesofilo maiores, paredes finas, núcleo deformado, perda de nucléolos, estrutura da membrana desintegrada, aumento do volume de vacúolos, menor número de mitocôndrias, lamela do tilacóide desorganizada, diminuição do grão de amido no cloroplasto e presença de vesículas sugerindo a ocorrência de autofagia (GAO et al., 2018; ZEN et al., 2016).

A hiperidricidade ocorre também em calos e embriões zigóticos e somáticos. Calos hiperídricos têm aspecto vítreo e aquoso e, em geral, não possuem totipotência celular, portanto, sem capacidade regenerativa, constituídos de células do parênquima sem elementos do xilema (KEVERS et al., 2004). As alterações anatômicas nos tecidos hiperídricos estão relacionadas com diversas características fisiológicas e bioquímicas, algumas das quais comentadas a seguir.

2.5.2 Aspectos fisiológicos e bioquímicos

Estresses causados por fatores bióticos e abióticos têm como consequência o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem ocasionar distúrbios metabólicos, alteração no sistema redox, danos a macromoléculas e a estrutura celular (GILL; TUJEDA, 2010). O estresse oxidativo relaciona-se com a hiperidricidade, pois nas plantas hiperídricas observa-se aumento nos teores de peróxido de hidrogênio, com a peroxidação de lipídios e aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidativo (TIAN et al., 2015).

No cultivo *in vitro*, as plantas hiperídricas se adaptam preservando sua homeostase redox e diminuindo o gasto de energia através da diferenciação celular (FRANCK et al., 2001). Esse processo pode causar perda irreversível da capacidade morfogênica e o estabelecimento de um estado neoplásico das células, ocasionando necrose do meristema apical (GASPAR et al., 1998; GASPAR et al., 2000).

A hiperidricidade pode ocasionar alterações enzimáticas na ACC-sintase, fenilalanina amonioliase (PAL) e peroxidases. Sendo a ACC-sintase responsável pela conversão da S-adenosilmetionina (SAM) em ACC, que é oxidado a etileno. Como a enzima PAL também é responsável pela síntese de lignina, explica-se a ocorrência de falha na biossíntese desse polímero em tecidos hiperídricos (GAO et al., 2017; PIQUERAS et al., 2002). A água formada em volta das células limita a difusão do oxigênio, ocasionando hipoxia, formação de peróxido de hidrogênio em níveis tóxicos e estresse oxidativo. A hipoxia, além de comprometer a respiração, reduz a disponibilidade de ATP devido a fosforilação oxidativa e, energeticamente no metabolismo de plantas, observa-se níveis baixos na produção de energia química na forma de nucleotídeos de piridina, NADPH, NADH e ATP, podendo estar associada a baixos teores de clorofila e atividade de enzimas da via oxidativa das pentoses-fosfato e da glicólise (FRANCK et al., 2001).

Análises de fluorescência da clorofila em folhas hiperídricas indicam redução do processo fotoquímico no fotossistema II, o que compromete a capacidade fotossintética devido aos menores teores de clorofila (ZEN et al., 2016). As partes aéreas propagadas *in vitro* estão sob contínua condição de estresse, ocasionando aumento na taxa de produção de espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($\cdot OH$), oxigênio singlete (1O_2), podendo estes provocar danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (GASPAR et al., 2002; ORCHATT et al., 2002).

Para controlar os níveis de ROS, as plantas desenvolveram um sistema antioxidativo composto por enzimas e metabólitos que auxiliam nos danos, garantindo a funcionalidade normal da célula (ANJUM et al., 2011). As principais enzimas que atuam nesse processo são a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e peroxidases (POD) (MITTLER et al., 2004).

2.5.3 Causas e métodos de controle da hiperidricidade

Plantas são cultivadas *in vitro* em ambiente com elevada disponibilidade de água, acrescido de macro e micronutrientes, reguladores de crescimento, vitaminas e açúcares prontamente disponíveis, os quais fornecem 95% de nutrientes e energia para os explantes. Na literatura observa-se diferentes microclimas *in vitro*, que diferem em função das condições requeridas (LAI et al., 2005) e as especificidades dos explantes, que associados à constituição do meio de cultura resultam no complexo multifatorial conhecido como hiperidricidade (LIU et al., 2017).

Dentre os fatores de impacto estão os explantes, genótipo, idade fisiológica, tipo de órgão (FEI; WEATHERS, 2015; MAYOR et al., 2003; VASUDEVAN; VAN STADEN, 2011), componentes nutricionais do meio de cultura, reguladores de crescimento, agentes gelificantes (IVANOVA; VAN STADEN, 2008; VASUDEVAN; VAN STADEN, 2011), condições do ambiente como intensidade e qualidade de luz e capacidade de trocas gasosas entre o interior do recipiente e a atmosfera *ex vitro* (IVANOVA; VAN STADEN, 2010; SAEZ et al., 2012), substâncias como SA, polietilenoglicol (PEG 6000), H_2O_2 e íons prata (Ag^+) (HASSANNEJAD et al., 2012; SEM; ALIKAMANOGLU, 2013; TIAN et al., 2015; VINOTH; RAVINDHRAN, 2015).

Entre os métodos de controle da hiperidricidade estão seleção de genótipo ou órgão vegetal (VASUDEVAN; VAN STADEN, 2011), redução da concentração de NH_4^+ ,

citocininas e/ou auxinas no meio de cultura, aumento na concentração de cálcio, ferro e magnésio (IVANOVA; VAN STADEN, 2009; MACHADO et al., 2014; VASUDEVAN; VAN STADEN, 2011), uso de estratégias que promovam melhorias no microambiente de cultivo com consequente diminuição da umidade relativa dentro dos frascos (SAEZ et al., 2012; SALEM, 2016), aplicação de compostos anti-etileno ao meio de cultura, tais como AgNO_3 , SA, CoCl_2 (GAO et al., 2017; HASSANEIN et al., 2017; WANG; LI; ECKER, 2002, MIRZA et al., 2015; ISAH 2015). Os aspectos mencionados na literatura, tratam sobre prevenção e reversão da hiperidricidade no cultivo *in vitro* independente do explante, dessa forma o desenvolvimento de métodos para prevenir é importante uma vez que reduz perdas econômicas e desperdício de recursos (GAO et al., 2017) além de auxiliar nas pesquisas científicas.

Os métodos de prevenção dependem da espécie, pois as exigências nutricionais e o ambiente de cultivo podem variar de espécie para espécie (LIU et al., 2017), e a regularidade da ocorrência de hiperidricidade em espécies específicas deve ser estudada individual e compreensivamente.

2.6 SISTEMAS DE VEDAÇÃO DOS RECIPIENTES

Os sistemas convencionais utilizados para fechamento dos recipientes no cultivo *in vitro* de plantas têm por objetivo evitar a contaminação por microrganismos, dessecação dos tecidos e evaporação da água do meio de cultura. Como consequência, podem restringir as trocas gasosas entre o ambiente interno e externo, o que ocasiona um microambiente propício à alta umidade e danos morfofisiológicos e anatômicos ao material vegetal cultivado. Plantas mantidas em sistemas convencionais de vedação têm redução nas taxas de transpiração e transporte de íons dependentes do fluxo de massa (SALDANHA, et al., 2012), redução no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes (CHA-UM; ULZIIBAT; KIRDMANEE, 2010), aumento da concentração interna de gases como etileno que em altas concentrações desencadeiam processos que contribuem para desordens morfofisiológicas como a hiperidricidade (SAHER et al., 2004) e consequentemente o desenvolvimento das plantas.

De forma contrária, os sistemas de vedação que permitem maiores trocas gasosas, pela abertura parcial dos tubos ou utilização de membranas permeáveis aos gases, favorecem o crescimento e desenvolvimento das plantas (IAREMA et al.,

2012), uma vez que reduz a umidade, evita acúmulo de gases, além de fornecer o aumento da concentração de CO₂, favorecendo a expansão foliar, maiores atividades fotossintéticas e prevenção de desordens morfofisiológicas (PINHEIRO et al., 2013; GAO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2012). Além disso, ao evitar o acúmulo de gases, são observados aumento e melhoria do fluxo transpiratório, como também maior sobrevivência das plantas na fase de aclimatização (NEPOMUCENO et al., 2009).

Os tipos de vedações aplicados ao cultivo de plantas *in vitro* incluem tampões de algodão, de espuma de poliuretano, papel de alumínio, tampa de aço inoxidável, tampa de polipropileno, filme PVC (policloreto de vinil) entre outras alternativas (SALDANHA, et al., 2012; RIBEIRO, et al., 2007). Neste contexto, vários experimentos foram propostos e avaliados para analisar a influência do tipo de vedação dos recipientes no cultivo *in vitro* sobre características relacionadas ao crescimento, desenvolvimento, aspectos anatômicos e fisiológicos do material cultivado *in vitro*.

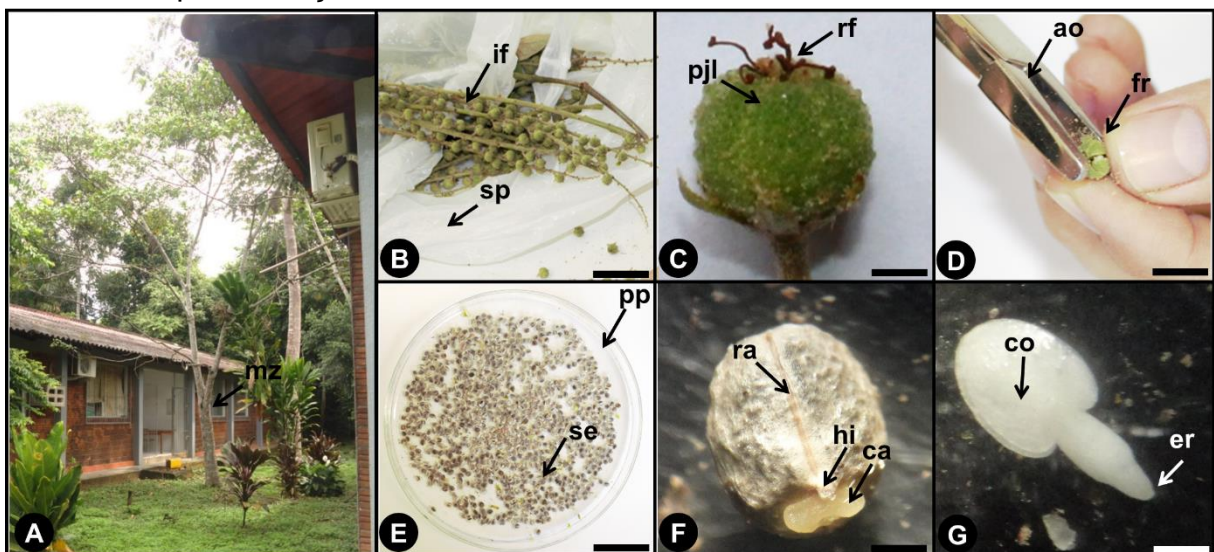
3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, utilizando-se a espécie Sangue de dragão (*Croton lechleri*). Dois experimentos foram conduzidos, o primeiro para avaliar os efeitos do sistema de vedação associado ao tipo de explante, e o segundo para quantificar e comparar as consequências da hiperidricidade na anatomia e fisiologia de *C. lechleri* propagado *in vitro*.

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Embriões zigóticos foram utilizados como explante. Para tanto, infrutescências com frutos em estágio fisiológico próximo a deiscência, caracterizados por mesocarpo esverdeado e presença de remanescentes florais, foram coletados de uma matriz, localizada nas coordenadas 9°57'27.1"S, 67°52'29.2"W no Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre. Após a coleta, as infrutescências foram conduzidas até o laboratório e, com auxílio de alicate odontológico e pinça, os frutos foram abertos manualmente para a retirada das sementes. Visando a padronização, as sementes foram classificadas e selecionadas de acordo com a coloração marrom do tegumento (Figura 1).

Figura 1 - Material botânico e procedimentos utilizados para a obtenção e padronização das sementes de *Croton lechleri*, Rio Branco, Acre

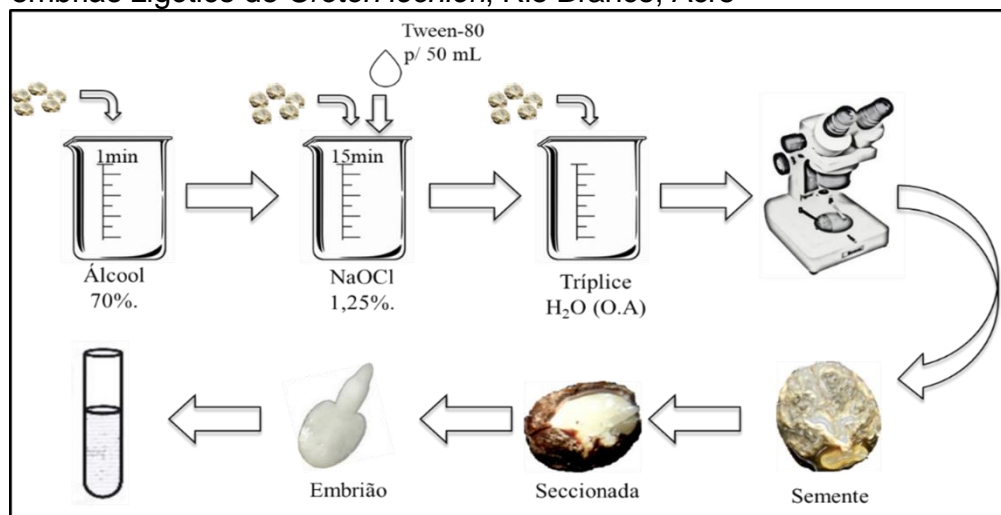


Notas: A: Matriz; B: infrutescência; C: fruto; D: fruto sendo aberto; E: sementes padronizadas em placa de petri; F: semente; G: embrião zigótico individualizado; mz: matriz; if: infrutescência; sp: sacola plástica; pjl: ponto de junção do loco; rf: remanescentes florais; ao: alicate odontológico; fr: fruto; pp: placa de petri; se: sementes; ra: raque; hi: hilo; ca: carúncula; co: cotilédones; er: eixo radicular. Barras: A, B e C: 1 mm; D, E, F, G: 1 cm.

3.2 ESTABELECIMENTO DE PLANTAS *IN VITRO* E CONDIÇÃO DE CULTIVO

Inicialmente, sob condição de fluxo laminar, as sementes foram submersas em álcool etílico 70 % (v/v) durante 1 minuto, seguida de 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (1,0 a 1,25% de cloro ativo v/v), contendo uma gota de Tween-80 para cada 50 mL dessa solução, ambas as etapas com homogeneização da solução mediante agitação manual. Por fim, o material foi lavado três vezes com água de osmose reversa e autoclavada para a remoção de resíduos dos agentes desinfetantes. Posteriormente, com o auxílio de um estereomicroscópio, pinça e bisturi, as sementes foram seccionadas para a extração do embrião zigótico, sendo este imediatamente transferido para tubo de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura (Figura 2).

Figura 2 - Esquema do processo de desinfestação das sementes e extração do embrião zigótico de *Croton lechleri*, Rio Branco, Acre



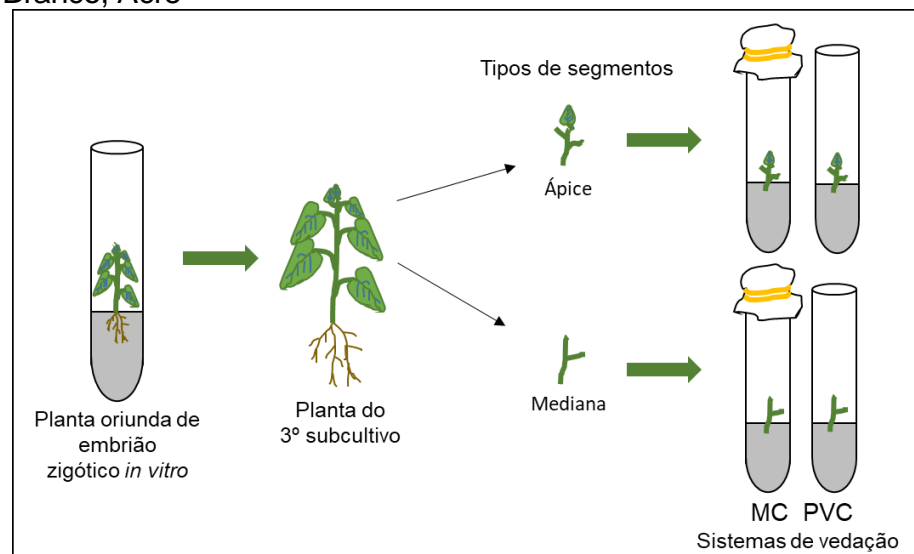
O meio de cultura consistiu da formulação de QL (QUOIRIN; LEPROIVRE, 1977) adicionado de sacarose (30 g.L^{-1}), pH $5,8 \pm 0,1$, solidificado com Phytigel ($2,2 \text{ g.L}^{-1}$). O processo de esterilização do meio de cultura foi por autoclave de calor úmido a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e $1,3 \text{ atm}$ de pressão por 20 minutos. Nos primeiros sete dias os embriões zigóticos foram mantidos no escuro para minimizar possíveis problemas de oxidação, depois transferidos para sala de cultivo à temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e 16 horas de fotoperíodo, fornecido por duas lâmpadas fluorescentes tubulares de 20 W mantidas a 25 cm de distância dos tubos de ensaio.

Decorridos 35 dias do estabelecimento *in vitro*, as plantas formadas foram submetidas a três subcultivos, a intervalos de 35 dias, mediante a transferência dos segmentos caulinares para meio fresco.

3.3 EXPERIMENTO 1

Para avaliar o efeito do sistema de vedação e tipo de explantes na propagação *in vitro* de *C. lechleri*, utilizou-se segmentos da região mediana com uma gema axilar ou apical com um primórdio foliar, ambos com aproximadamente 1 cm de comprimento, provenientes de plantas do terceiro subcultivo (Item 3.2). Foi utilizado o meio QL, acrescido de AIB ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), 30 g.L^{-1} de sacarose, pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, solidificado com 7 g.L^{-1} de Agar. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2×2 , apresentados por dois sistemas de vedação dos tubos (MC: tecido de máscara cirúrgica tripla e PVC: plástico filme de policloreto de vinila) e dois tipos de explantes (apical e mediano), em delineamento inteiramente casualizado (Figura 3). As condições da sala de cultivo foram semelhantes às descritas no item 3.2.

Figura 3 - Esquema representativo do material vegetal e tratamentos (tipo de explante e sistema de vedação) utilizados na propagação *in vitro* de *Croton lechleri*, Rio Branco, Acre

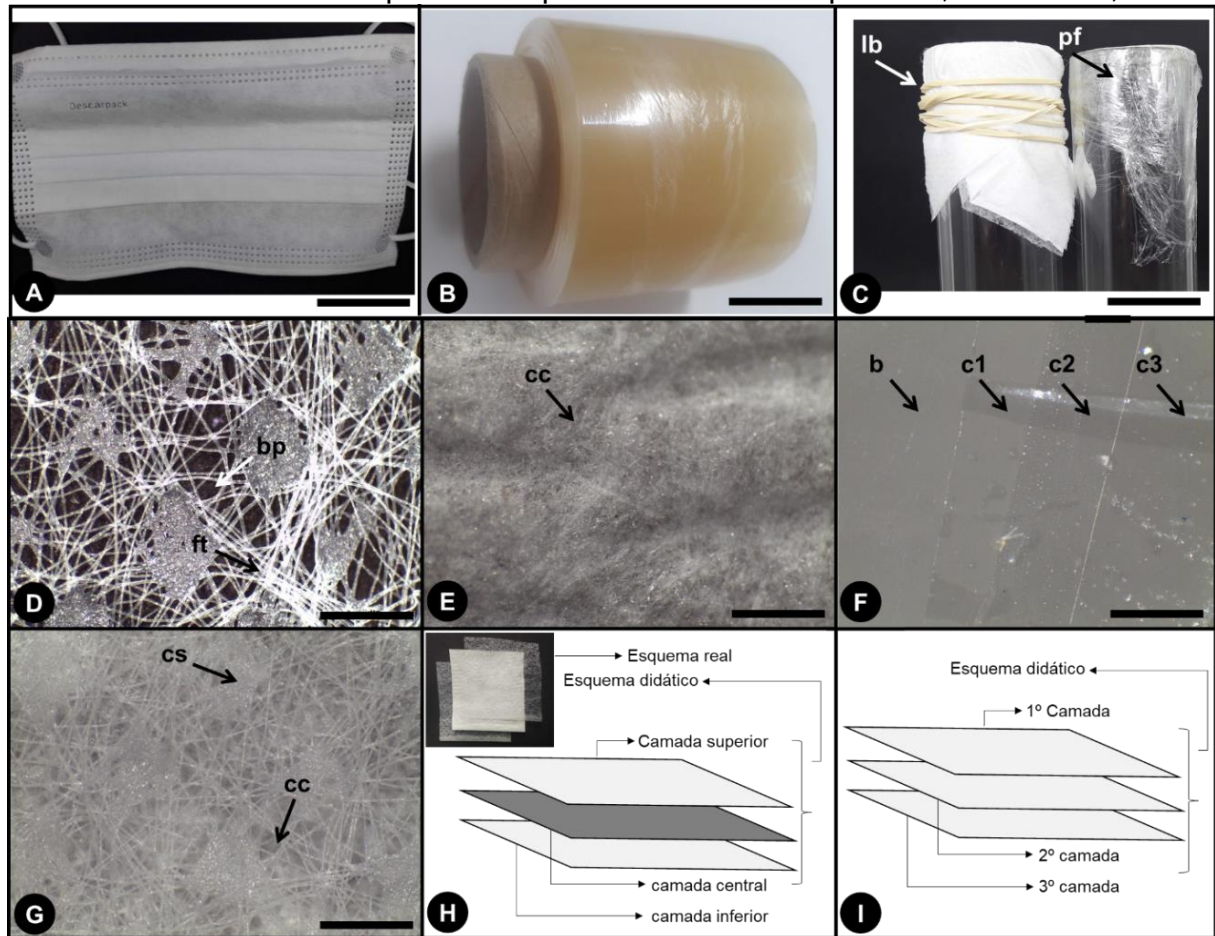


3.3.1 Descrição dos sistemas de vedação e caracterização dos materiais utilizados nas trocas gasosas

O sistema de vedação alternativo, constituído pela máscara cirúrgica (MC), foi obtido a partir de fragmentos de 7 cm^2 contendo as três camadas de tecidos (Figura 4), que depois de seccionados foram autoclavados por 20 minutos. Posteriormente, sob condição de fluxo laminar, cada fração da máscara foi individualizada e fixada ao tubo de ensaio com auxílio de liga de borracha (Figura 4 C). A máscara utilizada consistiu de três camadas, duas mais externas e mais porosas (Figura 4 D), e uma central de

menor porosidade (Figura 4 E). O sistema proposto no presente estudo, consistiu de um método alternativo e inédito, com menor custo e maior acessibilidade quando comparado às membranas importadas e aos demais sistemas alternativos já desenvolvidos.

Figura 4 - Máscara cirúrgica com tripla camada (MC) e filme de PVC (PVC), utilizados como vedação na propagação *in vitro* *Croton lechleri*, e imagens estereomicroscópicas da superfície de cada componente, Rio Branco, Acre



Notas: A: máscara cirúrgica com tripla camada; B: plástico filme de policloreto de vinila; C: sistema de vedação MC e PVC; D: estereomicrografias das camadas inferior e superior; E: tecido da camada central; F: camadas de PVC sobrepostas ou não; G: máscara intacta (com tripla camada); H: esquema didático das camadas que compõe a máscara; I: esquema didático das camadas que compõe o sistema de vedação PVC; lb: liga de borracha; pf: plástico filme; ft: fibras; bp: base preta; cc: fibra da camada central; b: base; c1, c2 e c3: camadas de PVC; cs: camada superior. Barra: A, B e C: 2 cm – D, E, F e G: 1000 μ m.

O segundo tipo de vedação foi obtido pela sobreposição de três camadas de filme de policloreto de vinila (PVC) (Figura 4 F). A caracterização dos materiais usados nos sistemas de vedação foi realizada com auxílio de um estereomicroscópio Leica® modelo EZ4 HD. Para tanto, as imagens foram obtidas a partir dos componentes isolados e em conjunto.

3.3.2 Taxa de perda de vapor d'água

Os tubos de ensaio com os tipos de vedação foram caracterizados quanto a taxa de perda de vapor d'água em condições de sala de crescimento (item 3.2) utilizando um método gravimétrico. Para tanto, os tubos selados com máscara cirúrgica (MC) ou policloreto de vinila (PCV), e contendo 10 mL de meio de cultura, foram pesados em balança analítica (0,0001 g) a cada sete dias e a perda de massa calculada por 60 dias.

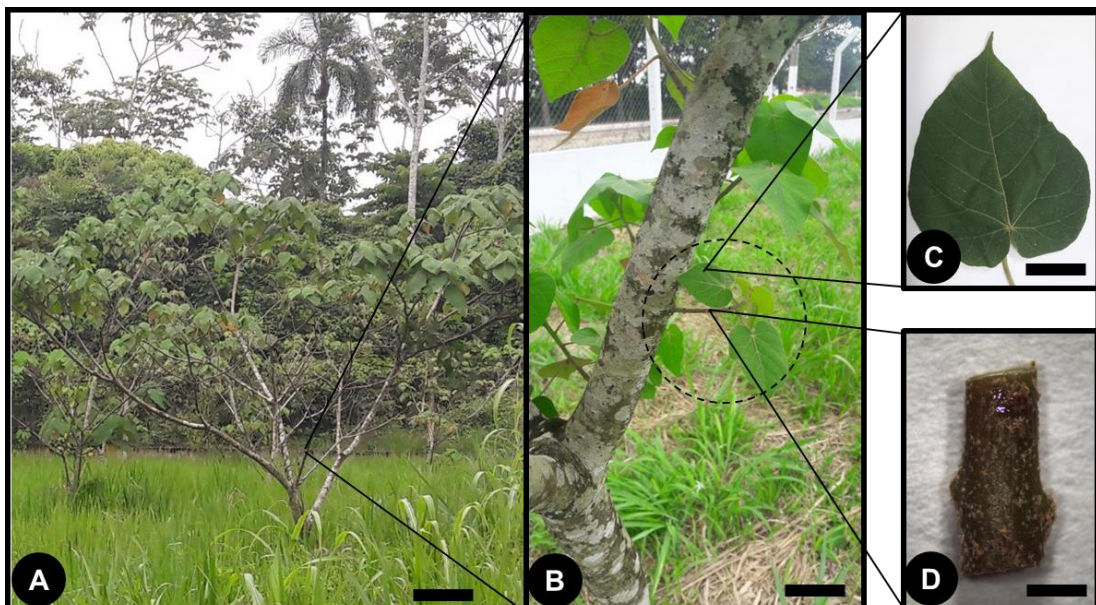
3.3.3 Características de crescimento

Decorridos 60 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o número de folhas expandidas (NF), o número (NR) e comprimento de raízes (CR) por broto inicial.

3.5 EXPERIMENTO 2

Para realização da comparação anatômica de plantas normais, hiperídricas e revertidas cultivadas *in vitro*, utilizou-se plantas de *Croton lechleri* cultivadas em campo experimental (*in vivo*). Para tanto, coletou-se brotações caulinares das plantas, as quais foram seccionadas para obtenção de folha e caule (Figura 5).

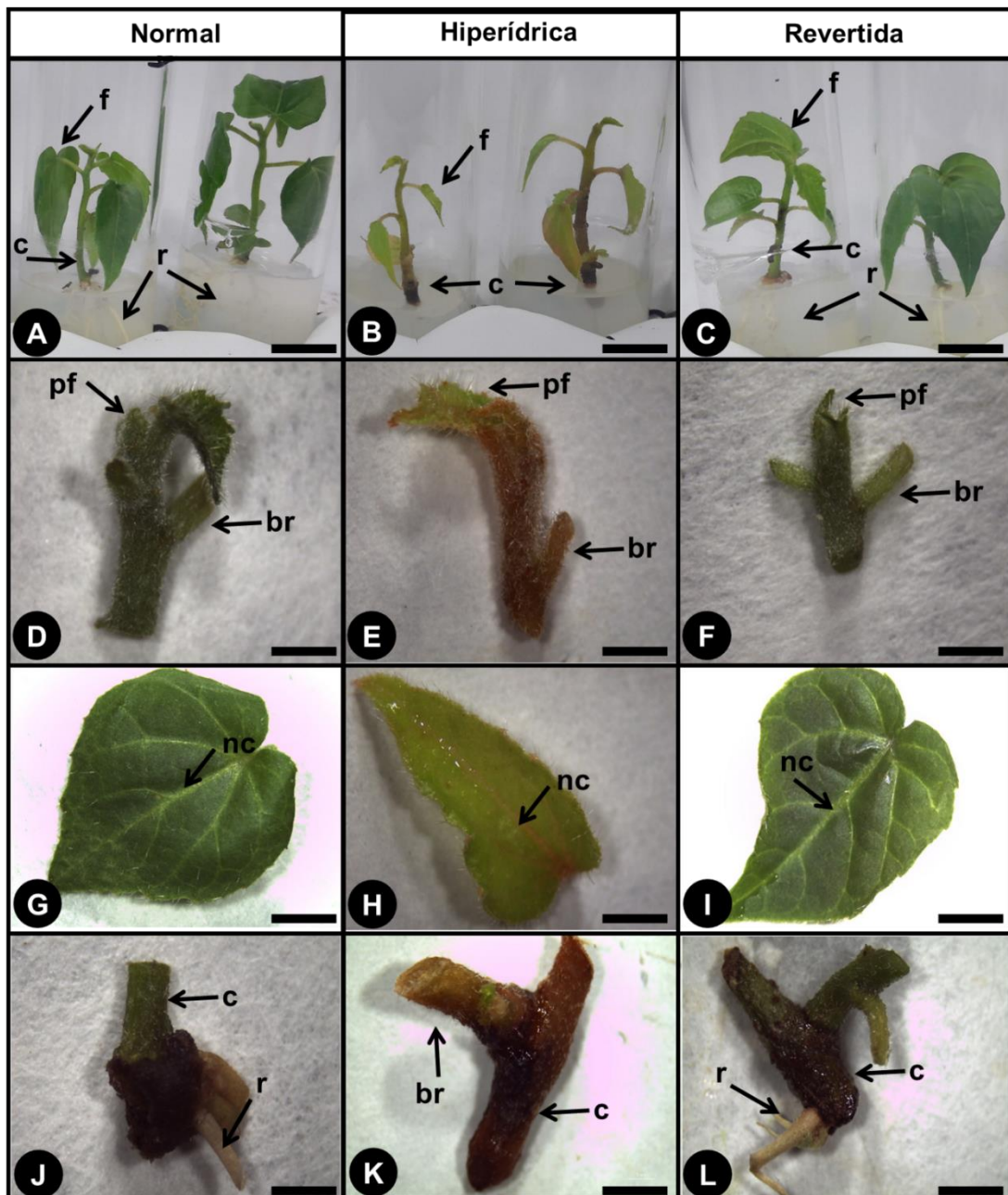
Figura 5 - Plantas matrizes de *Croton lechleri*, oriundas do desenvolvimento de embriões zigóticos *in vitro* e cultivadas a campo (*in vivo*), usadas nos estudos anatômicos, Rio Branco, Acre



Notas: A: planta *in vivo* (campo); B: detalhe da brotação com caule em estrutura primaria e folha; C: folha; D: caule da brotação ampliados; Barras: A: 0,5 m; B: 5 cm; C: 2 cm; D: 5mm.

Para comparação anatômica e fisiológica utilizou-se plantas em condição normal, hiperídrica e revertida, oriundas de um experimento de reversão da hiperidricidade. Para tanto coletou-se folhas, entre o 3º e 4º nós no sentido ápice-base de forma a se obter folhas completamente expandidas, ápice e caule de plantas *in vitro* nas condições citadas acima (Figura 6).

Figura 6 - Aspecto inicial de planta normal, hiperídrica e revertida de *Croton lechleri* propagadas *in vitro*, indicando as estruturas botânicas (ápice, folhas e base caulinar) utilizadas nos estudos anatômicos, Rio Branco, Acre



Nota: A: plantas normais; B: brotação hiperídricas; C: plantas que reverteu a condição de hiperidricidade; D: folha normal; E: folha hiperídrica; F: folha revertida; G: caule normal; H: caule hiperídrico; I: caule revertido; f: folha; c: caule; r: raiz; nc: nervura central da folha; br: brotação lateral. Barras: A, B e C: 1000 µm; D, E, F, G, H e I: 100 µm.

3.4.1 Análises anatômicas

As etapas de fixação, desidratação, pré-infiltração, infiltração, polimerização e emblocamento do material vegetal, foram realizadas conforme o seguinte protocolo: fixação em solução de FAA 70% (formaldeído 37-40 %, ácido acético glacial 100 % e etanol 70 % 1:1:18 v/v) por 48 horas, as quais foram conservadas em etanol 70 % (JOHANSEN, 1940). Logo após, as amostras foram desidratadas em série alcoólica etílica crescente (70%, 80%, 90% - 100%, 100%), por uma hora cada (sob vácuo) em cada concentração; seguido de pré-infiltração com álcool etílico 100% mais resina na proporção de 1:1 por 24 horas – sendo uma hora sob vácuo; Posteriormente o material foi mantido durante 6 horas em resina pura (Historesina Leica®), com aplicação de vácuo por uma hora e 24 horas em resina pura – sendo uma hora sob vácuo. Por fim, foi realizado a etapa de infiltração com resina pura e pó ativador por 24 horas, aplicando-se 3 horas sob vácuo, seguido de polimerização e secagem em estufa à temperatura de 40 °C por 24 horas.

Em sequência, secções transversais (experimentos 1 e 2) e longitudinais (experimento 2) seriados de 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo de rotação manual (Leica®, RM212RT), que posteriormente foram distendidos sobre água e aderidas às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C. Por fim, as secções histológicas foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) e montadas com Entellan® (Merck).

As lâminas foram visualizadas e analisadas sob microscópio de luz Leica® DM750 e os resultados registrados com sistema de captura de imagem Leica® ICC50 HD. Para caracterização histológica foram considerados caracteres qualitativos (descrição das principais estruturas) e quantitativos: espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial, incluindo a cutícula (EEAD e EEAB, mm), número de células do parênquima paliçádico (NPP), espessura da camada de parênquima paliçádico e lacunoso (EPP e EPL, mm) e espessura total do limbo foliar (ELF, mm). No experimento 2, avaliou-se todos os atributos mencionados no experimento 1, acrescentando apenas a área ocupada com espaços intercelulares (EI mm²). As medidas biométricas foram realizadas com o software Fiji/Imagej.

3.4.2 Conteúdo relativo de água e dano de membrana

Para avaliar o conteúdo relativo de água (CRA), foram retiradas folhas da região mediana do caule de plantas cultivadas *in vitro* nas condições normal, hiperídrica e

revertida e pesadas para obtenção da massa fresca (MF). Em seguida, as folhas foram imersas em 20 mL de água de osmose reversa por 24 horas a 4 °C no escuro. Após esse período, foram novamente pesadas para obtenção da massa túrgida (MT). Depois, foram secas em estufa a 65 °C, com circulação forçada, até obtenção de massa constante, para aquisição da massa seca (MS). O CRA foi obtido utilizando a fórmula $CRA = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$, (CAIRO, 1995).

O dano de membrana (DM) foi estimado a partir do vazamento de eletrólitos utilizando 100 mg de folhas hiperídricas, normais e revertidas. Estas foram imersas em 10 mL de água de osmose reversa por 24 horas. Após esse período, foi medida a condutividade elétrica da suspensão (C1). Em seguida, o material foi colocado em banho-maria a 100 °C por uma hora e, após o resfriamento, realizou-se nova medição de condutividade elétrica (C2). Para obtenção do DM, utilizou-se a fórmula $DM = (C1/C2) \times 100$ (SILVA, et al., 2010).

3.4.3 Determinação dos teores de clorofilas e carotenoides

Para a determinação da concentração de clorofilas e carotenoides, amostras de 50 mg de folhas foram picotadas e inseridas em 5 mL de acetona 80 % (v/v), onde permaneceram por 48 horas no escuro sob refrigeração constante. As absorbâncias dos extratos foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de ondas de 664 nm, 646 nm e 470 nm, e os teores de pigmentos fotossintetizantes (clorofilas *a* e *b*; e carotenoides) foram estimados para os experimentos 1 e 2, conforme Lichtenthaler (1987).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das variáveis foram submetidos às verificações da presença de dados discrepantes pelo teste de Grubbs (1969), normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk (1965), e homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett (1937). Posteriormente efetuou-se a análise de variância pelo teste F. E quando o valor F indicou existir diferença entre os tratamentos, realizou-se a comparação de suas médias pelo teste de Tukey (1949) para os efeitos isolados e a interação entre os fatores estudados, além de análise de regressão para número de dias na perda de vapor d'água do experimento 1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sistemas de vedação e tipos de explantes avaliados influenciaram significativamente o crescimento e fisiologia de *C. lechleri* propagado *in vitro*, com diferenças nos aspectos de crescimento, taxa de perda de vapor d'água dos recipientes, pigmentos fotossintéticos e na anatomia foliar das plantas. Também foram constatadas diferenças significativas nas características anatômicas e fisiológicas em função da condição da planta ou brotação (normal, hiperídrica e revertida).

4.1 EXPERIMENTO 1

No presente estudo, o sistema alternativo de vedação proposto não resultou em contaminação por fungo ou bactéria. Além disso, o tecido da máscara cirúrgica permaneceu intacto quando submetido à autoclavagem. Com relação à ocorrência de hiperidricidade, não foram observados efeitos dos tratamentos aplicados. Em estudos prévios realizados com *C. lechleri*, houve elevado número de brotações hiperídricas quando segmentos caulinares oriundos do terceiro subcultivo foram cultivados sob sistema de vedação convencional (PVC). Na presente pesquisa, apenas um explante apical, cultivado em sistema PVC, exibiu sintomas de hiperidricidade. No entanto, quando as plantas formadas foram multiplicadas subsequentemente (no segundo subcultivo) sob os mesmos tratamentos, houve aumento do número de plantas hiperídricas, no sistema de vedação PVC e explante da região apical (dados não apresentados).

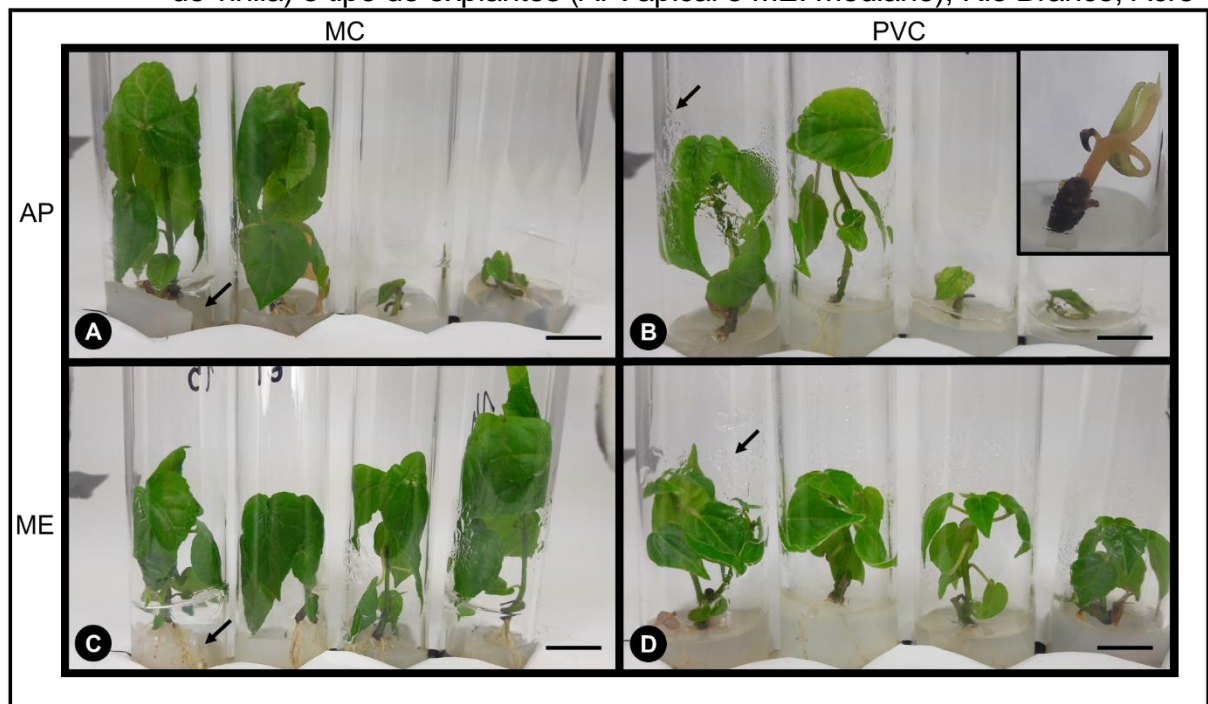
Nesse contexto, a ausência de problemas com hiperidricidade, principalmente no sistema PVC, pode estar relacionada ao reduzido número de subcultivos realizados e à variabilidade genética inerente à utilização de embriões zigóticos. Apesar do resultado observado, sabe-se que a alta umidade relativa e a baixa troca gasosa *in vitro*, comuns em sistemas convencionais de vedação, têm como consequência a redução da transpiração, absorção excessiva e acúmulo de água nos tecidos, que somados a outros fatores do meio de cultura, podem resultar em elevada porcentagem de plantas hiperídricas. Além disso, os fatores de estresse *in vitro* causam aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), com inibição do transporte de elétrons e consequente dano oxidativo aos componentes da membrana do fotossistema II (PSII) (CHAKRABARTY et al., 2006).

Acrescenta-se, ainda, que embora a hiperidricidade seja uma desordem fisiológica comum em sistemas de cultivo *in vitro*, não é previsível e depende de múltiplos fatores

que desencadeiam mudanças morfofisiológicas e anatômicas (PALMA et al., 2011). Sendo assim, o desenvolvimento de estudos acerca dos componentes do meio de cultura e tipo de vedação são essenciais para prevenir, reduzir ou reverter a condição hiperídrica (TABART et al., 2015). Vários estudos já reportaram os efeitos benéficos do aumento das trocas gasosas na redução da hiperidricidade (IVANOVA; VAN STADEN, 2009; RODRIGUES; COSTA, 2017; NETO et al., 2018).

Com relação ao crescimento das plantas, os explantes apicais resultaram na formação desuniforme das plantas, independentemente do tipo de vedação (Figura 7 A e B). Além disso, no sistema PVC, foram observadas plantas menos vigorosas e maior acúmulo de vapor d'água no interior dos tubos de ensaio (Figura 7 B e D), enquanto que segmentos caulinares provenientes da região mediana e cultivados com tecido de máscara cirúrgica tripla (MC) possibilitaram maior uniformidade e vigor das plantas (Figura 7 C).

Figura 7 - Aspecto geral das plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação (MC: tecido de máscara cirúrgica e PVC: policloreto de vinila) e tipo de explantes (AP: apical e ME: mediano), Rio Branco, Acre



Nota: A e C: plantas em sistema de vedação com tecido de máscara cirúrgica tripla (MC), oriundas de segmentos da região apical (AP) e mediana (ME) respectivamente; B e D: plantas em sistema de vedação com plástico de policloreto de vinila (PVC) oriundas de segmentos da região apical (AP) e mediana (ME) respectivamente; setas em A e C, mostrando diminuição do meio de cultura e em B e D condensação de vapor de água.

Não houve interação dos fatores analisados, porém o tipo de vedação e explante influenciou de forma isolada no crescimento das plantas. Diferenças significativas foram constatadas apenas para o número de folhas expandias (NF), número de raízes

(NR) e comprimento de raízes (CR) por brotação (Tabela 1). A altura de planta e o número de brotações não foram influenciados pelo sistema de vedação ou tipo de explante.

Tabela 1 - Número de folhas expandidas (NF), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) de plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação e tipo de explante, Rio Branco, Acre

Explante	NF			NR			CR		
	Sistema de vedação			Sistema de vedação			Sistema de vedação		
	PVC	MC	Média	PVC	MC	Média	PVC	MC	Média
AP	4,2	3,8	4,0 b	0,7	1,6	1,2 a	1,2	1,2	1,2 b
ME	4,4	5,8	5,1 a	1,2	2,2	1,7 a	2,2	2,9	2,5 a
Média	4,3 a	4,8 a		1,0 b	1,9 a		1,7 a	2,1 a	
CV (%)	48,50			103,57			101,50		

Notas: AP: região apical; ME: região mediana; PVC: plástico filme de policloreto de vinila; MC: tecido de máscara cirúrgica tripla. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Maior número de folhas e comprimento de raízes foram observados a partir de explantes da região mediana (ME), enquanto o sistema de vedação alternativo (MC) promoveu maior número de raízes (Tabela 1). Provavelmente, as melhorias observadas nas características de crescimento avaliadas foram uma consequência da maior quantidade de reservas nutritivas em explantes oriundos do segmento mediano, maior diferenciação dos tecidos vasculares e nível endógeno de hormônios. Assis e Teixeira (1998) afirmam que a concentração endógena de hormônios, promotores e inibidores, varia com a idade fisiológica e cronológica dos tecidos e cada tecido de uma mesma planta pode responder distintamente. Segundo Santos, Tamaki e Neivola (2010), a utilização de segmentos caulinares obtidos da região mediana resultou em maior número de raízes e folhas em *Acanthostachys strobilacea*, cultivado *in vitro*.

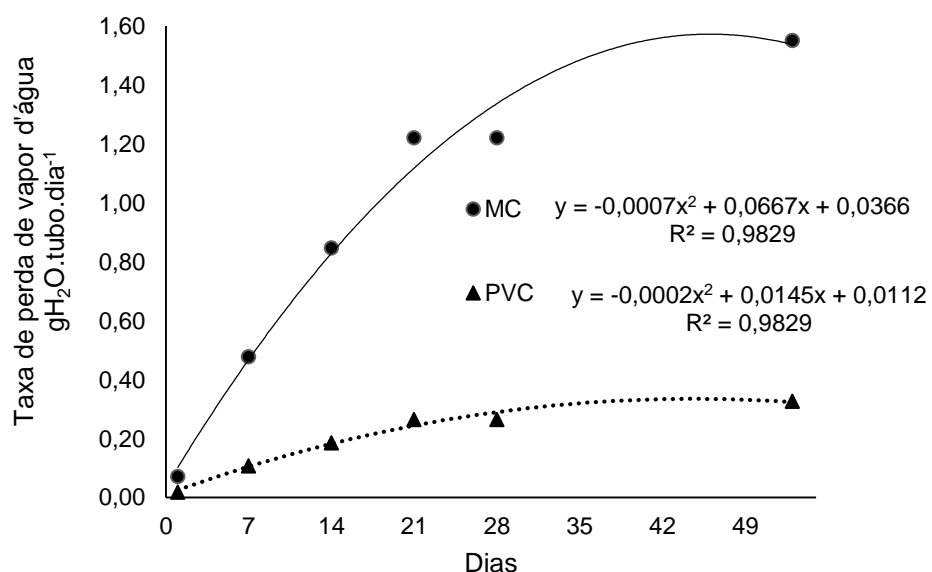
De acordo com Gould e Murashige (1985), os sistemas convencionais de cultivo *in vitro* podem contribuir para o acúmulo de produtos químicos voláteis, que reduzem a disponibilidade de oxigênio para a transpiração, com alterações na atmosfera do interior dos frascos e influência direta no crescimento e desenvolvimento das plantas. Nesse contexto, além da condição fisiológica do tipo de explante, a vedação alternativa proposta no presente estudo, com tecido de máscara cirúrgica (MC), pode ter contribuído para os resultados observados mediante a maior troca gasosa.

Melhorias no crescimento *in vitro* foram reportados por Nepomuceno et al. (2009) para *Anadenanthera colubrina* (Vell.), que observaram aumento do compri-

mento e da quantidade das raízes quando cultivados com fechamento de tampão de algodão. O uso de sistemas alternativos de vedação visando melhorias nas plantas micropropagadas é relatado em diversas espécies (ARIGITA et al., 2010; IVANOVA; VAN STADEN, 2010; KOZAI, 2010; IAREMA et al., 2012), objetivando prevenir, minimizar ou reverter a hiperidricidade (NETO et al., 2018).

Segundo Iarema et al. (2012) as trocas gasosas podem estimular o crescimento das plantas, melhorando a capacidade de absorção de nutrientes, uma vez que o transporte de íons no meio de cultura baseia-se no fluxo de seiva do xilema, que é estimulado ao reduzir a umidade nos recipientes devido a maior perda de água (SALDANHA et al., 2012). Outra característica dos sistemas alternativos de fechamento dos recipientes consiste na redução da umidade relativa no interior dos frascos, o que evita o acúmulo de gases e proporciona o aumento da disponibilidade de CO₂, com consequente melhoria da expansão foliar e maior atividade fotossintética (PINHEIRO et al., 2013; GAO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2012). Analisando a taxa de perda de vapor d'água, houve diferenças entre os sistemas de vedação, com comportamento quadrático em função do tempo de cultivo *in vitro*. Comparado à vedação com PVC, o sistema alternativo (MC) proporcionou maior permeabilidade, evidenciada pela máxima taxa de perda de vapor d'água (1,62), registrada aos 47 dias de cultivo. No sistema PVC a maior taxa de perda de vapor d'água (0,27) foi observada aos 36 dias de cultivo (Figura 8).

Figura 8 - Taxa de perda de vapor d'água, avaliada até os 53 dias de cultivo, nos tubos vedados com policloreto de vinila (PVC) e tecido de máscara cirúrgica tripla (MC), Rio Branco, Acre



A elevada troca gasosa observada no sistema alternativo proposto pode estar associada à porosidade do tecido que compõe a máscara utilizada, a qual além do menor custo, possui fácil aquisição quando comparada às membranas importadas e demais sistemas alternativos desenvolvidos por outros autores. Saldanha et al. (2012) afirmam que o número de camadas e a qualidade do material utilizado como sistema de vedação influenciam significativamente a taxa de perda de vapor d'água e a troca de CO₂ por hora, havendo maior desidratação do meio de cultura como consequência de sistemas com maior porosidade.

Semelhante ao verificado para o crescimento, houve efeito benéfico e significativo dos sistemas de vedação e tipo de explante no conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Maiores teores de carotenoides e clorofila total foram observados em sistema alternativo de vedação, enquanto maior conteúdo de clorofila *a* foi verificado em plantas formadas de explantes da região mediana no sistema MC ($p < 0,05$) (Tabela 2). Para a clorofila *b* (Chl *b*) não houve efeito dos fatores avaliados. Dessa forma, os melhores resultados em relação aos pigmentos fotossintéticos foram atribuídos ao sistema de vedação composto por tecidos obtidos da máscara cirúrgica e explantes provenientes da região mediana.

Tabela 2 - Pigmentos fotossintéticos de plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação e tipo de explante, Rio Branco, Acre

Explante	Chl a			Car			Chl total		
	Sistema de vedação			Sistema de vedação			Sistema de vedação		
	PVC	MC	Média	PVC	MC	Média	PVC	MC	Média
AP	1,49 aA	2,09 bA	1,79	0,31	0,50	0,40 a	1,92	2,70	2,31 b
ME	1,82 aB	3,29 aA	2,56	0,37	0,60	0,48 a	2,34	4,14	3,24 a
Média	1,66	2,69		0,34 b	0,55 a		2,18 b	3,45 a	
CV (%)	18,37			23,03			20,45		

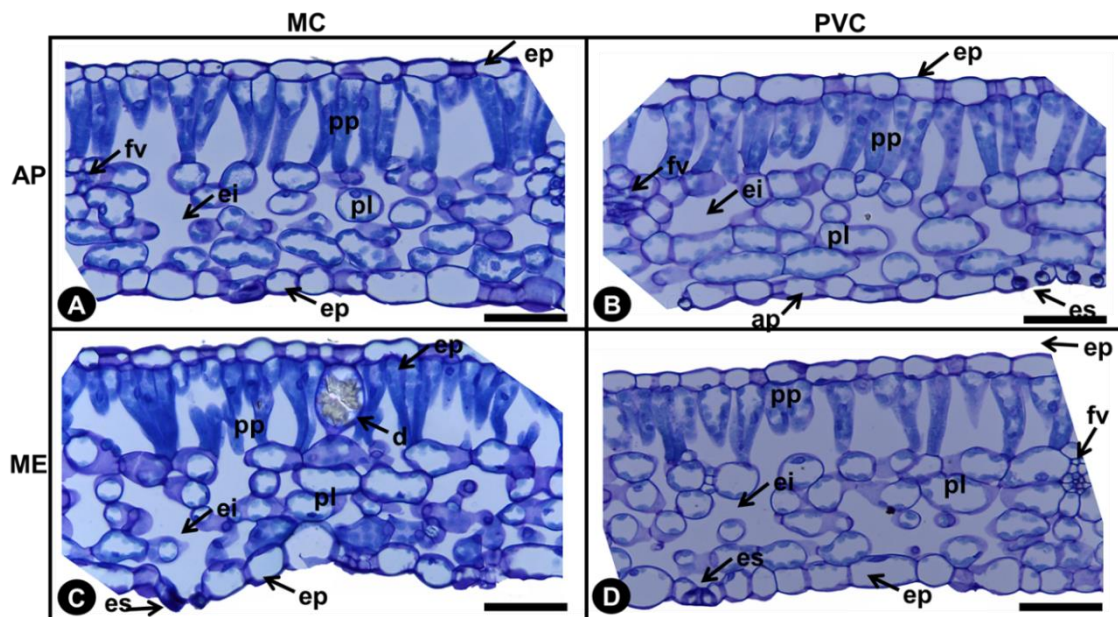
Notas: MC: sistema com tecido de máscara cirúrgica; PVC: sistema com plástico filme de policloreto de vinila. Médias seguidas de mesma letra, na coluna minúscula e na linha maiúscula, não diferem ente si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O menor conteúdo de clorofila de plantas cultivadas sob reduzidas trocas gasosas pode estar relacionado ao acúmulo de etileno no interior dos frascos de cultivo (ZOBAYED et al., 1999). De acordo com os autores, o maior teor de pigmentos fotossintéticos em plantas de *Brassica oleracea* é decorrente da inibição do etileno, como consequência da adição de nitrato de prata ao meio de cultura e ao aumento das trocas gasosas nos recipientes de cultivo. Em geral, o aumento nos níveis de

etileno na atmosfera *in vitro* está associado com a produção de peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, ao aumento na atividade de peroxidase (SAHER et al., 2004).

No presente estudo, a menor permeabilidade do sistema PVC pode ter causado acúmulo de etileno no interior dos tubos de ensaio, uma vez que sob essas condições houve menor conteúdo de pigmentos fotossintéticos, estando estes relacionados com condições de estresse. O incremento na biossíntese de pigmentos fotossintetizantes é reportado em outras espécies vegetais propagadas *in vitro* em sistemas que possibilitam o aumento das trocas gasosas (IVANOVA; VAN STADEN, 2010; MOHAMED; ALDASON, 2010; SALDANHA et al., 2012). O aumento das trocas gasosas também favoreceu significativamente a anatomia foliar de *C. lechleri*. Analisando as secções transversais foi observado que plantas formadas em sistema de vedação alternativo (MC), e provenientes de explantes apical (AP) e mediano (ME), tiveram idioblastos como drusas, limbo foliar e parênquima paliçádicos maiores, contínuos e uniformes (Figura 9 A e C). Por outro lado, plantas formadas no sistema de vedação PVC evidenciaram descontinuidade e menor número de células do parênquima paliçádico, menor espessura do limbo foliar e da camada de parênquima paliçádico. Estes resultados estão em concordância com o menor crescimento e conteúdo de pigmentos observados em sistema convencional de vedação (PVC).

Figura 9 - Secções transversais do limbo foliar de plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistemas de vedação e tipo de explante, Rio Branco, Acre



Notas: A e B: região apical; C e D: região mediana; PVC: plástico filme; MC: tecido de máscara cirúrgica tripla; ep: epiderme; es: estômatos; ei: espaço intercelular; fv: feixe vascular; pl: parênquima lacunoso; pp: parênquima paliçádico; d: drusa. Barras: A, B, C e D: 50 μ m.

Quanto às características biométricas avaliadas, houve apenas efeitos isolados para o sistema vedação e tipo de explante. A espessura da camada de parênquima lacunoso (EPL), e espessura das epidermes adaxial (EEAD) e abaxial (EEAB) não foram significativamente influenciadas pelos fatores em estudo. Diferenças significativas entre os tratamentos aplicados foram verificadas para o número de células do parênquima paliçádico (NPP), espessura da camada de parênquima paliçádico (EPP) e espessura do limbo foliar (ELF) (Tabela 3).

Tabela 3 - Anatomia foliar de plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação e tipos de explante, Rio Branco, Acre

Explante	NPP (nº)			EPP (mm)			ELF (mm)		
	Sistema de vedação			Sistema de vedação			Sistema de vedação		
	PVC	MC	Média	PVC	MC	Média	PVC	MC	Média
AP	12,0	13,0	12,5 a	0,03	0,04	0,03 b	0,10	0,11	0,10 a
ME	12,5	16,5	14,5 a	0,04	0,05	0,04 a	0,11	0,12	0,11 a
Média	12,2 b	14,7 a		0,03 b	0,04 a		0,10 b	0,11 a	
CV (%)	15,12			13,97			11,27		

Notas: PVC: plástico filme; MC: tecido de máscara cirúrgica tripla; AP: região apical; ME: região mediana; NPP: número de células do parênquima paliçádico; EPP: espessura do parênquima paliçádico; ELF: espessura do limbo foliar. Médias seguidas de mesma letra não diferem ente si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O sistema alternativo de vedação (MC) resultou em aumento do número de células, maior espessura da camada de parênquima paliçádico e maior espessamento do limbo foliar (Tabela 3). Quanto ao tipo de explante, as diferenças foram observadas apenas para a espessura da camada de parênquima paliçádico (EPP), significativamente maior para explantes da região mediana. O NPP e ELF não diferiram ($p > 0,05$) entre os explantes, mas os segmentos medianos promoveram as maiores médias.

Melhorias na anatomia de plantas arbóreas cultivadas *in vitro* sob sistemas alternativos de vedação são reportadas por Moreira (2008). Segundo esse autor, a utilização de tampas com membranas milipore® promoveu maior espessura das epidermes adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e lacunoso e limbo foliar de plantas de *Annona glabra*. O aumento do número de células e o maior espessamento do parênquima paliçádico, observados no presente estudo, são importantes por estar estritamente relacionados ao processo fotossintético e à sobrevivência das plantas micropropagadas na fase de aclimatização.

Silva et al. (2014) ao estudarem o crescimento e anatomia foliar de *Cattleya walkeriana* cultivada *in vitro* em ambiente com ventilação natural, observaram efeitos significativos como a maior espessura do mesófilo foliar e crescimento das plantas. Segundo Zobayed, Armstrong e Armstrong (2001) a utilização de sistemas de vedação com maiores trocas gasosas tem como consequência o aumento nos níveis de CO₂, com benefícios à anatomia foliar de plantas de tabaco e couve-flor.

A maior permeabilidade proporcionada por sistemas de cultivo auxilia no desenvolvimento dos tecidos devido à redução do efeito tóxico provocado pelo acúmulo de gases (DAMIANI; SCHUCH, 2009). Esses resultados diferem do que ocorre nos sistemas convencionais, nos quais observa-se dificuldade de trocas gasosas, que influenciam a estrutura e morfologia das células e tecidos (PARK et al., 2004; SANTANA et al., 2008). Além disso, segundo Mills et al. (2004) ambientes com maior transpiração favorecem um desenvolvimento melhor do sistema vascular e anatômico das plantas.

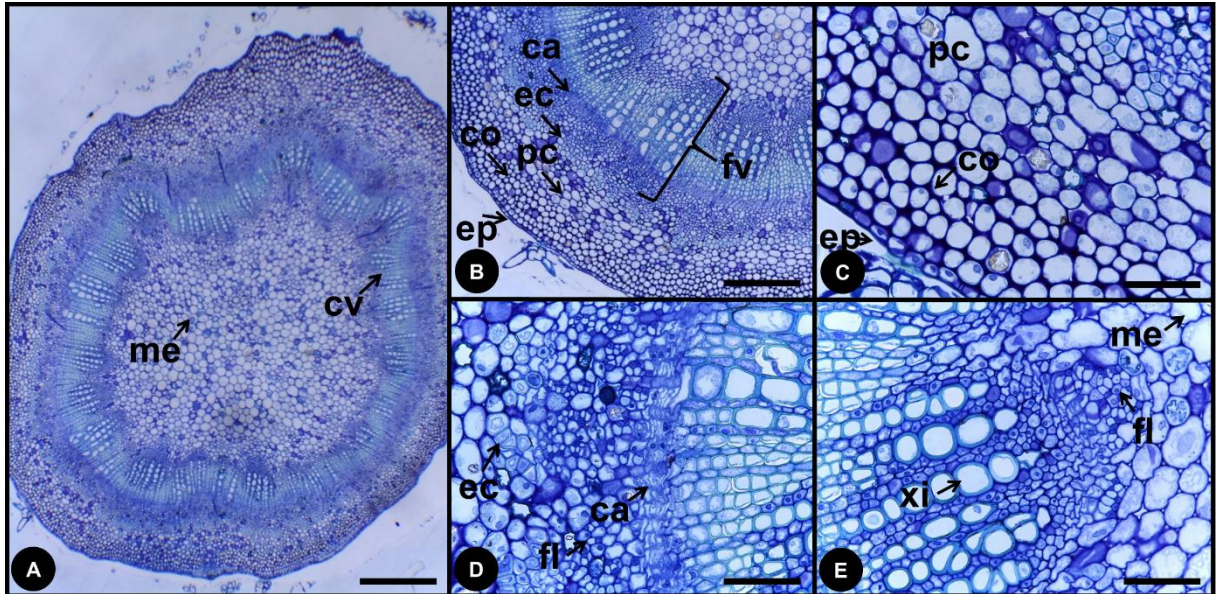
4.2 EXPERIMENTO 2

A hiperidricidade afetou significativamente a anatomia e fisiologia de *C. lechleri* propagado *in vitro*. Para todos os órgãos analisados, foram observadas diferenças na formação e organização das estruturas anatômicas entre as condições morfofisiológicas avaliadas (campo, normal, hiperídrica e revertida).

As análises anatômicas do caule de brotações laterais de plantas cultivadas *in vivo* evidenciaram estruturas mais desenvolvidas e bem organizadas, com poucos espaços intercelulares no parênquima cortical, epiderme uniestratificada com presença de tricomas estrelados, colênquima formado por seis ou sete camadas de células, cinco ou seis camadas de células formando o parênquima cortical, além da formação de alguns idioblastos com drusas (Figura 10).

Internamente as células do parênquima cortical localiza-se o esclerênquima, formando uma bainha cilíndrica composta por células com paredes secundárias, com pronunciado espessamento e redução do protoplasma (Figura 10).

Figura 10 - Secções transversais do caule da região mediana de brotação lateral de *Croton lechleri* cultivado *in vivo*, Rio Branco, Acre



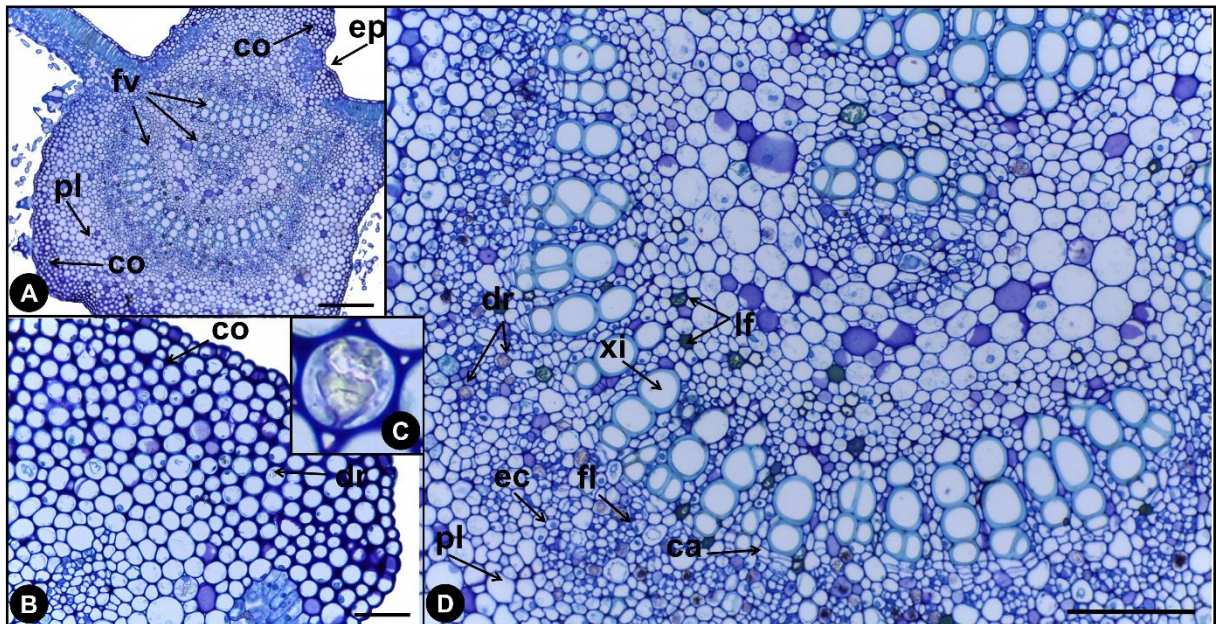
Notas: A: visão geral da secção transversal do caule; B e C: detalhes dos feixes vasculares, da epiderme, colênquima e parênquima cortical; D: esclerênquima, floema e câmbio vascular; E: Detalhe das células de condução do xilema e floema interno. me: medula cortical; cv: cilindro vascular; ec: esclerênquima; fl: floema; ca: câmbio vascular; co: colênquima; pc: parênquima cortical; ep: epiderme; xi: xilema; Barras: A: 500 µm; B: 200 µm; C, D e E: 50 µm.

Entre o câmbio vascular e o esclerênquima estão localizadas as células do floema, sendo o câmbio vascular constituído por várias camadas de células formando uma bainha cilíndrica contínua, com xilema e medula cortical bem desenvolvidos em toda extensão do feixe vascular (Figura 10). Além disso, observa-se o início da transição entre crescimento primário e secundário, com conseqüente espessamento do caule.

A nervura central de folhas de plantas *in vivo* tem formato biconvexo. A epiderme é composta por uma única camada de células e revestida por uma fina cutícula, com células de formato isodiamétrico e paredes uniformemente espessadas, com presença de muitos tricomas. Internamente a epiderme, envolta da nervura, ocorrem as células colenquimáticas formada por sete a oito camadas, seguidas de células parenquimáticas, ambos apresentando idioblastos com drusas.

Externamente ao xilema está o câmbio vascular constituído por células formando um anel cilíndrico em volta do feixe vascular, externamente ao câmbio células do floema e em seguida com o mesmo formato cilíndrico do cambio células do esclerênquima. O sistema vascular é organizado em dois arcos, sendo o arco abaxial maior, e outro ao centro da nervura (Figura 11).

Figura 11 - Secções transversais da nervura central de plantas de *Croton lechleri* cultivadas *in vivo* (campo), Rio Branco, Acre



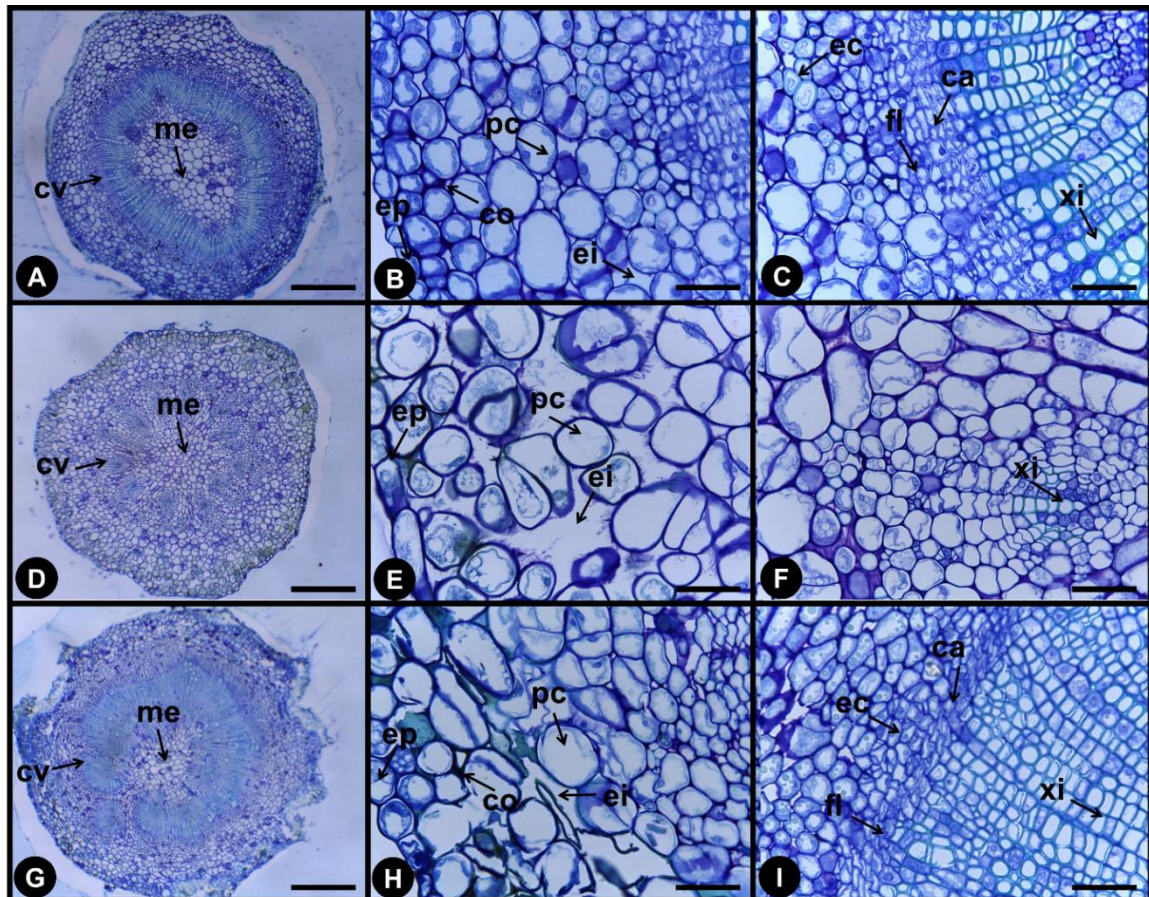
Notas: A: Nervura central; B: detalhe do colênquima na face adaxial; C: detalhe do idioblasto com drusas; D: detalhe dos arcos que compõe a nervura central; ep: epiderme; ec: esclerênquima; fv: feixe vascular; pl: parênquima lacunoso; co: colênquima; dr: drusa; xi: xilema; fl: floema; ca: câmbio vascular; lf: canais laticíferos. Barras: A: 500 µm; B: 50 µm; e D: 200 µm.

As estruturas observadas no presente estudo, para nervura central de plantas *in vivo*, são semelhantes às descritas por Sá-Haiad et al. (2009) que verificaram estrutura biconvexa, sistema vascular organizado em dois arcos e quatro a seis camadas de parênquima lacunoso. Além disso, idioblastos com drusas são frequentes, característica também registrada para outras espécies do gênero, como *C. argyrophyloides*, *C. blanchetianus*, *C. heliotropiifolium* (SILVA, 2015), *C. vulnerarius* (SÁ-HAIAD et al., 2009) e *C. cordiifolius* (ALVES et al., 2017).

Estruturas semelhantes às observadas em folhas de plantas cultivadas *in vivo* foram identificadas em folhas normais sob condições *in vitro*. Nas plantas hiperídricas, observou-se ausência de estruturas fundamentais associadas à sustentação e desenvolvimento da planta. Observando a anatomia do caule de plantas normais *in vitro*, verifica-se formação de parênquima, colênquima e esclerênquima, poucos espaços intercelulares, presença do câmbio e cilindro vascular formando uma faixa contínua (Figura 12 A, B e C). Ao contrário do caule de brotações hiperídricas, com maiores espaços intercelulares, ausência de colênquima e esclerênquima, descontinuidade do câmbio e cilindro vascular, e malformação estrutural (Figura 12 D, E e F). Nas plantas que reverteram a condição hiperídrica, observou-se melhoria no arranjo das

células colenquimáticas, esclerenquimáticas e do câmbio vascular, além de poucos espaços intercelulares, comparada às hiperídricas (Figura 12).

Figura 12 - Secções transversais do caule de plantas normais, hiperídricas e revertidas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro*, Rio Branco, Acre

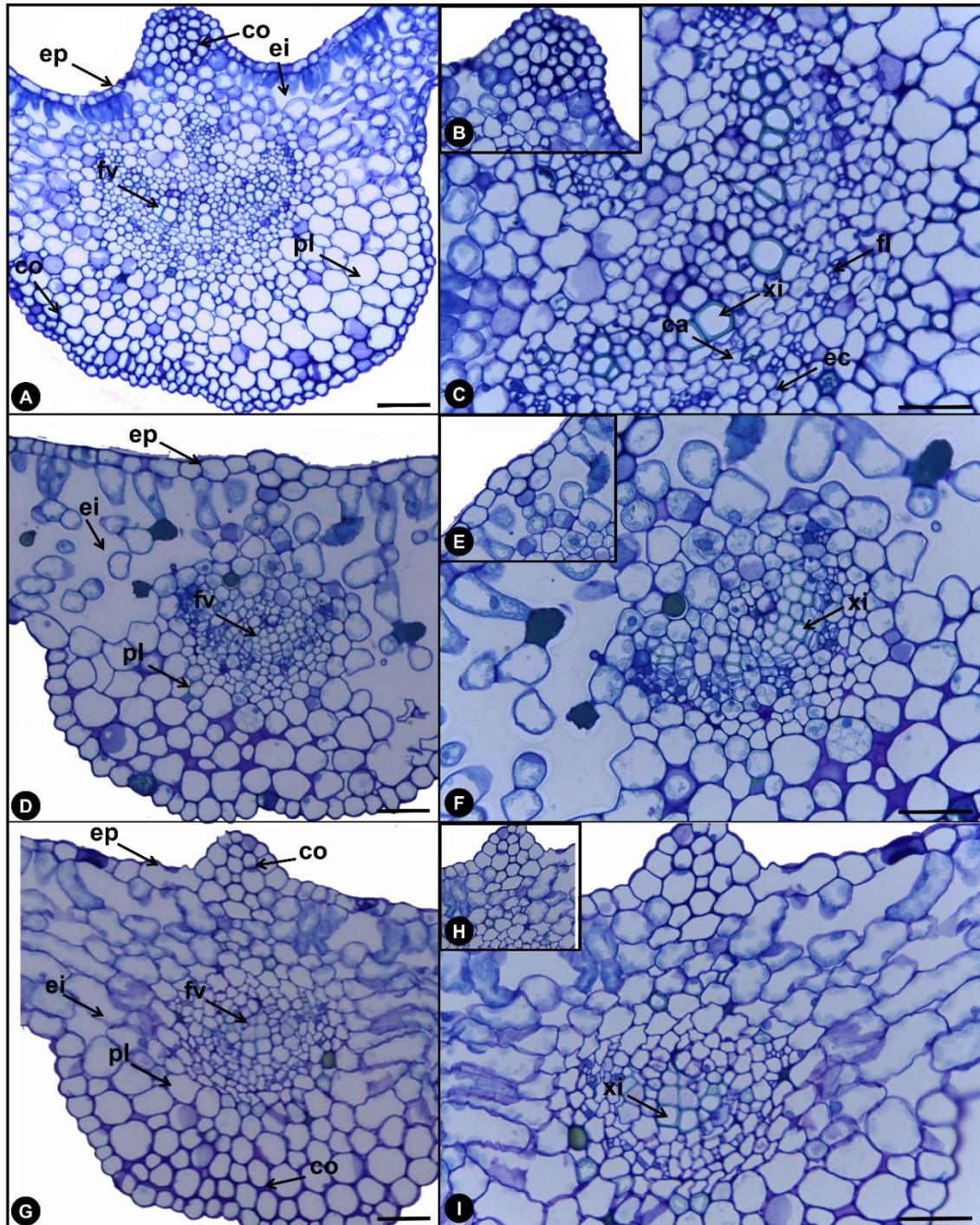


Notas: A, B e C: planta normal; D, E e F: planta hiperídrica; G, H e I: planta revertida; me: medula cortical; cv: cilindro vascular; ec: esclerênquima; fl: floema; ca: cambio vascular; co: colênquima; pc: parênquima cortical; ep: epiderme; xi: xilema; ei: espaço intercelular. Barras: A, D e G: 500 µm; B, C, E, F, H e I: 50 µm.

Na nervura central de plantas cultivadas *in vitro* foi observado apenas um arco de feixe vascular localizado na região central. Estruturas como esclerênquima, floema e cambio vascular são observados apenas em plantas normais, enquanto o xilema foi constatado nas três condições (normal, hiperídrica e revertida), com menor desenvolvimento nas brotações hiperídricas. Além disso, a hiperidricidade causou uma desorganização das células localizadas ao centro da nervura, sendo possível identificar apenas o feixe vascular pouco desenvolvido, células parenquimáticas e muito espaços intercelulares (Figura 13 D, E e F). Nas plantas revertidas, apesar do arranjo emaranhado das células, observa-se uma melhor organização das células e

estruturção do parênquima e colênquima, e conseqüentemente menos espaços intercelulares (Figura 13).

Figura 13 - Secção transversal da nervura central de plantas normais, hiperídrica e revertidas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro*, Rio Branco, Acre



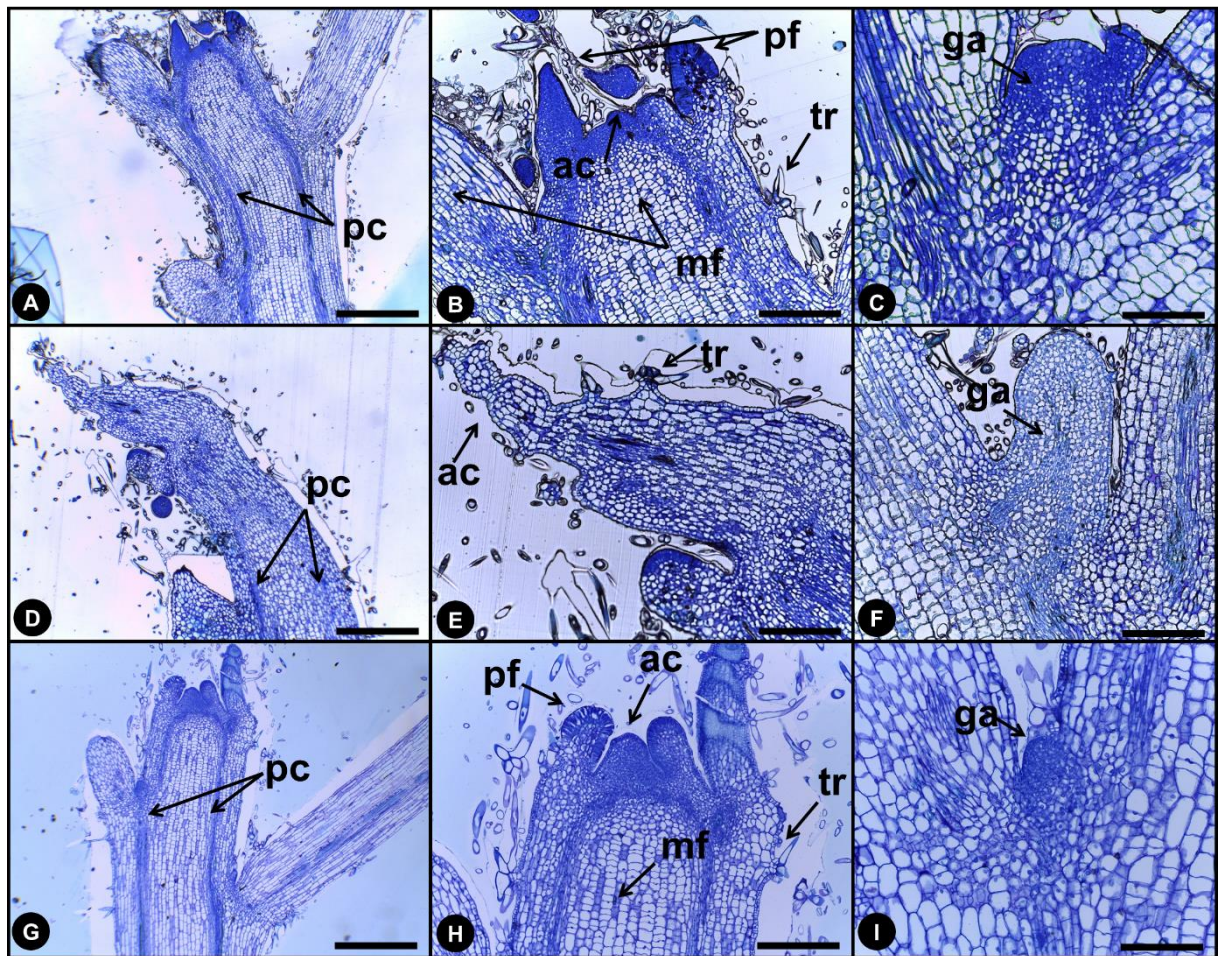
Notas: A, B e C: nervura de planta normal; B: detalhe do colênquima na fase adaxial; C: centro da nervura central; D, E e F: nervura de brotação hiperídrica; E: detalhe do colênquima; F: centro da nervura; G, H e I: nervura de plantas revertidas; H: detalhe do colênquima; I: centro da nervura; ep: epiderme; ec: esclerênquima; fv: feixe vascular; pl: parênquima lacunoso; co: colênquima; xi: xilema; fl: floema; ca: câmbio vascular; ei: espaços intercelulares. Barras: A, D e G: 500 μ m e C, F e I: 200 μ m.

Tecidos parenquimáticos e colenquimáticos apresentam similaridade e são sedes de processos fisiológicos e atividades essenciais, como fotossíntese, assimilação, respiração, armazenamento, preenchimento e sustentação para o vegetal (PACE; SOFFIATTI, 2013). Logo, a inexistência ou malformação desses tecidos pode influenciar negativamente o desenvolvimento das plantas. Além disso, os tecidos parenquimáticos têm íntima relação com a fotossíntese e, o maior desenvolvimento desse tecido pode permitir maior fixação de CO₂ (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

O esclerênquima, assim como os tecidos parenquimáticos e colenquimáticos, desempenha um papel importante na estrutura das plantas. As características do esclerênquima incluem paredes secundárias e lignificadas cujas principais funções são mecânicas e de sustentação. Essas células são capazes de resistirem a tensões como alongamento, torção, peso, pressão, sem que haja danos as células mais macias (PACE; SOFFIATTI, 2013). Já o câmbio vascular, é o tecido meristemático que origina os tecidos condutores xilema e floema, responsáveis pelo transporte e distribuição de fotoassimilados na planta. Logo, a malformação ou inexistência do câmbio, implica em consequências negativas para o desenvolvimento e crescimento das plantas.

Com relação à organização anatômica do ápice caulinar, as plantas normais e revertidas tiveram estruturas semelhantes como por exemplo a presença de primórdios foliares, e boa organização estrutural, com presença de procâmbio, meristema fundamental e apical evidentes. Diferentemente da anatomia do ápice de brotações hiperídricas, onde observa-se uma descontinuidade do procâmbio, ausência de primórdios foliar bem definidos e de células com características meristemáticas (Figura 14).

Figura 14 - Secção longitudinal do ápice caulinar e gema axilar de plantas normais, hiperídricas e revertidas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro*, Rio Branco, Acre



Notas: A, B e C: planta normal; D, E e F: brotação hiperídrica; G, H e I: planta revertida. pc: procâmbio; ac: ápice caulinar; pf: primórdio foliar; tr: tricomas; ga: gema axilar; mf: meristema fundamental; Barras: A, D e G: 500 μm; B, E e H: 50 μm; C, F e I: 50 μm.

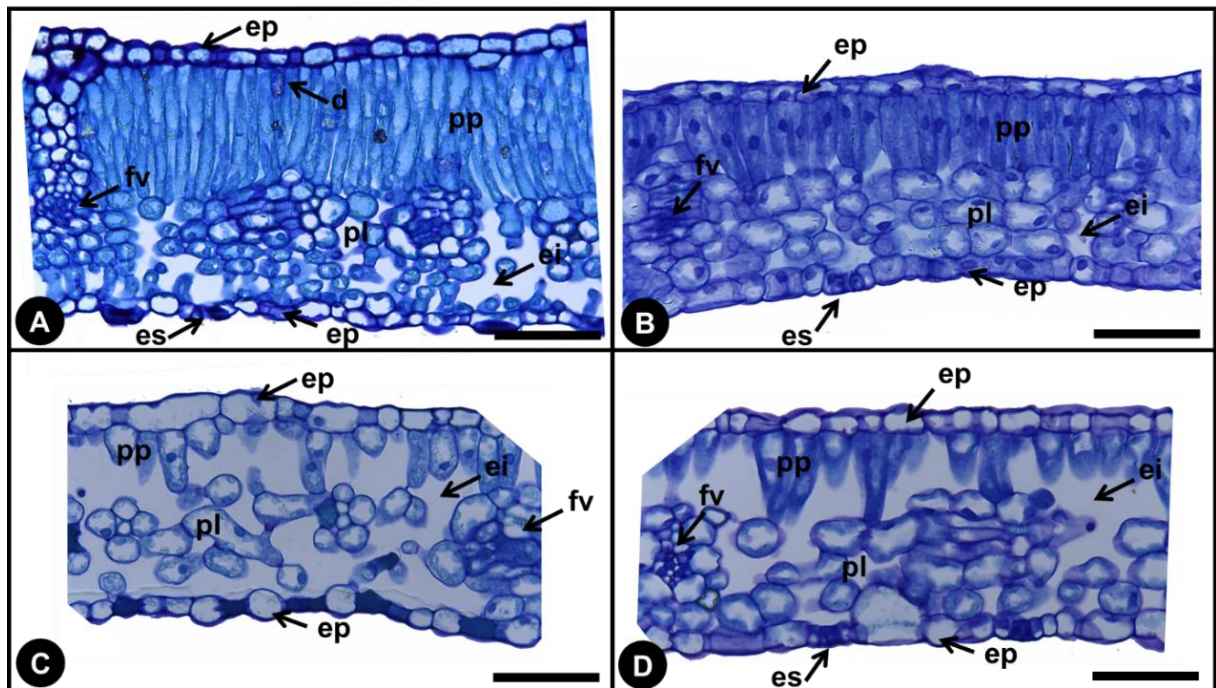
A má formação do meristema apical observado nas plantas hiperídricas, pode causar a perda irreversível da capacidade morfogênica e o estabelecimento de um estado neoplásico das células, similar à formação do câncer em animais, culminando com necrose do meristema apical (GASPAR et al., 1998; GASPAR et al., 2000) e conseqüentemente morte da planta, ou apenas interferir em processos futuros de desenvolvimento. Isso porque o grupo de células meristemáticas do ápice caulinar, mediante sucessivas divisões mitóticas, formam o alicerce do corpo da planta (SAJO, 2013).

Em secção transversal do limbo foliar de *C. lechleri*, observa-se estrutura dorsiventral, anfiestomáticas, com epiderme uniestratificada, parênquima paliçádico formado por duas camadas de células mais alongadas que ocupam cerca da metade da espessura do mesofilo. Alguns idioblastos com drusas encontram-se entre essas células, o parênquima lacunoso é constituído de cinco a seis camadas de células

irregulares ligadas entre si, porém com alguns espaços intercelulares formando algumas lacunas ao longo da lâmina foliar (Figura 15 A).

Para as plantas cultivadas *in vitro*, na condição normal e revertida, verifica-se um melhor arranjo e uniformidade estrutural, quando comparadas à anatomia de folhas hiperídricas, as quais são caracterizadas por uma deformidade da epiderme, descontinuidade nas células dos parênquimas paliçádico e lacunoso, além de maiores espaços intercelulares (Figura 15).

Figura 15 - Secção transversal do limbo foliar de plantas de *Croton lechleri* cultivadas em campo e propagadas *in vitro* (normais, hiperídricas e revertidas), Rio Branco, Acre



Notas: A: folha de planta *in vivo*; B: planta *in vitro*, normal; C: folha hiperídrica; D: planta *in vitro*, revertida. ep: epiderme; es: estômatos; ei: espaço intercelular; fv: feixe vascular; pl: parênquima lacunoso; pp: parênquima paliçádico; d: drusa. Barras: A, B, C e D: 50 μ m.

As diferenças visuais observadas na anatomia *in vivo* e *in vitro* foram confirmadas pela análise biométrica. Em plantas cultivadas *in vivo*, a espessura do limbo foliar (ELF) e o número de células (NPP) e espessura do parênquima paliçádico (EPP) foram significativamente maiores que as cultivadas *in vitro*. Comparando a anatomia *in vitro*, plantas normais e revertidas tiveram maior espessura do limbo (ELF), número de células (NPP) e espessura da camada do parênquima paliçádico (EPP). Diferentemente das brotações hiperídricas, onde observa-se maiores espaços intercelulares (EI) e menores NP, EPP e ELF (Tabela 4).

Tabela 4 - Anatomia foliar de plantas de *Croton lechleri* cultivadas em campo e propagadas *in vitro* (normais, hiperídricas e revertidas), Rio Branco, Acre

CONDIÇÃO	NPP	EPP	EPL	ELF	EPAD	EPAB	EI
	nº	----- mm -----					mm ²
Campo	30 a	0,076 a	0,058 a	0,135 a	0,008 b	0,009 b	0,001 b
Normal	24 b	0,047 b	0,041 b	0,084 b	0,010 ab	0,009 ab	0,001 b
Hiperídrica	10 d	0,026 c	0,037 b	0,060 c	0,011 ab	0,013 a	0,010 a
Revertida	16 c	0,037 bc	0,032 b	0,071 bc	0,013 a	0,010 ab	0,005 b

Notas: NPP: número de células do parênquima paliçádico; EPP: espessura da camada de parênquima paliçádico; EPL: espessura da camada de parênquima lacunoso; EPAD: espessura da epiderme adaxial; EPAB = espessura da epiderme abaxial; ELF: espessura do limbo foliar; EI: área ocupada por espaço intercelular; Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

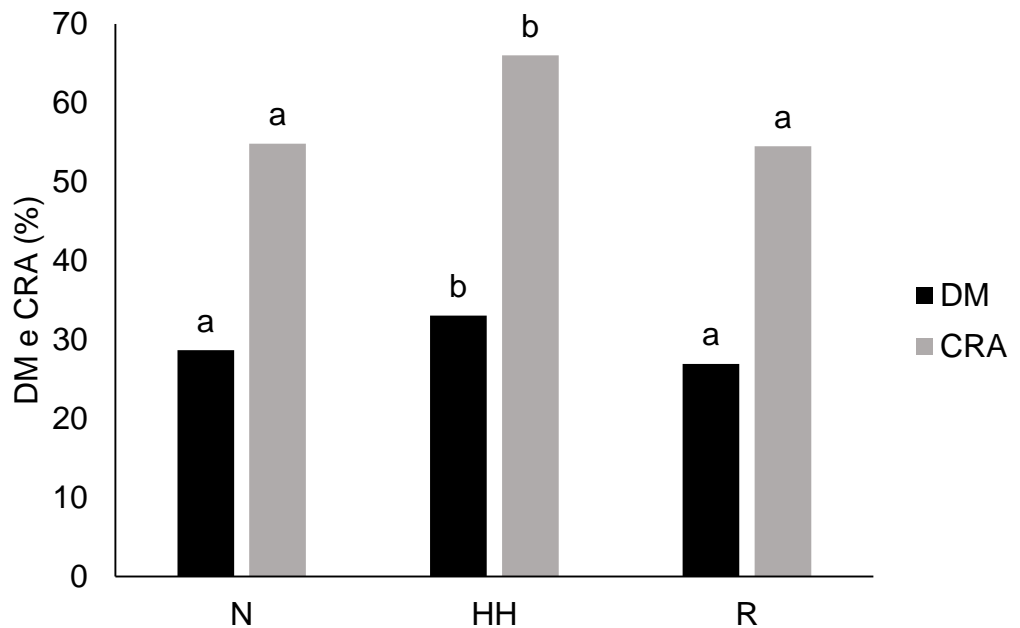
Diferenças estruturais na anatomia de plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro* são reportadas para outras espécies vegetais (REZENDE et al., 2008; DOUSSEAU, et al., 2008; CHIRINÉA, et al., 2012), e podem ser atribuídas as condições ambientais e nutricionais impostas pelo cultivo *in vitro*. Um dos problemas relacionados a propagação de plantas *in vitro* é a baixa transpiração, o que pode influenciar o desenvolvimento dos tecidos vasculares (MARTINS et al., 2012).

Efeitos negativos da hiperidricidade são reportados por Zen et al. (2016) com *Pogostemon cablin*, que constataram menor número de células e espessura do parênquima paliçádico, bem como maiores espaços intercelulares. O desenvolvimento irregular de algumas estruturas celulares em órgãos hiperídricos, pode estar diretamente ligado à baixa lignificação da parede celular, e às alterações morfológicas de células parenquimáticas decorrentes do acúmulo de água, característica comum associada a tecidos hiperídricos (PALMA et al., 2011). Acrescenta-se, ainda, que a deformação da epiderme observada em folhas hiperídricas afeta estruturalmente os estômatos (BARBOSA et al., 2013) podendo ocorrer desorganização no mesofilo, e desta forma compromete processos fisiológicos vitais das plantas, como a fotossíntese (PALMA, et al., 2011).

Para os aspectos fisiológicos, observou-se diferença significativa para as variáveis analisadas. Nas brotações de plantas hiperídricas houve maior dano de

membrana (DM) e conteúdo relativo de água (CRA) (Figura 16) e menor teores de pigmentos fotossintéticos (Figura 17).

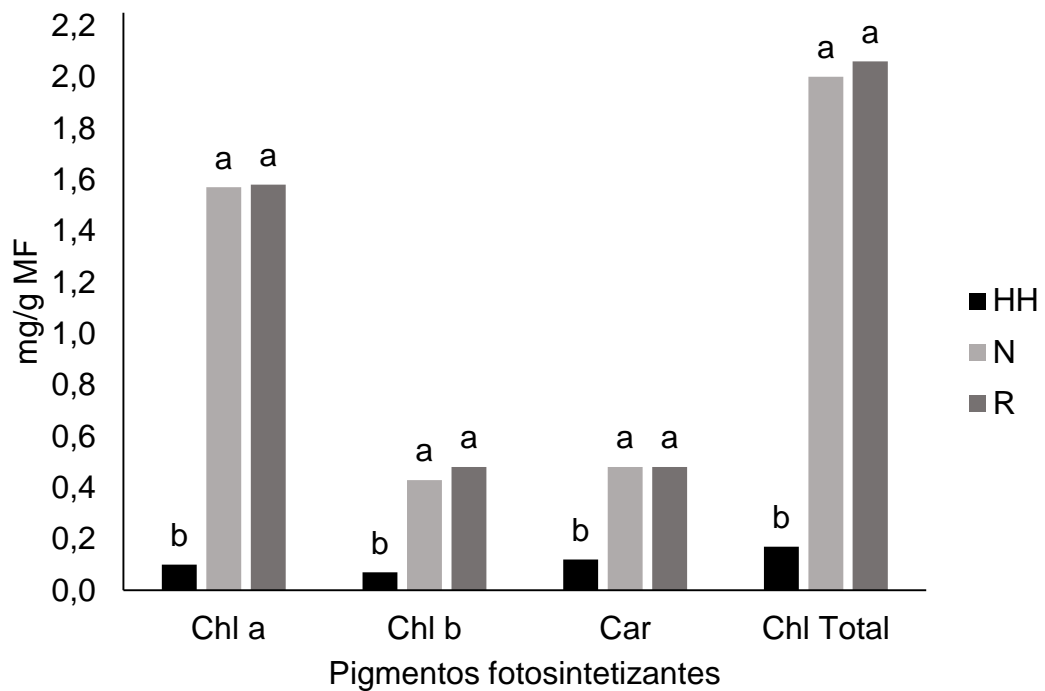
Figura 16 - Dano de membrana (DM) e conteúdo relativo de água (CRA) de plantas normais, hiperídricas e revertidas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro*, Rio Branco, Acre



Notas: HH: hiperídrica; N: normal; R: revertida; DM: dano de membrana; CRA: conteúdo relativo de água. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Provavelmente, a redução no número, comprimento e arranjo das células dos parênquimas clorofilianos estejam associados com a maior formação de espaços intercelulares, e conseqüentemente maior conteúdo relativo de água nos tecidos e menor conteúdo de pigmentos fotossintéticos (GAO et al., 2017; ZEN et al., 2016). A diminuição de células paliçádicas acarreta um baixo conteúdo de clorofila, devido os cloroplastos estarem localizados em maior quantidade nesse tipo de parênquima (YU et al., 2010), fato comprovado por Chakrabarty et al. (2006) ao observar que a hiperidricidade causou danos as membranas do tilacóides e diminuição no número de cloroplastos.

Figura 17 - Teores de pigmentos fotossintéticos de plantas normais, hiperídricas e revertidas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro*, Rio Branco, Acre



Notas: HH: hiperídrica; N: normal; R: revertida; Chl a: clorofila a; Chl b: clorofila b; Car: carotenoides; Chl total: clorofila total. Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

De acordo com Klerk e Pramanik (2017) a inundação do apoplasto é o principal fator que causa a hiperidricidade, pois a redução das trocas gasosas pode levar à anaerobiose e acúmulo de gases como etileno, os quais são induzidos pela atmosfera formada nos recipientes de cultivo *in vitro* associados a composição do meio de cultura. Além disso, a excessiva absorção de água e inundação do apoplasto aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (VAN VAN DRIES et al., 2013), entretanto, os mecanismos associados a excessiva hidratação nas células e tecidos ainda não estão compreendidos (GAO et al., 2017).

5 CONCLUSÕES

A utilização de segmentos caulinares, excisados da região mediana da planta e cultivados no sistema alternativo de vedação proposto, promove melhorias nos aspectos anatômicos, fisiológicos e crescimento de *Croton lechleri* propagado *in vitro*.

Brotações hiperídricas tiveram maior área com espaços intercelulares no mesofilo, acúmulo de água nos tecidos, que associados à ausência ou redução nas estruturas anatômicas afetam negativamente a fisiologia e o desenvolvimento das culturas *in vitro*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora estudos prévios tenham demonstrado alta porcentagem de hiperidricidade em *C. lechleri* propagado *in vitro* a partir de segmentos nodais, oriundos do terceiro subcultivo e mantidos em sistema de vedação convencional (PVC), no presente estudo não se observou a formação de plantas hiperídricas até 60 dias de cultivo. No entanto, um maior número de subcultivos sucessivos pode estar associado ao aumento expressivo da hiperidricidade, principalmente quando associado ao sistema de vedação com PVC, uma vez que houve decréscimo nas características anatômicas e fisiológicas e menor troca gasosa nesse tipo de vedação.

Os resultados da presente pesquisa evidenciam que o sistema de vedação proposto com tecido de máscara cirúrgica tripla é eficiente como alternativa ao sistema convencional, pois possibilita maior trocas gasosas no recipiente e melhora na anatomia e fisiologia das plantas formadas, podendo dessa forma prevenir ou regular a ocorrência de hiperidricidade em *C. lechleri*.

Com base nas alterações anatômicas e fisiológicas observadas em brotações hiperídricas, ressalta-se a importância de futuros experimentos para determinar a composição do meio de cultura, visto que altas concentrações de nitrogênio e baixa de cálcio estão diretamente associadas a ocorrência de hiperidricidade.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N. de; PINTO, J. E. B. P.; BETOLUCCI, S. K. V. et al. Propagação *in vivo* e *in vitro* e *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 33, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 2003.
- ALBUQUERQUE, A. P.; MONTEIROA, J. M.; RAMOSA, M. A; AMORIMB, E. L. C. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. **Journal Ethnopharmacol**, v. 110, n. 1, p. 76-91, Mar. 2007.
- ALMASSY JÚNIOR, A. A.; LOPES, C. R.; ARMOND, C.; SILVA, F. da; CASALI, V. W. D. **Folhas de chá: Plantas medicinais na terapêutica humana**. Viçosa, MG: UFV, 2005.
- ALVES, I. A. B. S.; SÁ, R. D.; CADENA, M. B.; XIMENES, R. M.; RANDAU, K. P. Microscopic Characterization of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae) **Pharmacognose Journal**, v. 9, n. 3, p. 361-366, 2017.
- ANJUM, S. A.; XIE, X.; WANG, L.; SALEEM, M. F.; MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 9, p. 2026-2032, May 2011.
- AREMU, A.O. et al. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.108, n. 1, p.1-16, Jan. 2012.
- ARIGITA, L.; CAÑAL, J.; TAMÉS, R. S.; GONZÉLEZ, A. CO₂-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the *in vitro* culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, n. 3, p. 312-322, 2010.
- ARNALDOS, T. L.; MUÑOZ, R.; FERRER, M. A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananassa*, c.v. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, n. 3, p. 315-322, Nov. 2001.
- ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, p. 533-538, especial 2011.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: Torres, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CNPH/CBAB, 1998. v.1, p.261-296.
- BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognose**, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.
- BARBOSA, L. M. P.; PAIVA, N. V. B.; DIAS, L. L. C.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; ALEXANDRE, R. S.; IAREMA, L.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Biochemical and morpho-anatomical analyses of strawberry vitro plants hyperhydric tissues affected by BA and gelling agents. **Revista Ceres**, v. 60, p. 152-160, 2013.

BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 160, n. 901, p. 268-282, May 1937.

BERNARD, F.; MOGHADAM, N. N.; MIRZAJANI, F. The effect of colloidal silver nanoparticles on the level of lignification and hyperhydricity syndrome in *Thymus daenensis* vitro shoots: a possible involvement of bonded polyamines. **Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 51, n. 5, p. 546-553, Oct. 2015.

BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; Ee, B. V.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giants genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu strictu) using *ITS* and *trnL-trn-F* DNA sequence data. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 92, n. 8, p. 1520-1534, Sept. 2005.

BHOJWANI, S. S; DANTU P. K. **Plant Tissue Culture: An Introductory Text**. Nova Deli: Springer, 2013. P. 141-154.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, Jul. 2010.

CAIRO, P. A. R. Curso básico de relações hídricas de plantas. Vitória da Conquista. UESB, 32p, 1995.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CHAKRABARTY, D.; PARK, S.Y.; ALI, M. B.; SHIN, K. S.; PAEK, K.Y. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, v. 26, n. 3, p. 377-388, Mar. 2006.

CHANEMOUGASOUNDHARAM, A.; SARKAR, D.; PANDEY, S. K; AL-BISKI, F.; HELALI, O.; MINHAS, J. S. Culture tube closure-type affects potato plantlets growth and chlorophyll contents. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 1, p. 7-11, 2004.

CHA-UM, S.; ULZIIBAT, B.; KIRDMANEE, C. Effects of temperature and relative humidity during in vitro acclimatization, on physiological changes and growth characters of *Phalaenopsis* adapted to in vivo. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 9, p. 750-756, Nov. 2010.

CHIRINÉA, C. F.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G.; PEREIRA, A. R.; CASTRO, E. M. Acclimatization and leaf anatomy of micropropagated fig plantlets. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 34, n. 4, p. 1180-1188, 2012.

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; BLANK, A. F.; MMENDONÇA, A. B. de. AMANCIO, V. F.; LEDO, A. da S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 1, p. 68-72, jan./mar. 2007.

COSTA, J. G. M. da; RODRIGUES, F. G.; ANGÉLICO, E. G.; PEREIRA, C. K. B; SOUZA, E. O. de; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. dos. Composição Química e Avaliação da Atividade Antibacteriana e

Toxicidade do Óleo Essencial de *Croton zehntneri* (Variedade Estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 583-586, Oct./Dec. 2008.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1012-1017, 2009.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, E M. de; SOARES, R. P.; EMRICH, E. B.; MELO, L. A. de. Anatomia foliar de *tabebuia serratifolia* (vahl) nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, in vivo durante a aclimatização. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, nov./dez. 2008

ESYANTI, R. R.; ADHITAMA, N.; MANURUNG, R. Efficiency evaluation of vanda tricolor growth in temporary immerse system bioreactor and thin layer culture system. **Journal of Advanced Agricultural Technologies**, v. 3, n. 1, p. 63-66, Mar. 2016.

FEI, L. W.; WEATHERS, P. From leaf explants to rooted plantlets in a mistreactor. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 51, n. 6, p. 669-681, Dec. 2015.

FERNANDEZ-GARCIA, N. et al. ROS as biomarkers of hiperhydricit. In: GUPTA, D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. London Local: Sciences Publishers, 2011. Cap.12, p. 249-272.

FORERO, L. E.; CHÁVEZ, J.; BERNAL, H. Agrotecnología para el cultivo de sangre grado. In: **Fundamentos de agrotecnología del cultivo de plantas medicinales ibero-americanas**. Convênio Andrés Bello/Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Bogotá, 2000. P. 157-190.

FRANCK, T.; GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; DOMMES, J.; HAUSMAN, J. F. Are hyperhydric shoots of *Prunus avium* L. energy deficient? **Plant Science**, v. 160, n. 6, p. 1145-1151, May 2001.

GAO, H.; LI, J.; JI, H.; NA, L.; XIA, X. Hyperhydricity-induced ultrastructural and physiological changes in blueberry (*vaccinium spp.*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, n. 1, p. 65-76, Apr. 2018.

GAO, H.; XU, P.; LI, J.; JI, H.; NA, L.; XIA, X. AgNO₃ prevents the occurrence of hyperhydricity in *Dianthus chinensis* L. by enhancing water loss and antioxidant capacity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, p. 561-570, 2017.

GASPAR, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; LEDILY, F.; BILLARD, J. P.; HUAULT, C.; GARNIER, F.; RIDEAU, M.; FOIDART, J. M. Atypical metabolism and biochemical cycles imposing the cancerous state on plants cells. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 2, p. 135-144, Feb. 1998.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; BISBIS, B.; FRANCK, T.; CRÈVECOEUR, M.; GREPPIN, H.; DOMMES, J. Loss of plant organogenic totipotency in the course of in vitro neoplastic progression. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 36, n. 3, p 171-181, May/Jun. 2000.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L. HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Applications to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 3, p. 263-285, July 2002.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidante machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.

GOULD, J. H.; MURASHIGE, T. Morphogenic substances released by plant tissue cultures. I. Identification of berberine in Nandina culture medium, morphogenesis, and factors influencing accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 4, p. 29-42, 1985.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. Royal Botanical Gardens, Kew, 2000. 2 v.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, 1998. P. 99-170.

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

HASSANNEJAD, S.; BERNARD, F; MIRZAJANI, F.; GHOLAMI, M. SA improvement of hyperhydricity reversion in *Thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 51, p. 40-46, Feb. 2012.

HASSANEIN, A. M.; SALEM, J. M.; FAHEED, F. A.; EI-NAGISH, A. Effect of anti-ethylene compounds on isoenzyme patterns and genome stability during long term culture of *Moringa oleífera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 1, p. 201-212, Jan. 2017.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPQ, 1998. P. 371-393.

IAREMA, L.; CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; OLIVEIRA, E. J.; VIEIRA, R. F.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, p. 227-238, Mar. 2012.

ISAH, T. Adjustments to in vitro culture conditions and associated anomalies in plants. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 57, n. 2, p. 9-28, 2015.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of in vitro regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, n. 2, p. 227-231, Feb. 2008.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, v. 60, n. 2, p. 143-150, Mar. 2010.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Nitrogen source, concentration, and NH₄⁺:NO₃⁻ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, n. 2, p. 167-174, Nov. 2009.

JESUS, A. M. S.; CARVALHO, S. P. de; VILLA, F.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M. Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de plantas. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 6, p. 431-436, nov./des. 2010.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940. 523 p.

JONES, K. Review of Sangue de Drago (*Croton lechleri*) – A south american tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections and wounds: Traditional uses to clinical research. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, p. 877-896, 2003. 9 v.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, n. 2, p. 181-191, May 2004.

KEVERS, C.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. **Physiologie Végétale**, v. 244, p. 647-653, 1986.

KLERK, G.; PRAMANIK, D. Trichloroacetate, an inhibitor of wax biosynthesis, prevents the development of hyperhydricity in *Arabidopsis* seedlings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 131, n. 1, p. 89-95, Oct. 2017.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation—environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, n. 4, p. 188-204, 2010.

LAI, C. C.; LIN, H. M.; NALAWADE, S. M.; FANG, W.; TSAY, H. S. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 3, p. 355-361, Mar. 2005.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. L. P.; BONNETT, G. H.; SMITH, R. S. Invited review: sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 345-363, 2005.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIMA, G. S. CASTRO-PINTOC, D. B.; MACHADO, G. C.; MACIEL, M. A. M.; Echevarria, A. Antileishmanial Activity and Trypanothione Reductase Effects of Terpenes from the Amazonian Species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 22, p. 1133-1137, Nov. 2015.

LIMA, M. R. F. de; XIMENES, E. C. P. A.; LUNA, J. S.; SANT'ANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 3, p. 300-306, set. 2006.

LIU, L. M.; JIANG, F.; KONG, X.; TIAN, J.; WU, J.; WU, Z. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. **Scientia Horticulturae**, v. 217, p. 285-296, Mar. 2017.

- MACHADO, M. P.; DA SILVA, A. L. L.; BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK, J. C.; ZANETTE, F. Influence of calcium content of tissue on hyperhydricity and shoot-tipnecrosis of *in vitro* regenerated shoots of *lavandula angustifolia* mill. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 636-643, Curitiba, Sept./Oct. 2014.
- MACHADO, M. P.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L. A. Application of IBA on *in vitro* and *ex vitro* rooting microcutting of *Lavanda angustifolia* Miller. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 2, p. 153-161, May. 2013.
- MAFIA, R. G.; MARCHESI, H. P.; AUN, C. P. Avaliação de clones de eucalipto para resistência à ferrugem em condições de micropropagação. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 36, n. 5, p. 843-849, set./out. 2012.
- MARTINS, J. P. R.; PIRES, M. F.; SANTOS, B. R.; BARBOSA, S.; BEIJO, L. A.; PEREIRA, F. J. Alterações na anatomia caulinar de ipê-amarelo em diferentes condições de pré-aclimatização em tubos de ensaios. **Revista brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 3, p. 502-507, jul.-set, 2012.
- MAYOR, M. L.; NESTARES, G.; ZORZOLI, R., PICARDI, L. A. Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, n. 1, p. 99-103, Jan. 2003.
- MEZA, E. N.; AYALA, F. **El manejo sostenible de sangre de drago o sangre de grado**. San Francisco: Shaman Pharmaceuticals e Healing Conservancy (Material educativo), 1998. 29 p.
- MICHAUX-FERRIERE, N.; GROUT, H.; CARRON, M. P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v, 79, n. 2, p. 174-180, Feb. 1992.
- MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZONI, A. Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 40, n. 4, p. 396-402, 2004.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F. V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant in Science**, v. 9, n. 10, p. 490-498, Oct. 2002
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2012.
- MIOTO, R. País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 07 jun. 2010. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/746386-pais-deixa-de-gerar-us-5-bi-por-ano-com-fitoterapicos.shtml>>. Acesso em: 08 maio 2016.
- MIRZA, F.; ULIAIE, E. D.; HAGH, A. B. Stimulation effect of AgNO₃ and CoCl₂ as ethylene inhibitors on *in vitro* organogenesis of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Journal of Agricultural Science**, v. 25, n. 2, p. 113-118, 2015
- MOHAMED, M. A. H.; ALDASON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n. 3, p. 295-300, Jan. 2010.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, F. E.; SILVA, A. R. A. da; MARTINS NETO, J. S. Atividade Antioxidante de Óleos Essenciais de *Croton* no Nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, Nov. 2006.

MOREIRA, C. V. **Ambiente de cultivo na micropropagação de *Annona glabra* L.** 2008. 137 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras/UFLA, Lavras, 2008.

NETO, L. P.; SOUZA, L. M. de; MORAIS, M. B. de; ALBUQUERQUE, C. C. de; CAMARA, T. R.; ULISSES, C. Controlling hyperhydricity in micropropagated plants of *Lippia grata* Schauer (Verbenaceae), a native species of a dry seasonal tropical forest with pharmacological potential. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 529-538, Sep. 2018.

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. S.; QUEIROZ, S. R. O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. R. F. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 33, n. 3, p. 481-490, 2009.

NEVES, T. dos S.; SILVA, S. de OLIVEIRA. E.; OLIVEIRA, R. P. de. Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de diploides de bananeira obtidas a partir de cultura de embriões. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 6-9, abr. 2002.

OLIVEIRA, M. L. de; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R. M.; ATONI, W. C.; TEIXEIRA, J. B. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, nov./dez. 2011.

OCHATT, S. J.; MUNEAX, E.; MACHADO, C.; JACAS, L.; PONTÉCAILLE, C. The hyperhydricity of *in vitro* regenerants of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is linked with an abnormal DNA content. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 9, p.1021-1028, 2002.

OSAKADA, A. **Desenvolvimento inicial de sangue-de-dragão (*Croton lechleri* Müll. Arg.) sob diferentes classes de solos, corretivos e níveis de luminosidade na Amazônia central.** 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais da Amazônia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/UFAM, Manaus, 2009.

PACE, M. R.; SOFFIATTI, P. parênquima e colênquima. In: EVERT, R. F. **Anatomia das plantas de Esau**. 3. Ed. São Paulo: Blucher, 2013. P. 225-244.

PACE, M. R.; SOFFIATTI, P. Esclerênquima. In: EVERT, R. F. **Anatomia das plantas de Esau**. 3. Ed. São Paulo: Blucher, 2013. P. 245-266.

PALMA, D.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S.; FORTES, A. M. T. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, p. 174-184, 2011.

PALOMINO, J. Y.; BARRA, M. C. **Especies forestales nativas con potencial para reforestación en La provincia de Oxapampa y fichas técnicas de las especies mayor prioridad**. Oxapampa: Programa Selva Central Oxapampa, 2003. 109 p.

PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H. S.; PARK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironment on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 99, n. 2, p. 199-205, 2004.

PENCE, V.; FINKE, L.; NIEDZ, R. Reducing hyperhydricity in shoot cultures of *Cycladenia humilis* var. *jonesii*: an endangered dryland species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. v. 50, p. S62-S62, 2014.

PEREIRA, A. M. S. Cultura de Tecidos de Plantas Mediciniais. In: COELHO, M. F. B.; COSTA JÚNIOR, P.; DOMBROSKI, J. L. D. (Org.). **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**. Cuiabá, MT: UNICEN – Editora da União das Faculdades do Centro-Norte, 2003, v. 1, p. 183-193.

PIATTI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 1033-1040, maio/jun. 2011.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J. da; MORAIS, T. P. de; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Arvore**, v. 37, n. 1, p. 19-29, 2013.

PIQUERAS, A. et al. Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. **Plant Science**, v. 62, p. 671-678, 2002.

POLLITO, P. A. Z. **Dendrologia, anatômica do lenho e “status” de conservação das espécies lenhosas dos gêneros *Cinchona*, *Croton* e *Uncaria* no estado do Acre, Brasil**. 2004. 181 f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

POLLITO, P. A. Z.; TOMAZELLO FILHO, M. Espécies lenhosas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado do Acre. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. S2, p. 177-179, jan./mar. 2007.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, Amsterdã, v. 78, n. 57, p. 437-442, Dec. 1977.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, R. L. D.; CORRÊA, R. M. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, maio 2009.

REZENDE, R. K. S.; PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P. P.; CASTRO, E. M. de. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características

anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 821-827, maio/jun., 2008.

RIBEIRO, M. V.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. DE M.; RUBIN, S.; BENITEZ, L. C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Concentrações de Sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 843-845, jul. 2007.

ROCHA, F. F.; NEVES, E. M. N.; COSTA, E. A.; MATOS, L. G.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; CORTES, W. S.; VANDERLINDE, F. A. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lamj. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 344-9, Mar. 2008.

RODRIGUES, G. R.; NASO, F. C. D.; PORAWSKI, M.; MARCOLIN, E.; KRETZMANN, N. A.; FERRAZ, A. DE B. F.; RICHTER, M. F.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Treatment with Aqueous Extract from *Croton cajucara* Benth Reduces Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Diabetic Rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-7, Jul. 2012.

RODRIGUES, M.; COSTA, T. H. F. FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 48, p. 1-6, 2012.

SAEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; LATSAGUE, M. I.; SANCHEZ, M. E.; RIOS, D. G. Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. **Scientia Horticulturae – Amsterdam**, v. 138, p. 7-16, 2012.

SÁ-HAIAD, B. de; Serpa-Ribeiro, A. C. C.; Barbosa, C. N.; Pizzini, D.; Leal, D. de O.; Senna-Valle, L. de; Santiago-Fernandes, L. D. R. de. Leaf structure of species from three closely related genera from tribe *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s., Malpighiales). **Plant Systematics and Evolution**, v. 283, n. 3-4, p. 179-202. Dec. 2009.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Tradicional Uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* Species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F. de; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M. do; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, Sep. 2012.

SALEM, J. M. *In vitro* propagation of *Moringa oleifera* L. under salinity and ventilation conditions. **Genetics and Plant Physiology**, v. 6, n. 1-2, p. 54-64, 2016.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 80-86, 2008.

SANTOS, H. S.; BARROS, F. W. A.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; BANDEIRA, P. N.; PESSOA, C.; BRAZ-FILHO, R.; MONTE, F. J. Q.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LEMOS, T. L. G. Cytotoxic Diterpenoids from *Croton argyrophylloids*. **Journal Natural Products**, v. 72, n. 10, p. 1884-1887, 2009.

SANTOS, H. S.; MESQUITA, F. M. R. Diterpenos Casbanos e Acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 601-604, Feb. 2008.

SANTOS, D. S. DOS.; TAMAKI, V.; NIEVOLA, C. C. In vitro propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. F.) Klotzsch via nodal segments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, n. 6, p. 524-529, Dec. 2010.

SANTOS, K. P.; MOTTA, L. B.; SANTOS, D. Y.; SALATINO, M. L.; SALATINO, A.; FERREIRA, M. J.; LAGO, J. H.; RUIZ, A. L.; CARVALHO, J. E.; FURLAN, C. M. Antiproliferative Activity of Flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae). **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-7, May. 2015.

SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.120, p.152-161, Jan. 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2003.

SEN, A.; ALIKAMANOGLU, S. Antioxidant enzyme activities, malondialdehyde, and total phenolic content of PEG-induced hyperhydric leaves in sugar beet tissue culture. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 49, n. 4, p. 396-404, Aug. 2013.

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

SHIBATA, W.; MURAI, F.; AKIYAMA, T.; SIRIPHOL, M.; MATSUNAGA, E.; MORIMOTO, H. Micropropagation of *Croton sublyratus* Kurz – a tropical tree of medicinal importance. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, n. 3-4, p.147-152, Dec. 1996.

SHUKLA S.; MEHTA, A.; JOHN, J.; SINGH, S.; MEHTA, P.; VYAS, S. P. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 47, p. 1848-51, Abr. 2009.

SILVA, C. C. A. **Caracteres de resiliência e usos antrópicos em espécies vegetais da caatinga**. 2015. 155f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

SILVA, A. B DA; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S. DE; MOREIRA, A. L. In vitro growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 6, p. 883-890, nov/dez, 2014.

SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; FONTENELE, A.V.; RIBEIRO, R. V.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p.1157-1164, 2010.

SILVA, A. O.; ALVES, A. D.; ALMEIDA, D. A. T. DE.; BALOGUN, S. O.; OLIVEIRA, R. G. DE; AGUIAR, A. A.; SOARES, I. M.; MARSON-ASCÊNCIO, P. G.; ASCÊNCIO, S. D.; MARTINS, D. T. DE O. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia ongiflora* (Desf.) Müll.Arg. **Journal Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 319-329, Jun. 2014.

SONG, J. T.; HANA, Y.; WANG, X.; SHEN, T.; LOU, H.; WANG, X. Diterpenoids from the Twigs and Leaves of *Croton caudatus*. **Fitoterapia**, v. 107, p. 54-59, Dec. 2015.

SAJO, M. das G. Meristemas apicais. In: EVERT, R. F. **Anatomia das plantas de Esau**. 3. Ed. São Paulo: Blucher, 2013. P. 177-223.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no context do controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosi**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V. de; PESCADOR, R.; FERREIRA, D. M. Germinação e crescimento in vitro de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, Água funda, v. 37, n. 4, p. 731-742, dez. 2010.

TABART, J.; FRANCK, T.; KEVERS, C.; DOMMES, J. Effect of polyamines and polyamine precursors on hyperhydricity in micropropagated apple shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 1, p. 11-18, Jan. 2015.

TIAN, J.; CHENG, Y.; KONG, X.; LIU, M.; JIANG, F.; WU, Z. Induction of reactive oxygen species and the potential role of NADPH oxidase in hyperhydricity of garlic plantlets in vitro. **Protoplasma**, v. 254, p. 311-327, Mar. 2016.

TIAN, J.; JIANG, F.; WU, Z. The apoplastic oxidative burst as a key factor of hyperhydricity in garlic plantlet in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 2, p. 571-584, Feb. 2015.

TIAN, J.; CHENG, Y.; KONG, X.; LIU, M.; JIANG, F.; WU, Z. Induction of reactive oxygen species and the potential role of NADPH oxidase in hyperhydricity of garlic plantlets in vitro. **Protoplasma**, v. 254, p. 379-388, 2017.

TRIQUES, K.; RIVALA, A.; BEULÉA, T.; PUARDB, M.; ROYC, J.; NATOD, A.; LAVERGNED, D.; HAVAUXE, M.; VERDEILA, J.; SANGAREF, A.; HAMONA, S. Photosynthetic ability of in vitro grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. **Plant Science**, v. 127, n. 1, p. 39-51, Aug. 1997.

TUKEY, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance. **International Biometric Society**, Washington, v. 5, n. 2, p. 99-114, 1949.

VAN DEN DRIES, N.; GIANNÌ, S.; CZEREDNIK, A.; KRENS, F. A.; KLERK, G. J. M. de. Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 16, p. 5221-5230, Oct. 2013.

VASCONCELOS, A. G. V. de.; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciencia rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 837-844, maio 2012.

VASUDEVAN, R.; VAN STADEN, J. Cytokinin and explant types influence in vitro plant regeneration of Leopard Orchid (*Ansellia africana* Lindl.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, n. 1, p. 123-129, Oct. 2011.

VINOTH, A.; RAVINDHRAN, R. Reduced hyperhydricity in watermelon shootcultures using silver ions. **In Vitro Cellular Developmental – Plant**, v. 51, n. 3, p. 258-264, Jun. 2015.

WANG, K. L. C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, v. 14, n. 1, p. 131-151, 2002.

WU, Z.; CHEN, L. J.; LONG, Y. J. Analysis of ultrastructure and reactive oxygenspecies of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. **In Vitro Cellular Developmental – Plant**, v. 45, p. 483-490, 2009.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 105, n. 2, p. 149-158, May. 2011.

YU, Y.; ZHAO, Y-Q.; ZHAO, B.; REN, S.; GUO, Y-D. Influencing factors and structural characterization of hyperhydricity of in vitro regeneration in *Brassica oleracea* var. 64ifere. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, p. 159-165, 2011.

ZEN, A. R.; WIDORETNO, W.; INDRIYANI, S. Water and Chlorophyll Content and Leaf Anatomy of Patchouli Plantlet (*Pogostemon cablin* Benth.) Resulted by Shoot-tip Culture Experience Hyperhydricity after Treatment of Modification Ammonium nitrate or Macro salt Concentration on MS medium (Murashige Skoog). **The Journal of Experimental Life Science**, v. 6, n. 1, p. 38-44, Jun. 2016.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Cauliflower shoot-culture: effect of different types of ventilation on growth and physiology. **Plant Science**, v. 141, n. 2, p. 209-217, Feb. 1999.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Leaf anatomy of in vitro tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, v. 161, n. 3, p. 537-548, 2001.

ZUZARTE, M. R.; DINIS, A. M.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. R.; CANHOTO, J. M. Trichomaes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and products**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 580-587, nov. 2010.

APÉNDICE

APÊNDICE A - Resumo da análise de variância para número de folhas expandidas (NF), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) de plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação e tipo de explante, no experimento 1

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		NBR	NF/BR	NR	CR	CBR
Sistema de vedação	1	0,22 ^{ns}	5,42 ^{ns}	14,22 ^{**}	2,17 ^{ns}	1,35 ^{ns}
Explante	1	0,50 ^{ns}	20,85 [*]	5,55 ^{ns}	30,03 ^{**}	0,00 ^{ns}
SV x Exp	1	0,05 ^{ns}	14,44 ^{ns}	0,05 ^{ns}	2,47 ^{ns}	1,69 ^{ns}
Erro	68	0,22	4,85	2,32	3,65	0,85
Total	71	-	-	-	-	-
CV (%)	-	40,55	48,50	103,57	101,50	53,01

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$), 2. SV (Sistema de vedação); Exp (explante).

APÊNDICE B - Resumo da análise de variância para concentração de pigmentos fotossintéticos de plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação e tipo de explante, no experimento 1

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		Car	Chl b	Chl a	Chl total
Sistema de vedação	1	0,18 ^{**}	0,26 ^{ns}	4,28 ^{**}	6,63 ^{**}
Explante	1	0,03 ^{ns}	0,11 ^{ns}	2,34 ^{**}	3,48 ^{**}
SV x Exp	1	0,00 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,76 [*]	1,04 ^{ns}
Erro	12	0,01	0,06	0,16	0,32
Total	15	-	-	-	-
CV (%)	-	23,03	40,87	18,37	20,45

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$), 2. SV (Sistema de vedação); Exp (Explante).

APÊNDICE C - Resumo da análise de variância para anatomia foliar de plantas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro* em função do sistema de vedação e tipos de explante no experimento 1

Fonte de variação	GL	Quadrado médio					
		NPP	EPP	EPL	EEAD	EEAB	ELF
Sistema de vedação	1	25,00*	0,00**	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00*
Explante	1	16,00 ^{ns}	0,00*	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}
SV x Exp	1	9,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}
Erro	12	4,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	15	-	-	-	-	-	-
CV (%)	-	15,12	13,97	16,00	14,70	14,82	11,27

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$), 2. SV (Sistema de vedação); Exp (Explante).

APÊNDICE D - Resumo da análise de variância para taxa de perda de vapor d'água, até os 53 dias de cultivo, nos tubos vedados com policloreto de vinila (PVC) e tecido de máscara cirúrgica tripla (MC), no experimento 1

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
		PVDA
Sistema de vedação	1	16,33**
Dias	5	2,41**
SV x Dias	5	1,03**
Erro	120	0,03
Total	131	-
CV (%)		29,87

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$), 2. SV (Sistema de vedação); PVDA (perda de vapor d'água).

APÊNDICE E - Resumo da análise de variância para dano de membrana (DM) e conteúdo relativo de água (CRA) de plantas normais, hiperídricas e revertidas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro*, no experimento 2

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		CRA	DM
Tratamento	2	128,96*	30,07**
Erro	6	16,86	1,18
Total	8	-	-
CV (%)		7,03	3,68

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$), 2. tratamento (plantas na condição normal, hiperídrica e revertida).

APÊNDICE F - Resumo da análise de variância para concentração de pigmentos fotossintéticos de plantas normais, hiperídricas e revertidas de *Croton lechleri* propagadas *in vitro*, no experimento 2

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		Car	Chl a	Chl b	Chl total
Tratamento	2	0,18**	2,88**	0,20**	4,60**
Erro	9	0,00	0,10	0,00	0,00
Total	11	-	-	-	-
CV (%)	-	27,11	29,60	18,37	25,62

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$),
2. tratamento (plantas na condição normal, hiperídrica e revertida).

APÊNDICE G - Resumo da análise de variância para anatomia foliar de plantas de *Croton lechleri* cultivadas em campo e propagadas *in vitro* (normais, hiperídricas e revertidas), no experimento 2

Fonte de variação	GL	Quadrado médio						
		EI	NPP	EPP	EPL	EEAD	EEAB	ELF
Tratamento	3	0,00**	230,97**	0,00**	0,00 ^{ns}	0,00*	0,00*	0,00*
Erro	8	0,01	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	11	-	-	-	-	-	-	-
CV (%)		36,53	19,91	13,84	18,18	15,44	14,75	14,14

Notas: 1. ^{ns} não significativo ($p > 0,05$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$),
2. Tratamento (plantas na condição normal, hiperídrica e revertida).