

**ORGANOGENESE E CARACTERÍSTICAS
MORFOANATÔMICAS DE PINHÃO-MANSO**

CLAUDINÉIA FERREIRA NUNES

2010

CLAUDINÉIA FERREIRA NUNES

**ORGANOGÊNESE E CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS DE
PINHÃO-MANSO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Nunes, Claudinéia Ferreira.

Organogênese e características morfoanatômicas de pinhão-
mango / Claudinéia Ferreira Nunes. – Lavras : UFLA, 2010.

101 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Cultivo *in vitro*. 2. Calogênese. 3. Análises morfológicas. 4.
Jatropha curcas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.85

CLAUDINÉIA FERREIRA NUNES

**ORGANOGENESE E CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS DE
PINHÃO-MANSO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 19 de fevereiro de 2010

Prof. Dr. Evaristo Mauro Castro	UFLA
Dr ^a . Aparecida Gomes de Araujo	UFLA
Dr ^a . Elka Fabiana Aparecida Almeida	EPAMIG
Dr ^a . Ester Alice Ferreira	EPAMIG

Prof. Dr. Moacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus e aos meus pais, Geraldo Vieira Nunes e Hilda Ferreira Nunes,

OFEREÇO

Às minhas irmãs Rena, Vânia, Si e Ni.

Aos meus avós paternos Sebastião e Enelita (in memorian).

Aos meus avós maternos Cassimiro e Laurinda (in memorian).

*Aos meus sobrinhos, Marianna, Camila, Nathália, Nívia, Duda, Arthur,
Robert e Isadora.*

Ao meu orientador, Prof. Moacir Pasqual.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me emprestar diariamente o coração que pulsa, o oxigênio que respiro, o solo em que caminho e milhões de itens para que eu exista.

À Nossa Senhora Aparecida pela sua singular proteção.

Agradeço ao meu pai, Geraldo, pela sua riquíssima humildade e sensibilidade. Agradeço a minha mãe, Hilda, por ter acreditado em mim e me ensinado a sonhar e a nunca desistir dos meus projetos de vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), e ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao amigo e orientador, Prof. Moacir Pasqual, por quem nunca neguei nutrir grande admiração. A objetividade de seu trabalho aliada a um grande conhecimento teórico é, para mim, um norte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Agricultura, e em especial ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pelo apoio durante o período de realização dos trabalhos.

Àos membros da banca examinadora: Prof. Dr Evaristo Mauro de Castro, Dr^a. Aparecida Gomes de Araujo, Dr^a. Elka Fabiana Aparecida Almeida e Dr^a. Ester Alice Ferreira, pela disponibilidade de revisão e avaliação do trabalho.

À minha amiga Cida, que não fez somente um trabalho de revisão, também emitiu opiniões importantes sobre o trabalho e ofereceu-me soluções para problemas que surgiram. De quem, em participações em aulas, bancas e conversas informais, obtive importantíssimas informações profissionais.

Aos amigos laboratoristas Vantuil, Antônio Clarete, Antônio Carlos e Evaldo, pelo apoio na instalação dos experimentos e pelos bons momentos de descontração.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos: doutorandos, mestrandos e estagiários, em especial à estagiária Thaís, pela amizade, paciência e ajuda na realização dos trabalhos, e ao amigo Filipe. Considero todos como uma grande família encantadora. Também aos amigos dos laboratórios de anatomia vegetal e microscopia eletrônica.

À minha grande amiga Dalíhnia, e por que não dizer, “irmã”. Companheira fiel desde os tempos em que era estagiária, agora doutoranda, pessoa por quem tenho grande admiração e respeito. Agradeço pelos momentos de alegria e discussão, eles valeram muito para que nosso trabalho fosse concretizado.

Agradeço à minha família de Lavras, minhas irmãzinhas de república: Déia, Fran, Aline (Flor), Laura e as ex-republicanas, Pauline e Aline Michele, por fazerem parte da minha história de vida em Lavras e pelos riquíssimos momentos de alegria e convivência. Lembrarei com carinho de todas vocês.

Às minhas amigas Carol, Franciane (Fran), Joyce, Aurinete (Net), pela cumplicidade, companheirismo, pelos momentos de boas risadas e diversão. Também não posso deixar de lembrar-me de duas divertidas amigas, Catarina e Simone, pelas quais tenho grande carinho.

Ao querido casal Elka e Franklin, por todo carinho, apoio e companheirismo.

Ao Sr. Nagashi Tominaga, pelo fornecimento das sementes de pinhão-manso.

Agradeço a cada um dos meus amigos que, de forma direta ou indiretamente, colaboraram para a conclusão de mais uma etapa de minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento.

Muito Obrigada !!

BIOGRAFIA

Claudinéia Ferreira Nunes, filha de Hilda Ferreira Nunes e Geraldo Vieira Nunes, nasceu em Riacho dos Machados, MG, no dia 02 de abril de 1979. Coursou o ensino fundamental na Escola Estadual Ediston Alves de Souza e médio na Escola Estadual José Brandão, Caeté, MG, concluindo-o em 1997. Em 2000, foi aprovada no vestibular para o curso de Agronomia da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), sendo contemplada com bolsa de iniciação científica, e teve seu primeiro contato com um Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais. Em janeiro de 2005, graduou-se e iniciou o mestrado em Fitotecnia na UFLA, concluindo-o em 2007. Nessa época, participou como membro ativo do Núcleo de Cultura de Tecidos atuando de forma direta com graduandos, mestrandos e doutorandos. Em março de 2007 iniciou o doutorado em Fitotecnia na UFLA e, trinta e seis meses depois, encerra esta etapa profissional com a presente tese.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1	
1 Introdução geral	2
2 Referencial teórico.....	3
2.1 Aspectos gerais do pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	3
2.2 O pinhão-manso como cultura agroenergética	5
2.3 Importância da luz e da temperatura na germinação.....	7
2.4 Aspectos gerais da organogênese <i>in vitro</i>	9
3 Referências bibliográficas.....	11
CAPÍTULO 2: Qualidade de luz e temperatura na germinação <i>in vitro</i> de embriões de pinhão-manso	
1 Resumo	17
4 Material e métodos.....	21
5 Resultados e discussão.....	24
6 Conclusões.....	29
7 Referências bibliográficas.....	30
Anexos	33
CAPÍTULO 3: Organogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes foliares de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)	
1 Resumo	41
3 Introdução	43
4 Materiais e métodos.....	45
5 Resultados e discussão.....	48
6 Conclusões.....	53
7 Referências bibliográficas.....	54
Anexos	58

CAPÍTULO 4: Água de coco e tipo de vedação na morfogênese <i>in vitro</i> de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)	
1 Resumo	66
2 Abstract.....	67
3 Introdução	68
4 Material e métodos.....	70
5 Resultados e discussão.....	72
6 Conclusões.....	77
7 Referências bibliográficas.....	78
Anexos	81
CAPÍTULO 5: Nitrogênio na organogênese de segmentos foliares de pinhão- manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) cultivados <i>in vitro</i>	
1 Resumo	85
2 Abstract.....	86
3 Introdução	87
4 Material e métodos.....	88
5 Resultados e discussão.....	90
6 Conclusões.....	95
8 Referências bibliográficas.....	96
Anexos	98

RESUMO GERAL

NUNES, Claudinéia Ferreira. **Organogênese e características morfoanatômicas de pinhão-mansão**. 2010. 101 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Mediante a necessidade de produção de insumos aos biocombustíveis e da ampliação do conhecimento da espécie *Jatropha curcas*, o objetivo deste trabalho foi analisar aspectos da germinação de embriões zigóticos e a organogênese *in vitro*, bem como caracterizar, morfológicamente, folhas e calos de pinhão-mansão. Os resultados permitem afirmar que o IVG é maior em 30°C. Maior número de plântulas normais é obtido na luz branca e plântulas mais desenvolvidas na ausência de luz. Seu desenvolvimento ocorre em ausência e presença de luz, caracterizando-a como fotoblástica neutra. Pode ser caracterizada como espécie anfihipoestomática, com maior presença de estômatos na face abaxial, independente da condição de luz ou temperatura. O meio MS com metade da concentração dos sais favorece a formação de calos. A intensidade da coloração do calo e a fonte de explante são parâmetros que devem ser usados na avaliação e na escolha de um tratamento objetivando a organogênese. O BAP proporciona maiores índices de formação de gemas e brotações e a regeneração de gemas, utilizando como fonte de explantes folhas cotiledonares de plântulas *in vitro*, é desejável para a resposta morfogenética. A ausência de água de coco no meio de cultivo favorece a multiplicação das brotações. O uso do filme plástico, seguido da tampa de polipropileno com filtro, tem efeito positivo na indução da organogênese em explantes de pinhão-mansão. As características de formação de gemas sobre a superfície dos explantes de pinhão-mansão podem ser utilizadas como descritores da organogênese, sendo que as estruturas formadas, em meio nutritivo com menores concentrações de água de coco e uso de vedações que permita o mínimo de troca gasosa com o meio externo, são satisfatórias. Recomendam-se concentrações entre 50 e 100% de KNO₃ e NH₄NO₃ no meio MS pois favorecem a indução de calos responsivos com formação de primórdios vegetais. O maior número de brotos é obtido aos 60 dias de cultivo com concentração de 150% para NH₄NO₃ e até 100% para KNO₃, em relação à concentração padrão do meio MS.

* Comitê Orientador: Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Orientador); Dra. Aparecida Gomes de Araujo – UFLA

ABSTRACT

NUNES, Claudinéia Ferreira. **Organogenesis and morpho-anatomical characteristics of physic nut**. 2010. 101 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. *

Through the need for production of inputs for biofuels and the expansion of knowledge of the specie, this study aimed to analyze the germination of zygotic embryos and the *in vitro* organogenesis, as well as to characterize morphologically, leaves and callus of physic nut. The results indicate that the IVG is greater in 30 °C. Increased number of normal seedlings is obtained in white light and seedling more developed in the absence of light. Its development of the specie studied occurs in the absence and presence of light, characterizing it as neutral photoblastic. Can be characterized as an amphihypostomatic specie, with greater presence of stomata on the abaxial surface, independent of lighting conditions or temperature. The MS medium with half concentration of salt favors the formation of callus. The intensity of callus staining and the explant source are parameters to be used in evaluating and choosing a treatment aiming organogenesis. The BAP induces higher levels of buds and shoots formation and, the bud regeneration using as source of explant cotyledonary leaves of *in vitro* seedlings, is desirable for the morphogenetic response. The absence of coconut water in the culture medium favors the multiplication of shoots. The use of plastic film, followed by the polypropylene cap with filter has a positive effect on the induction of organogenesis in explants of physic nut. The characteristics of buds formation on the surface of explants of physic nut can be used as descriptors of organogenesis, and the structures formed, on nutrient medium with lower concentrations of coconut water and the use of sealing that allow the minimum of gas exchange with the external environment, are satisfactory. It is recommended concentrations between 50 and 100% of KNO₃ and NH₄NO₃ in the MS medium because it favors the induction of responsive callus with formation of early plants. The highest number of shoots is obtained at 60 days of culture with concentration of 150% to NH₄NO₃ and up to 100% to KNO₃, compared to the standard concentration of MS medium.

* Guidance committee: Dr Moacir Pasqual – UFLA (Adviser); Dra. Aparecida Gomes de Araujo – UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização da biomassa para fornecer energia tem sido fundamental para o desenvolvimento da civilização. Biomassa contribui para uma parte significativa do consumo global de energia primária e sua importância tende a aumentar no futuro cenário energético mundial (Vasudevan et al., 2005). Para Urquiaga et al. (2005), os biocombustíveis também favorecem a sustentabilidade ambiental através da redução no uso de energia fóssil pela sociedade, com conseqüente diminuição na emissão de gases de efeito estufa.

O pinhão-mansão, de nome científico *Jatropha curcas*, pertence à família Euphorbiaceae e tem sido reconhecido como mais uma boa opção no leque de plantas oleaginosas para a produção de biodiesel. Na América Central, seu mais provável local de origem, o pinhão-mansão foi largamente utilizado na indústria de sabão e igualmente em cercas-vivas, mas, atualmente, os interesses pela planta têm tido relação com a produção de combustível renovável (Durães & Laviola, 2009).

O pinhão manso é uma cultura que possui potencial de rendimento de grãos e óleos e, em sua fase inicial, permite o cultivo em consórcio com outras culturas de interesse econômico e alimentar. Além disso, não concorre diretamente com a agricultura de alimentos, por ser uma espécie não alimentar. Por todos esses motivos, essa oleaginosa é considerada uma cultura potencial para atender a produção do biocombustível.

Mediante o emprego racional de suas técnicas, a cultura de tecidos pode tanto propiciar a produção comercial contínua de mudas de pinhão-manso de alta qualidade, como gerar variabilidade, tão importante para o melhoramento genético. E, assim, em interação com as modernas técnicas da biotecnologia, ter uma participação essencial no atendimento à crescente demanda de matéria prima para o setor agroenergético.

As pesquisas colocam em evidência o entendimento e a utilização da espécie para a produção de óleo e o desenvolvimento de sistemas produtivos. No entanto, é preciso que a espécie seja domesticada e domesticar o pinhão manso significa gerar valor para uma espécie de ocorrência natural e criar uma nova cultivar, para que assim a oleaginosa deixe de ser potencial e passe a ser uma nova matéria-prima para o mercado do biodiesel (Durães & Laviola, 2009).

Estes esforços focam o estado da arte sobre o entendimento e a utilização da espécie no Brasil e no mundo e buscam atender às exigências do mercado competitivo e o tempo necessário para que a ciência possa produzir resultados e efeitos consolidados para o entendimento e utilização adequada da espécie.

Objetivou-se, com este trabalho, analisar aspectos da germinação de embriões zigóticos e a organogênese *in vitro*, bem como caracterizar, morfológicamente, folhas e calos de pinhão-manso.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)

Jatropha curcas é o nome científico de uma planta do gênero *jatropha*, da família Euforbiaceae, denominada popularmente como pinhão-manso, purgueira, pinha de purga, dentre outros nomes populares.

O gênero *Jatropha* contém cerca de 175 espécies conhecidas, com variações significativas em relação à resistência/tolerância a pragas e doenças, ao perfil dos ácidos graxos presentes no óleo, ao padrão de florescimento e frutificação. Linnaeus (1753) foi o primeiro a nomear o pinhão-manso de *curcas* L. em "Species Plantarum". O nome do gênero *Jatropha* deriva da palavra grega *iatrós* (doutor) e *trophé* (comida), implicando as suas propriedades medicinais (Heller, 1996).

Existem pesquisadores que consideram o pinhão-mansão nativo do Brasil, mas, conforme o Anuário Brasileiro de Agroenergia - ABA (2007), seu mais provável local de origem é a América Central; outros autores, como Tominaga et al. (2007), apontam o México como seu país de origem; os índios que migraram da América do Norte para a América do Sul, há mais de dez mil anos, seriam os responsáveis por sua distribuição do México até a Argentina, incluindo o Brasil.

O pinhão-mansão tem a sua ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, como México, América Central, Brasil, Bolívia, Peru, Argentina e Paraguai. *Jatropha curcas* (L.) é uma espécie natural introduzida no Brasil há séculos e está dispersa em grande parte do território nacional, na forma de plantas isoladas ou reduzidos maciços em pequenas alamedas e cercas, quintais e sítios, indicando forte ação antrópica para manutenção e disseminação da espécie.

O pinhão-mansão é um arbusto que pode atingir mais de 3 metros de altura e segue a arquitetura clássica das euforbiáceas, sendo a primeira inflorescência apical, com a emissão de dois novos ramos secundários, que passam a ser axilares até o surgimento de novas inflorescências que, por sua vez, impedem novamente o crescimento apical, surgindo dois novos ramos, os ramos terciários. Planta perene, com folhas decíduas na estação seca, ressurgindo logo após as primeiras chuvas e é também uma planta xerófita, com elevada resistência a seca (Arruda et al., 2004; Saturnino et al., 2005). É uma planta de região quente, embora se desenvolva bem em baixas temperaturas e pode suportar geada leve. A produtividade do pinhão-mansão é bastante variável, em função da região de plantio, método de cultivo e tratamentos culturais (Arruda et al., 2004).

Apresenta muitos atributos, múltiplos usos, podendo ser usada para prevenir e/ou controlar erosão, cultivada como cerca viva, útil na produção de sabão, vela, pesticida e possui efeitos farmacológicos apresentados pelas folhas,

sementes e cascas utilizados na medicina caseira (Staubmann et al., 1999). Além disso, é plantada como cultura comercial agroenergética (Openshaw, 2000; Li & Yang, 2001; Lin et al., 2004; Mampane et al., 2006). Esta última utilização tem implicações importantes para práticas de substituição de combustíveis fósseis. Estas características, juntamente com a sua versatilidade tornam-o de importância vital para os países em desenvolvimento (Kumar & Sharma, 2008).

Inicialmente na década de 1980 e, mais recentemente, a partir de 2005, a espécie está sendo plantada em áreas comerciais e experimentais, visando seu entendimento e aproveitamento para a produção de óleos (Durães & Laviola, 2009). Apesar de ser considerada uma planta rústica, adaptada a condições edafoclimáticas marginais, o pinhão-mansoso necessita da aplicação de tecnologias de cultivo (adubação, controle de pragas e doenças, práticas de manejo, etc.) para apresentar níveis econômicos de produção.

2.2 O pinhão-mansoso como cultura agroenergética

O Brasil precisa de óleos de qualidade e busca, nas matérias-primas convencionais e potenciais, oportunidades para ofertar quantidades consistentes destes produtos e atender às crescentes demandas nacionais e globais. As espécies convencionais são culturas “com domínio tecnológico” e cadeias produtivas consolidadas. Dentre as espécies potenciais, o pinhão mansoso (*Jatropha curcas* L.) tem sido considerado como uma das alternativas de interesse, com o objetivo de transformá-la de espécie natural em espécie cultivada, em bases científicas.

Durães & Laviola (2009) destacam que o pinhão mansoso se tornou uma matéria prima atrativa para produção de biodiesel por apresentar um elevado potencial de rendimento de grãos e óleo: a produtividade do pinhão mansoso pode ser de três a quatro vezes superior a da soja, que está em torno de 500 litros/ha. Além disso, o pinhão mansoso é uma espécie não alimentar, ou seja, não concorre

diretamente com a agricultura de alimentos. A espécie possui, também, características compatíveis com o perfil da agricultura familiar: é uma espécie perene, não necessita de renovação anual do cultivo, dependente de mão-de-obra e os espaçamentos adotados permitem, nos primeiros anos de cultivo, o consórcio com outras culturas, podendo se produzir, em uma mesma área, matéria-prima para produção de energia e alimento. Estas características somadas a outras fazem com que o pinhão-manso se torne uma oleaginosa com potencial para atender ao Programa Nacional de Produção de Biodiesel. Deste modo, a sua importância envolve, além da inclusão social da agricultura familiar, a possibilidade de diversificação na matriz agroenergética.

No entanto, existem alguns desafios técnicos e científicos para a inserção do pinhão-manso na matriz energética de biocombustíveis no Brasil que podem ser analisados através de três aspectos: Primeiro, tecnologia de produção e produtividade da cultura: necessidade de conhecimentos científicos que fundamentem e dêem base genética aos descritores botânicos, melhoramento e sistemas de produção; segundo, limitações normativas para o cultivo do pinhão-manso: registro nacional de cultivares (RNC) e exploração comercial; e terceiro, qualidade do óleo vegetal e aproveitamento da torta: presença de fatores antinutricionais, alergênicos e tóxicos (como a curcuma e ésteres de forbol) (Durães & Laviola, 2009).

Os desafios do cultivo do pinhão-manso requerem a coordenação de esforços e, para fazer frente a essa demanda, é necessário articular e trabalhar com perspectivas de alta densidade científica e tecnológica, visando otimizar o uso de recursos para definir tecnologias e estratégias que viabilizem a inserção do pinhão-manso na cadeia produtiva do biodiesel.

2.3 Importância da luz e da temperatura na germinação

A germinação é o conjunto de processos fisiológicos e uma sequência ordenada de atividades metabólicas divididas em fases, que resulta na formação de uma plântula, sendo uma etapa importante para iniciação da cultura *in vitro* de tecidos vegetais e também uma estratégia promissora na obtenção de plantas em grande quantidade (Kulkarni et al., 2006).

Tanto as características de natureza extrínseca (fatores do ambiente físico) e intrínseca, ou seja, os processos fisio-metabólicos interferem nas respostas de germinação e desenvolvimento de diferentes espécies. Entre eles, a luz e a temperatura.

A temperatura é um fator ambiental crucial na germinação de sementes e embriões *in vitro*, pois afeta tanto a porcentagem final como também a velocidade de germinação; além disso, ainda está relacionada com as reações bioquímicas necessárias para o início do processo germinativo. A temperatura afeta o processo germinativo de três maneiras distintas: sobre o total de germinação, sobre a velocidade de germinação e sobre a uniformidade de germinação (Carvalho & Nakagawa, 2000).

A germinação será mais rápida e o processo mais eficiente quanto maior for a temperatura, dentro de certos limites. A temperatura ótima, para a maioria das espécies cultivadas, encontra-se entre 20-30°C. Abaixo da temperatura ótima há redução da velocidade do processo, o que pode também levar a uma redução no total de germinação. Carvalho & Nakagawa (2000) relatam também que a temperatura ótima para a germinação varia de acordo com as espécies, sendo esta definida geneticamente e, também, em função das condições fisiológicas das sementes.

A luz é outro fator ambiental que desencadeia sinais internos de ativação ou inativação de vias metabólicas nas sementes, nas plantas (Bhattacharya & Khuspe, 2001; Kerbauy, 2008) e nos embriões zigóticos *in vitro*.

As respostas de desenvolvimento das plantas às propriedades do ambiente de luz são coletivamente referidas como fotomorfogênese. Respostas fotomorfogenéticas envolvem a ação de várias classes distintas de fotorreceptores, incluindo os fitocromos, que são sensíveis às diferentes regiões do espectro luminoso. Os fitocromos são cromoproteínas interconvertíveis entre a forma inativa e ativa. Quando a forma inativa absorve luz vermelha ou luz azul, altera a conformação estrutural de seu cromóforo e se converte em forma ativa, e ao absorver na faixa do vermelho extremo retorna à forma inativa. A resposta à luz dependerá da fluência luminosa, da qualidade e da quantidade de luz inserida no processo. Sementes e/ou embriões *in vitro* de diferentes espécies emitem respostas fisiológicas distintas conforme a qualidade e intensidade de luz (Kulkarni et al., 2006). A transição da condição heterotrófica do embrião, dependente das reservas nutritivas, para o estágio autotrófico da plântula é regulado pela luz (Kerbauy, 2008).

A avaliação de diferentes qualidades de luz no desenvolvimento vegetal revela variações nos parâmetros morfológicos e fisiológicos e na otimização da produção de metabólitos primários e especiais (Islam et al., 1999; Victorio et al., 2007a; Victorio et al., 2007b). Com base na sensibilidade ao estímulo luminoso, as sementes e/ou embriões *in vitro* são classificados em três categorias: fotoblásticas positivas, negativas e neutras. Fotoblásticas positivas possuem a germinação promovida pela luz branca, não germinando no escuro. Por outro lado, as fotoblásticas negativas apresentam germinação inibida pela luz branca, enquanto as neutras são indiferentes à luz (Carvalho & Nakagawa, 2000).

Várias técnicas para manipulação da qualidade da luz e da temperatura têm sido utilizadas na multiplicação de plantas. Alguns trabalhos mostram efeitos marcantes sobre a fotomorfogênese de plantas, seja pela iluminação artificial ou coberturas coloridas que modificam a radiação por elas transmitida (Menezes et al., 2004; Stefanello et al., 2008; Victorio & Lage, 2009).

2.4 Aspectos gerais da organogênese *in vitro*

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas, nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado em condições assépticas sobre um meio nutritivo artificial. O fundamento básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, segundo o qual qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (Pasqual, 2000). Dessa forma, é uma importante ferramenta, não só na genética e no melhoramento de plantas, como também pode auxiliar em inúmeras áreas da agricultura (Ramalho et al., 1997).

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica vantajosa, quando aplicada a variedades de importância econômica que possuem pouco material e necessitam ser propagadas em curto período de tempo e em grande escala, destacando-se como alternativa importante para a multiplicação da espécie *Jatropha curcas*.

O estabelecimento *in vitro* do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é essencial quando se deseja fazer a manutenção da espécie, utilizando-se procedimentos biotecnológicos. Para tanto, devem estar disponíveis, na literatura, protocolos para obtenção de plântulas, material juvenil para utilização como explante, bem como protocolos de organogênese e embriogênese somática de plantas a partir de hipocótilo, raiz, ápices meristemáticos, gemas e segmentos nodais e foliares.

A organogênese *in vitro* pode ser definida como o processo no qual células e tecidos vegetais são induzidos a sofrer mudanças que levam à produção de uma estrutura unipolar, denominada primórdio vegetativo, cujo sistema vascular está frequentemente conectado com o tecido de origem. Pode ocorrer diretamente, a partir de células do explante original, ou indiretamente, via formação de calos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Inúmeros fatores podem estar, direta ou indiretamente, envolvidos com o sucesso da morfogênese *in vitro*, podendo citar como exemplos: o tipo de explante, o balanço de fitorreguladores, a disponibilidade de nutrientes, as condições ambientais nas quais se dá o cultivo e os fatores genéticos, entre outros. Arruda et al. (2005), por exemplo, afirmam que a temperatura de cultivo dos materiais fornecedores de explantes influencia na indução do processo organogênico, ocasionando variações na eficiência de regeneração.

Em geral, são reconhecidas três fases da organogênese, com base na natureza manipulável da cultura de tecidos no controle da mesma. Na primeira fase, as células dos explantes adquirem competência, a qual é definida como a habilidade de responder a sinais hormonais de indução de órgãos. O processo de aquisição da competência organogênica é referido como desdiferenciação, no qual a competência das células dos explantes cultivados é canalizada e determinada para a formação de um órgão específico sob a influência de fatores exógenos como os fitohormônios durante a segunda fase. Então, a morfogênese ocorre independentemente dos estímulos exógenos durante a terceira fase (Sugiyama, 1999).

Já existem vários estudos publicados sobre a regeneração *in vitro* de diversas espécies de *Jatropha* (Prabakaran & Sujatha, 1999; Sujatha & Reddy, 2000; Sardana et al., 2000; Sujatha & Prabakaran, 2003; Sujatha et al., 2005; Jha et al., 2007; Deore & Johnson, 2008; Li et al., 2008; He et al., 2009), mas as informações ainda são incipientes. Diversos fatores contribuem para isso e um dos principais é a variação da resposta entre genótipos. As variações são mais evidentes quando são feitos experimentos com espécies pouco domesticadas, como a *J. curcas*, em que a variabilidade genética é muito grande. As respostas diferentes se acentuam por conta dos vários explantes utilizados, das diversas condições ambientais de incubação, como luz, temperatura e fotoperíodo,

balanço de fitorreguladores, tipos de frascos e suas vedações, meios de cultura e suas variações, dentre outros fatores.

A despeito da importância dos estudos morfológicos para a organogênese, pouco tem sido publicado em *Jatropha curcas*. Para visualizar a via de regeneração *in vitro*, diferenciando-se gemas caulinares de estruturas foliares isoladas, devem ser realizados estudos de diferenciação morfológica. A formação organogênica de estruturas foliares isoladas compromete o sucesso da cultura *in vitro*, pois a presença de meristema apical caulinar é essencial para a produção de brotos. Depois de caracterizar a via de regeneração, podem-se estabelecer melhores condições de cultivo, para o estabelecimento de protocolos eficientes na indução e obtenção de plantas.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DE AGROENERGIA. **Pinhão manso**. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2007. 520 p.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.

ARRUDA, S. C. C.; MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; RODRIGUEZ, A. P. M. Efeito da temperatura na organogênese adventícia em maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S. (Ed). **Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro: trabalhos apresentados**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2005. p. 187-191.

BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. In vitro and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 91, n. 1/2, p. 39-49, 2001.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

- DEORE, A. J.; JOHNSON, T. S. High frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel crop. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 2, n. 1, p. 7-11, 2008.
- DURÃES, F.; LAVIOLA, B. Pinhão manso: oleaginosa potencial para o biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO-MANSO PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO: TECNOLOGIA PARA BIOCOMBUSTÍVEIS, 1., 2009, Brasília. **Anais...** Brasília: [s.n.], 2009. 1 CD-ROM.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v.1, p.183-260.
- HE, Y.; GUO, X.; LU, R.; NIU, B.; PASAPULA, V.; HOU, P.; CAI, F.; XU, Y.; CHEN, F. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 1, p. 11-17, 2009.
- HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas***: promotion and use of underutilized and neglected crops. Rome: IPGRI, 1996. 66 p.
- ISLAM, M. O.; MATSUI, S.; ICHIHASHI, S. Effects of light quality on seed germination and seedling growth of *Cattleya* orchids in vitro. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 68, n. 6, p. 1132-1138, 1999.
- JHA, T. B.; MUKHERJEE, P.; DATTA, M. M. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 1, n. 3, p. 135-140, 2007.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 431 p.
- KULKAMI, M. G.; SPARG, S. G.; STADEN, J. V. Dark conditioning, cold stratification and a smoke-derived compound enhance the germination of *Eucomis autumnalis* sbsp. *autumnalis* seeds. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 1, p. 157-162, 2006.
- KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, Netherlands, v. 2, n. 8, p. 1-10, 2008.

- LI, M.; LI, H.; JIANG, H.; PAN, X.; WU, G. Establishment of an Agrobacterium-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. **Plant Cell, Tissue and Org Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 2, p. 173-181, 2008.
- LI, W. L.; YANG, H. Research on a recycling energy plant *Jatropha curcas* seed oil chemical component analysis. **Yunnan University**, [S.l.], v. 22, n. 5, p. 324-330, 2001.
- LIN, J.; ZHOU, X. W.; TANG, K. X.; CHEN, F. A survey of the studies on the resources of *Jatropha curcas*. **Journal of Tropical and Subtropical Botany**, Guangzhou, v. 12, n. 3, p. 285-290, 2004.
- LINNAEUS, C. Species plantarum. In: _____. **Jatropha**. Stockholm: Impensis Laurentii Salvii, 1753. p. 1006-1007.
- MAMPANE, K. J.; JOUBERT, P. H.; HAY, I. T. *Jatropha curcas*: use as a traditional Tswana medicine and its role as a cause of acute poisoning. **Phytotherapy Research**, London, v. 1, n. 1, p. 50-51, 2006.
- MENEZES, N. L. de; FRANZIN, S. M.; TERESINHA ROVERSI, T.; NUNES, E. P. Germinação de sementes de *Salvia splendens* Sellow em diferentes temperaturas e qualidades de luz. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 32-37, 2004.
- OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2000.
- PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 80 p.
- PRABAKARAN, A. J.; SUJATHA, M. *Jatropha tanjorensis* Ellis and Saroja, a natural interspecific hybrid occurring in Tamil Nadu, India. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 213-218, 1999.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 4. ed. São Paulo: Globo, 1997. 359 p.
- SARDANA, J.; BATRA, A.; ALI, D. J. Na expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. propagation and in vitro culture. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 50, n. 3/4, p. 239-242, 2000.

- SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.
- STAUBMANN, R.; NCUBE, I.; GUBITZ, G. M.; STEINER, W.; READ, J. S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, n. 2/3, p. 117-126, 1999.
- STEFANELLO, S.; CHRISTOFFOLI, P.; FRANTZ, G.; ROCHA, A. C. de S.; SILVA, J. M. da; STEFANELLO, R.; SCHUELTER, A. R. Germinação de sementes armazenadas de cubiu sob diferentes condições de luz. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 9, n. 3, p. 363-367, 2008.
- SUGIYAMA, M. Organogenesis in vitro. **Current Opinion in Plant Biology**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 61-64, 1999.
- SUJATHA, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 47, n. 1, p. 83-90, 2005.
- SUJATHA, M.; PRABAKARAN, A. J. New ornamental *Jatrophas* through interspecific hybridization. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, n. 1, p. 75-82, 2003.
- SUJATHA, M.; REDDY, T. P. Role of cytokinins and explant interaction on adventitious shoot regeneration in *Jatropha integerrima*. Jacq. **Biologia**, Bratislava, v. 55, n. 8, p. 99-104, 2000.
- TOMINAGA, N.; KAKIDA, J.; YASUDA, E. K.; SOUZA, L. A. S.; RESENDE, P. L.; SILVA, N. da D. **Cultivo do pinhão manso para produção de biodiesel**. Viçosa, MG: Centro de Produções Técnicas, 2007. 220 p.
- URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Produção de biocombustíveis: a questão do balanço energético. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 42-46, 2005.
- VASUDEVAN, P.; SHARMA, S.; KUMAR, A. Liquid fuel from biomass: an overview. **Journal of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, v. 64, n. 1, p. 822-831, 2005.

VICTORIO, C. P.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Qualidade de luz e producao de pigmentos fotossinteticos em plantas in vitro de *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul, v. 5, n. 2, p. 213-215, 2007a.

VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S. Efeitos da qualidade de luz na germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* de *Phyllanthus tenellus*. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 40, n. 3, p. 400-405, 2009.

VICTORIO, C. P.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S. Anatomia de plantas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. cultivadas in vitro sob diferentes qualidades de luz. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 216-218, 2007b.

CAPÍTULO 2

QUALIDADE DE LUZ E TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE PINHÃO-MANSO

1 RESUMO

O pinhão-mansão possui potencial para o mercado agroenergético devido à alta produtividade de frutos e acúmulo de altos níveis de óleo. Existem muitas informações sobre características agronômicas do pinhão-mansão e poucas sobre exigências de luz e temperatura no processo germinativo de suas sementes *in vitro*. Objetivou-se estudar os efeitos de diferentes condições de luz e temperatura na germinação *in vitro* de embriões e descrever a anatomia foliar de plântulas de *Jatropha curcas* cultivadas nessas mesmas condições. Embriões zigóticos de pinhão-mansão foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio básico de Murashige & Skoog (MS), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar. Os tratamentos consistiram do cultivo desses embriões em diferentes condições, combinadas entre si: temperatura (25 e 30 °C) e qualidade de luz (branca, vermelha, vermelha extrema e ausência de luz). O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso. Avaliaram-se características fitotécnicas das plântulas e anatomia das folhas das plântulas oriundas dos embriões cultivados *in vitro*. Para a análise das estruturas anatômicas foram utilizadas técnicas de microscopia de luz e de varredura no material botânico fixado. O IVG é maior em 30°C. Maior número de plântulas normais é obtido na luz branca e plântulas mais desenvolvidas na ausência de luz. O desenvolvimento da espécie estudada ocorre em condições de ausência e presença de luz, caracterizando-a como fotoblástica neutra. O pinhão-mansão pode ser caracterizado como espécie anfilipoestomática, com maior presença de estômatos na face abaxial, independente da condição de luz ou temperatura.

2 ABSTRACT

The physic nut has potential for the agro-energy market due to its high productivity and high levels of oil accumulation. There are a lot of information on the agronomic characteristics of jatropa and few about the demands on light and temperature on the germination of *in vitro* seeds. The objective was to study the effects of different conditions of light and temperature on *in vitro* germination of embryos and to describe the foliar anatomy of seedlings of *Jatropha curcas* grown in these same conditions. Zygotic embryos were inoculated individually in test tubes containing 15 mL of basic medium of Murashige and Skoog (MS) added with 30 g L⁻¹ of sucrose and 6 g L⁻¹ of agar. The treatments consisted of growing these embryos in different conditions, combined with each other: temperature (25 and 30°C) and light quality (white, red, far red and light absence). The experimental design was completely randomized. It was evaluated developmental characteristics and the leaves anatomy of seedling derived from embryos cultivated *in vitro*. For the analysis of anatomical structure, it was used techniques of light and scanning electron microscopy on the fixed botanic material. The IVG is greater in 30°C. Increased number of normal seedlings is obtained in white light and more developed seedling in the absence of light. The development of the studied specie occurs in conditions of absence and presence of light, characterizing it as neutral photoblastic. Physic nut can be characterized as hypoamphistomatic specie, with greater presence of stomata on the abaxial surface, independent of lighting or temperature conditions.

3 INTRODUÇÃO

O sistema de produção de biocombustível pode cooperar com o desenvolvimento econômico de diversas regiões do Brasil, uma vez que é possível explorar, de acordo com as condições edafoclimáticas, a melhor alternativa de matéria-prima, no caso fontes de óleos vegetais tais como óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), mamona (*Ricinus communis* L.) e girassol (*Helianthus annuus*). O pinhão-manso, destaque como planta oleaginosa promissora, é uma espécie arbustiva ou arbórea de médio porte, pertencente à família Euphorbiaceae, de ocorrência espontânea desde o Maranhão até o Paraná. A planta é resistente à seca e apresenta crescimento mais rápido em regiões de clima quente (Arruda et al., 2004).

O pinhão-manso não apresenta entraves na germinação *in situ*, mas a desuniformidade das plântulas, a indisponibilidade de genes de interesse ao melhoramento como os de resistência a pragas e doenças ou os genes relacionados ao metabolismo dos ácidos graxos, não estão disponíveis, devido às barreiras interespecíficas. Barreiras deste tipo e a desuniformidade podem ser rompidas com o auxílio de técnicas como a cultura de embriões. A propagação *in vitro*, pela cultura de embriões, torna-se uma ferramenta bastante valiosa, uma vez que permite, dentre outras aplicações, o conhecimento da fisiologia da germinação, o fornecimento de explantes juvenis para propagação clonal e a aceleração dos programas de melhoramento.

Estudos promissores sobre o comportamento germinativo de espécies de *Jatropha* têm sido realizados com a técnica da cultura de embriões zigóticos, sendo que os principais resultados estão relacionados ao aumento das taxas de germinação, uniformidade das plantas e conversão de plântulas viáveis para espécies como *Jatropha podagrica* (Jesus et al., 2003) e *Jatropha curcas* (Nunes et al., 2008).

O ambiente exerce papel fundamental na fisiologia da germinação. Para muitas espécies, o fornecimento de condições ideais de luz e temperatura determinará tanto a quantidade de material germinativo como a velocidade de germinação (Menezes et al., 2004), permitindo uma compreensão mais precisa dos mecanismos que regulam a longevidade do material vegetal em condições *in vitro* ou no solo e o posterior estabelecimento das plantas em condições naturais.

Existe grande variabilidade de respostas germinativas em função da luz. A germinação das sementes ou de embriões zigóticos de espécies fotossensíveis pode ser estimulada ou inibida, dependendo da qualidade espectral da luz. Para essas respostas existe um pigmento receptor, o fitocromo, responsável pela captação de sinais luminosos, que podem ou não desencadear a germinação. Esse pigmento se encontra em todas as plantas superiores e ao absorver luz num determinado comprimento de onda, muda sua estrutura bioquímica e permite, ou não, a resposta fotomorfogenética (Borges & Reno, 1993). Aparentemente, o fitocromo está sempre associado ao funcionamento das membranas biológicas, regulando, provavelmente, sua permeabilidade e controlando dessa maneira, o fluxo de inúmeras substâncias dentro das células e entre elas (Taiz & Zeiger, 2004).

A temperatura age sobre a velocidade de absorção de água e também sobre as reações bioquímicas que determinam todo o processo e, em consequência, afeta tanto a velocidade e uniformidade de germinação, como a germinação total. A germinação só ocorre dentro de determinados limites de temperatura, nos quais existe uma temperatura ótima, ou faixa de temperaturas, na qual o processo ocorre com a máxima eficiência, obtendo-se o máximo de germinação no menor período possível (Carvalho & Nakagawa, 2000).

A influência da luz e da temperatura na germinação *ex vitro* ou *in vitro* das espécies tem sido estudada como uma forma de avaliar quais as condições ambientais mais favoráveis ao processo germinativo em ambientes naturais.

Os atributos luz e temperatura no ambiente de cultivo influenciam aspectos anatômicos e fisiológicos, interferindo na qualidade das plantas. A estrutura da folha pode ser grandemente influenciada pelo nível de luz e temperatura durante o crescimento *in vitro*. O aumento nos níveis de luz e temperatura pode proporcionar aumentos nas espessuras dos tecidos que compõem o limbo foliar (Dickison, 2000).

A anatomia foliar em *Jatropha* ainda é pouco estudada e os trabalhos descritivos não apresentam abordagem específica para o gênero *curcas* (Dehgan, 1980; Olowokudejo, 1993).

Os reduzidos estudos existentes, enfocando a germinação *in vitro* de embriões zigóticos em espécies oleaginosas perenes e sua caracterização anatômica, motivaram este trabalho com o objetivo de estudar os efeitos de diferentes condições de luz e temperatura na germinação *in vitro* de embriões e descrever a anatomia foliar de plântulas de *Jatropha curcas*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Agricultura, na Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, no ano de 2008.

Utilizou-se como material vegetal, sementes colhidas na safra de 2008, provenientes da matriz Oracília, acesso selecionado do banco de germoplasma do município de Janaúba (MG), cedidas pela empresa NNE Minas Agroflorestral. As sementes para manutenção de sua qualidade foram armazenadas por seis meses sob condições de câmara fria (temperatura de 10°C e umidade relativa de 60%), no Setor de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA. As sementes tiveram o invólucro exterior (tegumento) removido e foram submetidas à assepsia pela imersão em água destilada, com duas gotas de detergente comercial por 1 min, em álcool 70% v/v

por 1 min e em hipoclorito de sódio 1% v/v por 20 min, sob agitação constante. Os agentes desinfestantes foram removidos com tríplice lavagem em água destilada estéril, permanecendo por trinta minutos na quarta água, para posterior utilização.

Em câmara de fluxo laminar, os tegumentos das sementes foram separados longitudinalmente pela região oposta à micrópila, sendo os embriões excisados e a seguir colocados, individualmente, em tubos de ensaio de 25x150 mm, com 15 mL do meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) distribuídos em grades.

Para avaliar o desenvolvimento dos embriões, câmaras de germinadores tipo BOD, com fotoperíodo de 16h/8h, foram utilizadas e aplicaram-se como tratamentos as combinações dos seguintes fatores: temperaturas (25°C e 30 °C) e condições de luz (branca, vermelha, vermelha extrema e ausência de luz).

Para se obter a luz branca, as grades foram revestidas com duas camadas de papel celofane transparente e expostas à luz produzida por quatro lâmpadas fluorescentes (20W), fixadas internamente na porta do germinador. A luz vermelha foi obtida a partir da luz branca que ultrapassou duas folhas de papel celofane vermelho envolvendo cada grade e a luz vermelha extrema com a cobertura das grades com duas folhas de papel celofane azul e duas folhas de papel celofane vermelho, conforme indicações de Menezes et al. (2004). A ausência de luz foi obtida pelo uso de papel laminado e tecido TNT preto envolvendo as grades.

As observações fitotécnicas foram feitas diariamente, durante 10 dias. O monitoramento das avaliações foi realizado sob luz verde fraca de segurança e analisados os seguintes parâmetros: índice de velocidade de germinação (IVG), conforme Maguire (1962): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$ onde: G1, G2, Gn = número de plântulas germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e N1, N2, Nn = número de dias desde o primeiro, segundo, até a

última contagem, porcentagem de germinação, plântulas normais e anormais e comprimento de plântulas aos 10 dias após a inoculação.

Os embriões foram considerados germinados após crescimento do eixo embrionário e expansão dos cotilédones.

O critério adotado para descrição de plântulas normais, além do desenvolvimento da plúmula e da raiz primária na mesma estrutura, foi a expansão cotiledonar e, esporadicamente, o desenvolvimento de raízes secundárias. Plântulas com aspecto hiperídrico e cujo crescimento da plúmula e da raiz primária mostrou-se atrofiado, e ausência de expansão cotiledonar, foram consideradas anormais.

As avaliações anatômicas foram realizadas ao término do experimento e as plântulas selecionadas foram fixadas em álcool etílico 70% até a realização das análises.

Para caracterização da anatomia foliar foram mensurados espessura das epidermes abaxial e adaxial, parênquimas paliçádico e esponjoso (características de limbo foliar) em microscopia de luz, segundo protocolo de Kraus & Arduin (1997). As fotomicrografias foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da UFLA, utilizando-se máquina fotográfica acoplada a um microscópio Olympus modelo BX 60 em objetiva de 10x.

Para melhor definição da epiderme e estômatos, porções da região mediana da folha foram desidratadas em série etanólica crescente, utilizando-se ponto crítico, em seguida as amostras foram metalizadas e observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo Zeiss DSM 940, realizadas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Fitopatologia, segundo protocolo de Alves (2004).

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (duas temperaturas e quatro condições de luz) com 6 repetições de

12 embriões cada uma. Os dados obtidos foram analisados pelo programa Sisvar (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo Teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O índice de velocidade de germinação de embriões zigóticos de pinhão-manso sofreu influência da temperatura (Figura 1A), e não respondeu às diferentes condições de luz (Tabela 1). Os embriões responderam bem quando incubados em temperatura de 30°C, condição esta que permitiu aos embriões germinarem do segundo ao sétimo dia, demonstrando assim alta sincronização em relação à variável analisada.

Sementes e embriões têm a capacidade de germinar dentro de uma determinada faixa de temperatura, peculiar a cada espécie, mas o tempo necessário para se obter a porcentagem máxima de germinação é dependente da temperatura (Malavasi, 1998). Percebe-se que a germinação foi mais rápida e o processo mais eficiente, quando a temperatura passou de 25°C para 30°C (Figura 1A), correspondendo de forma satisfatória a um IVG de 5,63, superior ao resultado de 4,60 obtido na condição de temperatura de 25°C, caracterizando menor velocidade do processo. De acordo com os resultados obtidos, o índice de velocidade de germinação foi mais expressivo quando estes embriões foram expostos a condições elevadas de temperatura.

Embora tenha ocorrido diferença significativa no índice de velocidade de germinação em relação à temperatura, os resultados não mostraram tendência significativa para porcentagem de germinação dos embriões zigóticos de pinhão-manso em relação aos fatores analisados. A germinabilidade foi elevada em todas as condições de luz avaliadas (acima de 90%), independentemente da temperatura (Tabela 1).

Existe ampla variação nas respostas germinativas em função da sensibilidade à luz para as diferentes espécies, porém, embriões de pinhão-mansão comportaram-se como indiferentes à luz, pois foram capazes de germinar sob todos os estímulos luminosos avaliados. Possivelmente, embriões de pinhão-mansão não exibem fotossensibilidade pois desencadeiam a germinação, em condição de pouca ou na ausência de luz. Para Takaki (2001), que recomenda a forma do fitocromo para classificar a reação das sementes frente à luz, pode-se dizer que o pinhão-mansão possui fitocromo na forma ativa suficiente para induzir a germinação de embriões zigóticos na ausência da luz.

De acordo com os resultados, ainda que não haja diferença significativa, a espécie *J. curcas* requer faixas elevadas de temperatura para que ocorra a germinação, independente da condição de luz. Isto corrobora a hipótese de que a temperatura pode regular a germinação de maneira a determinar sua capacidade e taxa de germinação.

O processo germinativo da espécie *J. curcas* é eficiente tanto a temperaturas constantes de 25°C quanto de 30°C em condições *in vitro*, como evidencia o trabalho. Resultados semelhantes foram observados por Martins et al. (2008) que estudaram temperaturas alternadas de 20-30°C, em sementes de pinhão-mansão, quando cultivadas em substrato areia ou papel.

A espécie em estudo, quando cultivada *in vitro*, requer pouco mais de 5 dias de incubação para completar seu processo de desenvolvimento, alcançando a fase de plântula e exibindo radículas, hipocótilo e folhas cotiledonares, dando origem a plântulas completas. Estas foram influenciadas positivamente pelas condições de luz e o efeito produzido por esse fator revelou maior formação de plântulas normais na luz branca e na ausência de luz, respectivamente. Menor predominância desta variável foi verificada na condição de luz vermelha. Efeito contrário foi observado para plântulas anormais mantidas na luz vermelha e vermelha extrema, nas quais apresentaram os melhores resultados, diferindo dos

demais estímulos luminosos com respostas inferiores (Tabela 1). Este comportamento é apenas quantitativo porque a formação de plântulas normais e/ou anormais ocorreu tanto na presença como na ausência de luz. O desenvolvimento de plântulas, como eventos fotomorfogênicos, está condicionado à disponibilidade de luz e respondem tanto à presença como à ausência.

A temperatura de 30°C correspondeu a uma maior incidência de plântula normal (Figura 1B), independente das condições de luz. A condição mais adequada para germinação de sementes e/ou embriões zigóticos de uma determinada espécie é aquela que permite alcançar o maior número de plântulas normais, associado a um menor número de plântulas anormais, no menor tempo, e o tratamento que apresentou tal condição foi luz branca na temperatura de 30°C.

Para comprimento de plântulas normais, a associação dos fatores condições de luz e temperatura apresentaram resposta significativa (Figura 2). Maior comprimento (11,88 cm) foi obtido quando as plântulas foram cultivadas no escuro em temperatura de 30°C, assim como menor comprimento (4,68 cm) foi visualmente observado no tratamento de luz vermelha extrema com temperatura de 25°C.

Quando uma planta é exposta à luz assim que emerge do solo ou em condições controladas de cultivo, como por exemplo, cultivo *in vitro*, ela sofre influência das condições que lhe são impostas, como algumas mudanças. Uma das alterações mais sérias é o decréscimo na taxa do alongamento do caule, de modo que um caule na luz é mais curto do que um no escuro. Quando uma planta cresce na luz, a taxa de extensão diminui devido à regulação por modificações nos níveis hormonais ou na sensibilidade aos componentes existentes no meio de cultivo (Taiz & Zeiger, 2004), explicando bem o resultado obtido no presente trabalho.

Há uma forte influência da temperatura e da condição de luz, no cultivo *in vitro* de pinhão-mansão; quanto mais elevada a temperatura, maiores comprimentos são exibidos pelas plântulas, em todas as condições de luz (ausência, vermelha extrema, vermelha e branca).

Com base no estímulo luminoso, diversos autores têm utilizado o termo fotoblastismo para agrupar as sementes em diferentes categorias. Desta forma, sementes fotoblásticas positivas são aquelas cuja germinação é promovida pela luz branca, não germinam no escuro, o contrário das fotoblásticas negativas que germinam no escuro. Desta forma, a espécie pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) pode ser considerada como fotoblástica neutra, pois desencadeia a germinação dos embriões zigóticos independente da presença ou ausência de estímulo luminoso.

Quanto às espessuras dos tecidos que compõem o limbo foliar, foram observadas interações significativas para as variáveis analisadas (Tabela 2). Plântulas cultivadas em condições de 25°C exibiram as maiores espessuras para todos os tecidos do limbo foliar, em todos os regimes luminosos, sendo as menores espessuras verificadas na condição de 30°C.

Em secção transversal, a epiderme é unisseriada, com células menores e de tamanhos irregulares (Figura 3B). A epiderme da face adaxial apresentou-se mais espessa que a da face abaxial, sendo a melhor resposta observada na luz vermelha a 25°C e resultado inferior na ausência de luz a 30°C (Tabela 2). O parênquima paliçádico é uniestratificado (Figura 3B) e apresenta uma camada de células com espessura superior para tecido foliar cultivado sob luz vermelha a 25°C e espessura inferior para a ausência de luz a 30°C (Tabela 2). O parênquima esponjoso é constituído por cerca de sete camadas de células irregulares, resultando em espaços com várias dimensões (Figuras 3B e 3C), exibindo maior espessura quando seu tecido é exposto sob luz branca a 25°C (Tabela 2).

Ao se observarem as secções anatômicas das folhas de pinhão-mansão, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi verificado que, nas folhas de plântulas de pinhão-mansão cultivadas sob diferentes temperaturas e condições de luz, os estômatos são arranjados de forma aleatória, superficiais e/ou proeminentes e assumem forma reniforme estreita ou larga. Exibem pouca presença de cera em forma de flocos ou partículas, com epiderme ligeiramente ondulada. As células da face adaxial e abaxial apresentam formato poligonal, variando em tamanho.

Diferenças quanto ao posicionamento dos estômatos foram observadas. Os estômatos das folhas de pinhão-mansão cultivadas a 25°C (Figura 4A-M) apresentaram-se aparentemente bem superficiais, independente da condição de luz, em relação aos estômatos mais proeminentes encontrados na condição de 30°C (Figura 5A-M). Destacando a luz branca (Figura 5E-F) e excetuando-se a luz vermelha extrema, onde não foi possível uma boa visualização dos estômatos (Figura 5L-M), podemos destacar que, provavelmente, estes se encontram mais aprofundados ao longo da epiderme foliar.

Em geral, observou-se a presença de estômatos em ambas as faces, com maior intensidade na superfície da epiderme da face abaxial, caracterizando a espécie como anfihipoestomática. A *Jatropha gossypifolia* (Olowokudejo, 1993) e a *Euphorbia heterophylla* (Ferreira et al., 2003) são consideradas anfiestomáticas. Várias interpretações têm sido dadas para explicar a presença de estômatos em ambas as superfícies foliares. Para Leite & Scatena (2001), folhas anfiestomáticas e hipoestomáticas são características encontradas em plantas que crescem em ambientes mesofíticos, ou seja, ambiente com relativa disponibilidade de água, no solo e na atmosfera.

A espécie *J. curcas* apresenta estômatos paracíticos, assim como a *Jatropha gossypifolia* registrada por Karatela & Gill (1984). Estudos anteriores de Raju & Rao (1977) indicaram a presença de outros tipos de estômatos, como

o braquiparacítico em *J.curcas* e *J.gossypifolia*, porém, em uma frequência muito baixa. Entretanto, segundo Raju & Rao (1977), o tipo mais predominante de estômatos no gênero *Jatropha* é, sem dúvida, o paracítico, sendo considerado como mais comum para a família Euphorbiaceae.

A espécie em estudo cresce naturalmente e com grande frequência, a pleno sol, constituindo-se numa espécie típica de regiões tropicais e subtropicais, o que poderia explicar o seu comportamento em condições *in vitro* ao apresentar tendência de germinar melhor e de acelerar a germinação em temperaturas mais altas que a temperatura ambiente. Também, apresenta ampla adaptabilidade a diferentes condições de luz, seja à sombra, sinônima a ausência de luz ou a outros estímulos luminosos. Como complemento aos estudos de adaptabilidade, a anatomia foliar tem sido uma boa ferramenta para avaliar quais as condições ecológicas mais favoráveis para o desenvolvimento da planta em seu ambiente natural.

6 CONCLUSÕES

O IVG é maior em 30°C. Maior número de plântulas normais são obtidas na luz branca e plântulas mais desenvolvidas na ausência de luz.

O desenvolvimento da espécie estudada ocorre em condições de ausência e presença de luz, caracterizando-a como fotoblástica neutra.

O pinhão-mansão pode ser caracterizado como espécie anfihipoestomática, com maior presença de estômatos na face abaxial, independente da condição de luz ou temperatura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.
- ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.), como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.
- BORGES, E. E. L.; RENO, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PINÃ-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 83-135.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- DEHGAN, B. Application of epidermal morphology to taxonomic delimitations in the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 80, n. 3, p. 257-278, 1980.
- DICKISON, W. C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Academic, 2000. 533 p.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3: sistema de análise estatística**. Lavras: UFLA, 2000.
- FERREIRA, E. A.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, E. A. M.; SILVA, A. A.; RUFINO, R. J. N. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV - *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla* L. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 263-271, 2003.
- JESUS, A. M. S.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. Cultivo in vitro de embriões zigóticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 50, n. 288, p. 183-189, 2003.
- KARATELA, Y. Y.; GILL, L. S. Leaf epidermal features and stomatogenesis in some ornamental Euphorbiaceae. **Feddes Repertorium**, Berlin, v. 95, p. 669-674, 1984.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: UFRRJ, 1997. 198 p.

LEITE, K. R. B.; SCATENA, V. L. Anatomia do segmento foliar de espécies de *Syagrus* Mart. (Arecaceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus. Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 1, n. 1, p. 3-14, 2001.

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

MALAVASI, M. M. Germinação de sementes. In: PIÑARODRIGUES, F. C. M. (Coord.). **Manual de análise de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargill, 1998. p. 25-39.

MARTINS, C. C.; MACHADO, C. G.; CAVASINI, R. Temperatura e substrato para o teste de germinação de sementes de pinhão-manso. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 863-868, maio/jun. 2008.

MENEZES, N. L.; FRANZIN, S. M.; ROVERSI, T.; NUNES, E. P. Germinação de sementes de *Salvia splendens* Sellow em diferentes temperaturas e qualidades de luz. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 32-37, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 43, p. 473-479, 1962.

NUNES, C. F.; SANTOS, D. N. dos; PASQUAL, M.; CUSTÓDIO, T. N.; ARAUJO, A. P. de. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2008.

OLWOKUDEJO, J. D. Comparative epidermal morphology of West African species of *Jatropha* L. (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 2, p. 139-154, 1993.

RAJU, V. S.; RAO, P. N. Variation in the structure and development of foliar stomata in the Euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 75, n. 1, p. 69-97, 1977.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 690 p.

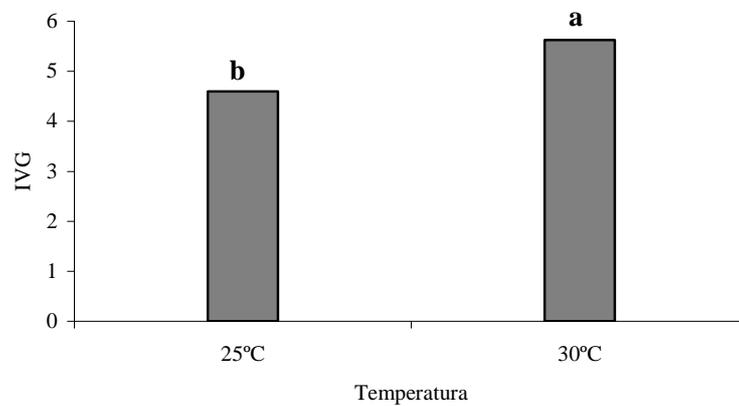
TAKAKI, M. New proposal of classification of seeds based on forms of phytochrome instead of photoblastism. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 103-107, 2001.

ANEXOS

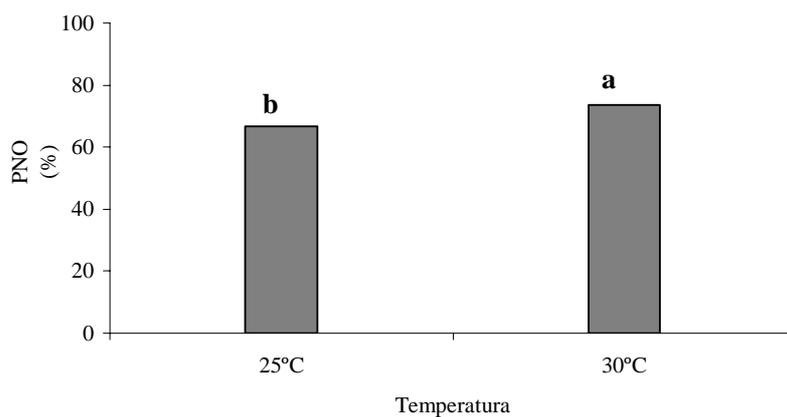
TABELA 1 Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G); plântula normal (%PNO) e anormal (%PNA) de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) cultivadas *in vitro* sob diferentes condições de luz*.

Condição de luz	IVG	%G	%PNO	%PNA
Ausência	5,09 a	98,61 a	74,53 a	4,98 b
Branca	5,08 a	97,91 a	78,10 a	4,67 b
Vermelha	5,08 a	96,52 a	62,81 b	5,98 a
Vermelha extrema	5,19 a	96,52 a	64,65 b	5,82 a
CV (%)	5,86	4,52	16,68	19,52

* Médias seguidas de letras iguais, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.



A



B

FIGURA 1 Índice de velocidade de germinação (IVG) (A), plântula normal (PNO) (B) de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) cultivada *in vitro* sob diferentes condições de luz e temperatura. * Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si.

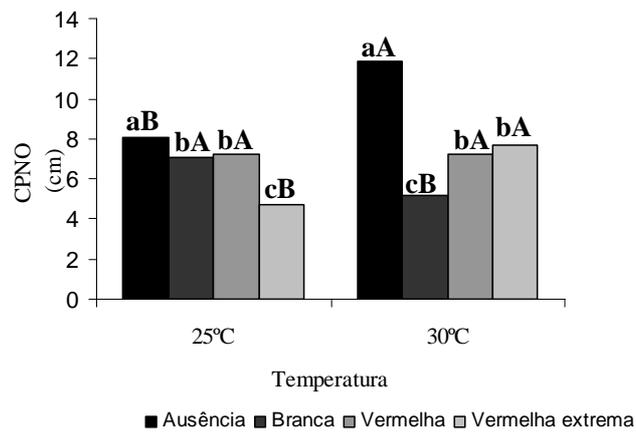


FIGURA 2 Comprimento de plântula normal (CPNO) de pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.) cultivada *in vitro* sob diferentes condições de luz e temperatura. * Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si.

TABELA 2 Epiderme adaxial (EpADA), epiderme abaxial (EpABA), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE) de tecido foliar de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) sob diferentes condições de luz e temperatura*.

Condição de luz	Temperatura (°C)	
	25	30
	EpADA (µm)	
Ausência	17,30 bA	9,91 cB
Branca	17,20 bA	13,51 bB
Vermelha	20,59 aA	16,89 aB
Vermelha extrema	14,64 cA	15,32 aA
	EpABA (µm)	
Ausência	16,74 bA	10,09 bB
Branca	18,90 aA	12,54 aB
Vermelha	19,60 aA	12,30 aB
Vermelha extrema	15,19 bA	12,62 aB
	PP (µm)	
Ausência	34,31 cA	26,09 bB
Branca	52,03 aA	28,42 bB
Vermelha	53,71 aA	36,05 aB
Vermelha extrema	47,12 bA	28,49 bB
	PE (µm)	
Ausência	147,60 aA	92,65 aB
Branca	167,05 aA	111,78 aB
Vermelha	159,30 aA	113,54 aB
Vermelha extrema	159,62 aA	103,42 aB

* Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo teste Scott Knott.

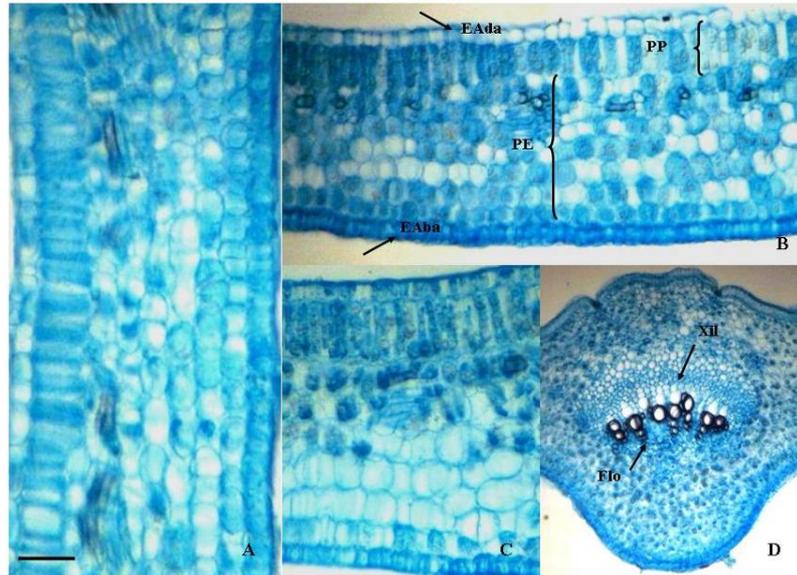


FIGURA 3 Fotomicrografias de seções transversais de folhas de pinhão-mansó desenvolvidas *in vitro* incubadas em câmara de germinação (B.O.D.) em temperatura constante de 30° C/ 16 horas de fotoperíodo, sob quatro condições de luz. Branca (A), Vermelha extrema (B), Ausência de luz (C), Vermelha (D). Barra = 20,0µm.

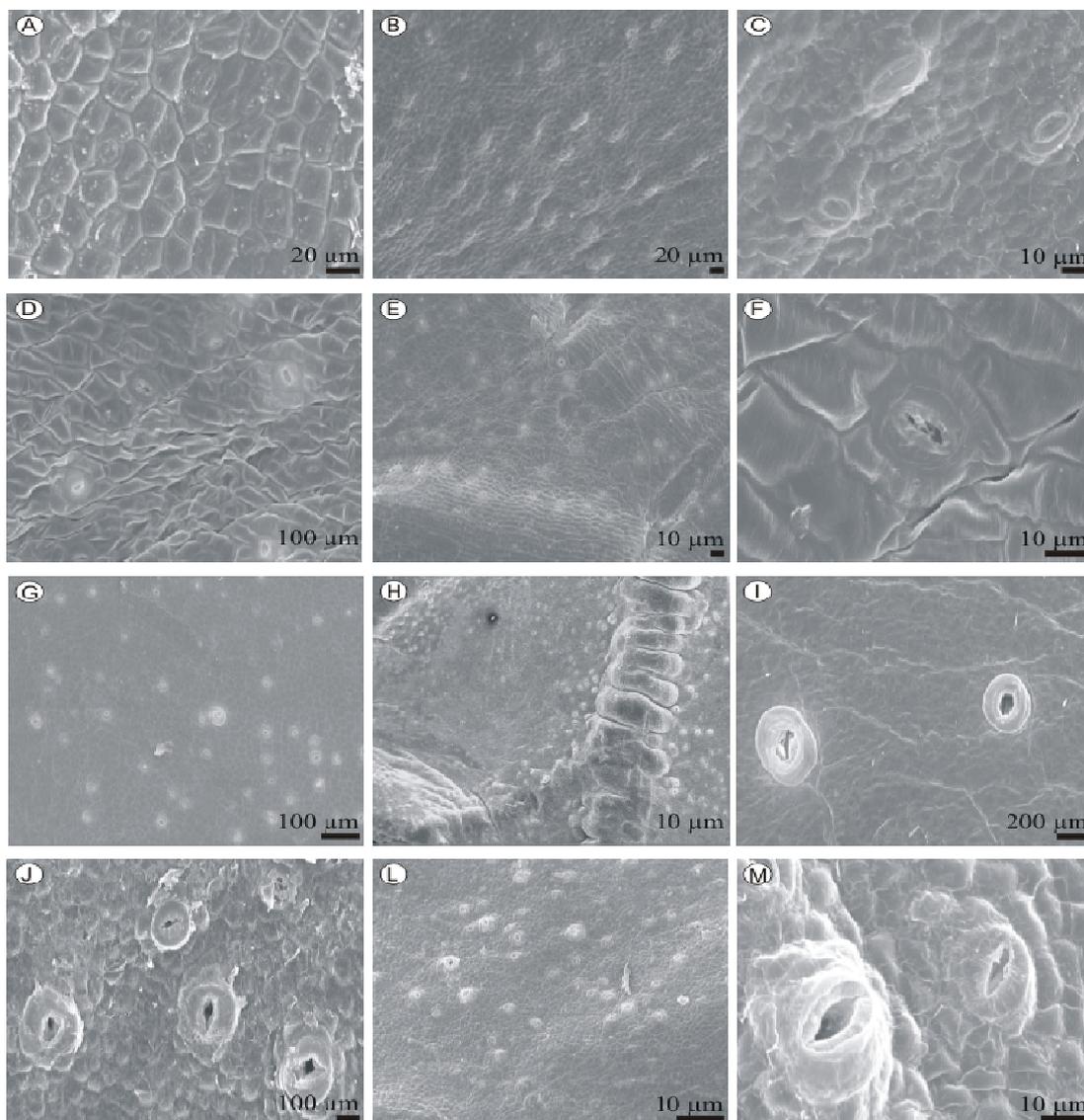


FIGURA 4 Eletromicrografias de folhas de pinhão-mansô desenvolvidas *in vitro* incubadas em câmara de germinação (B.O.D.) em temperatura constante de 25° C/ 16 horas de fotoperíodo, sob quatro condições de luz. Ausência de luz: face adaxial (A) face abaxial (B) e estômato (C); Luz branca: face adaxial (D) face abaxial (E) e estômato (F); Luz vermelha: face adaxial (G) face abaxial (H) e estômato (I); Luz vermelha extrema: face adaxial (J) face abaxial (L) e estômato (M).

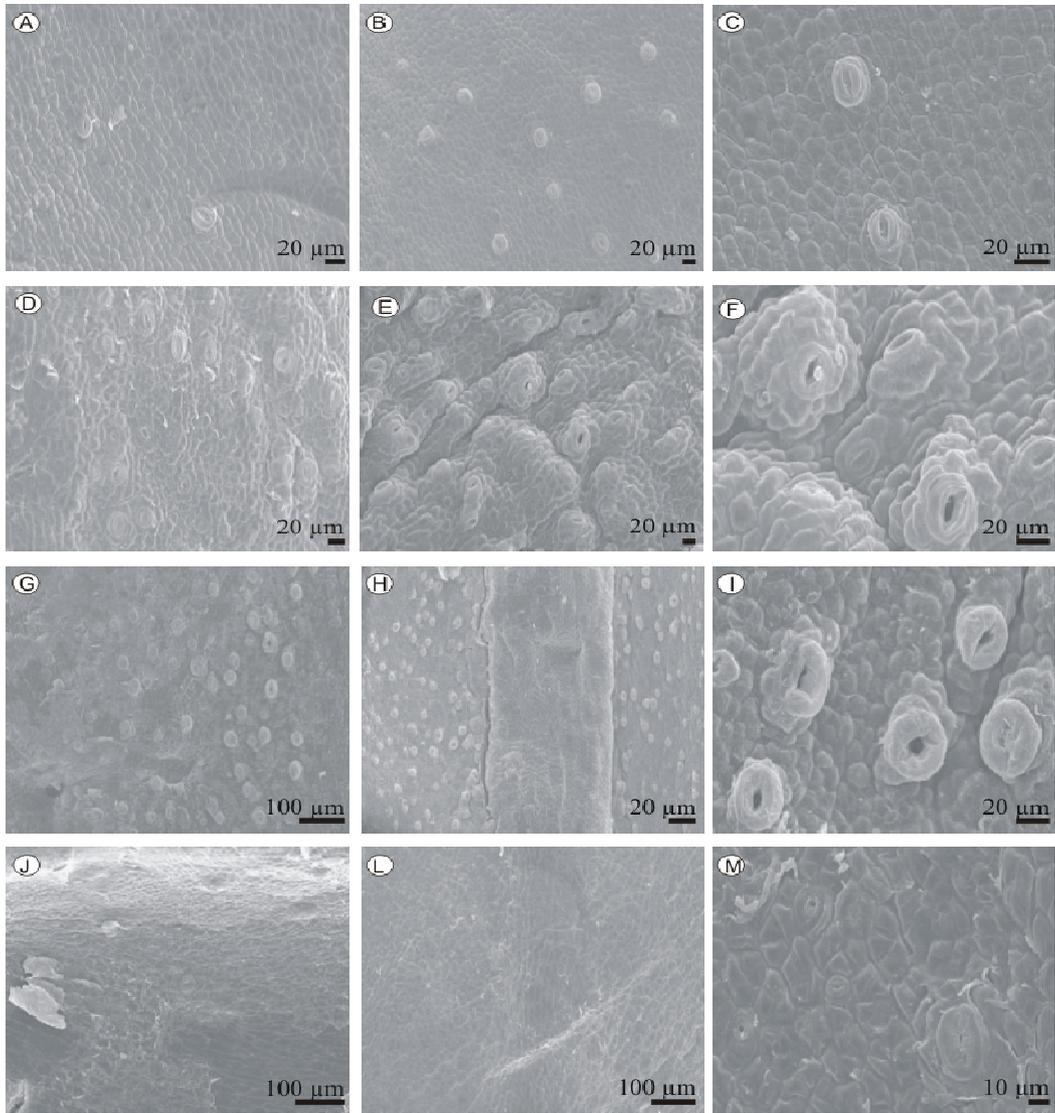


FIGURA 5 Eletromicrografias de folhas de pinhão-mansó desenvolvidas *in vitro* incubadas em câmara de germinação (B.O.D.) em temperatura constante de 30° C/ 16 horas de fotoperíodo, sob quatro condições de luz. Ausência de luz: face adaxial (A) face abaxial (B) e estômato (C); Luz branca: face adaxial (D) face abaxial (E) e estômato (F); Luz vermelha: face adaxial (G) face abaxial (H) e estômato (I); Luz vermelha extrema: face adaxial (J) face abaxial (L) e estômato (M).

CAPÍTULO 3

ORGANOGENESE *IN VITRO* A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)

1 RESUMO

O sucesso de técnicas biotecnológicas para o cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas* depende diretamente do desenvolvimento de protocolos eficientes para regeneração de plantas. Objetivou-se avaliar a indução e a formação de gemas adventícias em pinhão-mansão, por meio do uso de diferentes meios de cultura, fonte de explantes e fitorreguladores. Foram instalados dois experimentos: 1) folhas cotiledonares oriundas de plântulas *in vitro* inoculadas em diferentes meios (MS, WPM, BDS, JADS, OM e MSM), combinados com porcentagens de sais (50 e 100%) e 2) folhas cotiledonares provenientes de plântulas *in vitro* e folhas cotiledonares e folhas maduras de plantas provenientes de casa de vegetação inoculadas em meio MS com 50% de sais, suplementado com diferentes combinações de fitorreguladores. O material foi mantido no escuro por nove semanas. O meio MS com metade da concentração dos sais favorece a formação de calos. A intensidade da coloração do calo e a fonte de explante são parâmetros que devem ser usados na avaliação e na escolha de um tratamento objetivando a organogênese. O fitorregulador BAP proporciona maiores índices de formação de gemas e brotações e a regeneração de gemas utilizando como fonte de explantes folhas cotiledonares de plântulas *in vitro* é desejável para a resposta morfo genética em pinhão-mansão.

2 ABSTRACT

The success of biotechnologies technical for the *in vitro* cultivation of *Jatropha curcas* is directly dependent on the development of efficient protocols for plant regeneration. The present work aimed to evaluate the induction and formation of adventitious buds in physic nut, through the use of different culture medium, explant source and phytohormones. Two experiments were established: 1) cotyledonary leaves originated from *in vitro* seedlings inoculated in different medium (MS, WPM, BDS, JADS, OM and MSM), combined with percentages of salts (50 and 100%) and 2) cotyledonary leaves from seedlings *in vitro* and cotyledonary leaves and mature leaves of plants deriving from greenhouse inoculated on MS medium with 50% of salts, supplemented with different combinations of phytohormones. The material was kept in the dark for nine weeks. The MS medium with half concentration of salt favors the formation of callus. The intensity of callus staining and the explant source are parameters to be used in evaluating and choosing a treatment aiming organogenesis. The BAP phytohormone induces higher levels of buds and shoots formation and, the bud regeneration using as source of explant cotyledonary leaves of seedlings *in vitro*, is desirable for the morphogenetic response in physic nut.

3 INTRODUÇÃO

A organogênese como técnica biotecnológica parece ser uma alternativa eficaz para a rápida propagação de genótipos selecionados de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). Os eventos organogênicos acontecem mediante a desdiferenciação e/ou rediferenciação celular, dependendo da retomada da atividade meristemática em células maduras diferenciadas ou em tecido calogênico desorganizado. O processo de organogênese *in vitro* é complexo, com atuação de múltiplos fatores externos e internos envolvendo interação entre meio de cultura, fonte de explantes e fatores do ambiente (George, 2008; Pierik, 1997; Joy & Thorpe, 1999). O processo de organogênese depende, também, da ação de fitorreguladores, em particular auxinas e citocininas, e da competência do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (Sugiyama, 1999). No entanto, o uso desta técnica exige um eficiente protocolo de regeneração *in vitro*.

Alguns autores como Sujatha & Dhingra (1993), Sujatha & Reddy (2000), Sujatha et al. (2005), Jha et al. (2007), Deore & Johnson (2008) e Marques & Ferrari (2008) têm desenvolvido trabalhos com *J. curcas* e outras espécies do gênero visando tal objetivo. Na realização de estudos focando a regeneração *in vitro* de *J. curcas* foram utilizados materiais juvenis como fonte de explantes, tais como cotilédones, pecíolos, hipocótilo, epicótilo e tecido foliar (Sujatha & Mukta, 1996; Lin et al., 2002; Lu et al., 2003; Wei et al., 2004; Datta et al., 2007).

Entre os fatores que afetam o cultivo *in vitro* e a regeneração de plantas em condições controladas, merecem destaque meios de cultura e fitorreguladores. No decorrer do cultivo *in vitro*, as formulações de sais que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (George, 2008). Desta forma, diversas formulações de

meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há um meio ou formulação padrão, mas o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com suas modificações, tem sido utilizado com sucesso na regeneração de plantas da espécie *Jatropha curcas*, mediante técnicas de organogênese e embriogênese somática (Jha et al., 2007; Deore & Johnson, 2008; Yang et al., 2009).

Reguladores de crescimento se constituem em um importante fator a ser abordado, já que a interação entre auxinas e citocininas é frequentemente dependente da espécie e do tipo de tecido utilizado no cultivo (Coenen & Lomax, 1997; Pierik, 1997). A maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células interagem indica que, se o tecido não está em estágio responsivo, este não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores são utilizados. Entre os trabalhos realizados com pinhão-mansão, nos quais foram utilizadas fontes exógenas de reguladores de crescimento nos eventos organogênicos, o de Deore & Johnson (2008) constou de estudos de regeneração *in vitro* a partir de explantes foliares de pinhão-mansão. Estes autores constataram a existência de diferenças no requerimento com relação aos reguladores de crescimento; sua presença ou ausência regulou eventos como a formação de calos e de gemas adventícias.

Na micropropagação de pinhão-mansão, assim como para diversas espécies, quando se compara diferentes fontes de explantes, obtém-se grande variação de respostas em relação à competência de regeneração. Assim, faz-se necessária a adequação de protocolos de regeneração utilizando explantes coletados de materiais juvenis visando otimizar a capacidade organogênica. A possibilidade e otimização de protocolos eficientes de micropropagação poderá constituir-se em alternativa para garantir o fornecimento contínuo de material para atender aos programas de melhoramento genético.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a indução e a formação de gemas adventícias em pinhão-manso, por meio do uso de diferentes meios de cultura, fonte de explantes e fitorreguladores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Agricultura, na Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

Utilizou-se como material vegetal, sementes colhidas na safra de 2008, provenientes da matriz Oracília, acesso selecionado do banco de germoplasma do município de Janaúba (MG), cedidas pela empresa NNE Minas Agroflorestal. As sementes para manutenção de sua qualidade foram armazenadas por seis meses sob condições de câmara fria (temperatura de 10°C e umidade relativa de 60%), no Setor de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA. Após o processo de assepsia com álcool 70% v/v, hipoclorito de sódio 1% v/v e tríplice lavagem das sementes em água destilada, os embriões zigóticos foram retirados e inoculados em meio MS para posterior utilização das plântulas nos experimentos.

Como fontes de explantes foram utilizadas folhas cotiledonares obtidas de plântulas oriundas de germinação *in vitro* e dez dias de cultivo, folhas cotiledonares e folhas maduras (3ª folha, a partir do ápice), de plantas com trinta dias de cultivo em casa de vegetação. Os explantes foram submetidos a dois experimentos. No experimento 1, segmentos foliares de aproximadamente 1cm² foram retirados da região central das folhas cotiledonares oriundas de plântulas *in vitro* e inoculados individualmente em tubo de ensaio contendo os tratamentos, que consistiram de diferentes meios de cultura: MS (Murashige & Skoog, 1962), WPM (Lloyd & McCown, 1980), BDS (Dunstan & Short, 1977), JADS (Correia et al., 1995), OM (Ruggini, 1984) e MSM (Monteiro et al., 1999)

combinados com porcentagens de sais (50 e 100%), em todas as combinações possíveis. Todos os tratamentos foram suplementados com 3mg.L^{-1} de BAP (6-Benzilaminopurina) 3mg.L^{-1} AIA (Ácido 3-indolacético) e 30 g L^{-1} de sacarose. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6×2 , com quatro repetições de quatro tubos cada uma.

As folhas oriundas de plantas em casa de vegetação com trinta dias de cultivo foram submetidas à assepsia pela imersão em água destilada, com duas gotas de detergente comercial por 1 min, em álcool 70% v/v por 1 min e em hipoclorito de sódio 1% v/v por 20 min, sob agitação constante. Os agentes desinfestantes foram removidos com tríplice lavagem em água destilada estéril, para posterior utilização no experimento.

No experimento 2, segmentos foliares foram retirados da região central das folhas cotiledonares provenientes de plântulas in vitro e folhas cotiledonares e folhas maduras (3ª folha, a partir do ápice) de plantas oriundas de casa de vegetação e inoculados com a face abaxial voltada para o meio de cultivo MS com 50% da porcentagem dos sais, suplementado com diferentes combinações dos fitoreguladores Tidiazuron – TDZ, 6-Benzilaminopurina – BAP, Ácido indolbutírico – AIB e Ácido 3-indolacético - AIA, em mg L^{-1} : (1) 0,5 TDZ + 0,5 BAP + 0,1 AIB (Deore & Johnson, 2008); (2) 1,0 TDZ; (3) 1,0 BAP; (4) 1,0 TDZ + 0,5 AIB; (5) 2,0 TDZ + 1,0 AIB; (6) 1,0 BAP + 0,5 AIB; (7) 2,0 BAP + 1,0 AIB; (8) 1,0 TDZ + 0,5 IAA; (9) 2,0 TDZ + 1,0 IAA; (10) 1,0 BAP + 0,5 IAA e (11) 2,0 BAP + 1,0 IAA, acrescido de 30 g. L^{-1} de sacarose e vitaminas do meio B₅ (Gamborg et al., 1968). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 11×3 , constituído de cinco repetições com cinco tubos cada uma.

Nos dois experimentos, os meios de cultivo foram solidificados com 6 g.L^{-1} de ágar, com pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C por 20 min. As culturas foram mantidas por nove semanas, no escuro, dentro de um

compartimento de metal (armário) instalado em sala de crescimento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. O material foi observado durante todo o período de cultivo para melhor acompanhamento do desenvolvimento de calos e, no final do experimento, foram realizadas as avaliações: porcentagem de calejamento e gemas adventícias, aspecto dos calos (coloração), presença de calos regenerados e número de brotações. Foram aplicadas notas de 0 a 2 como critério na avaliação da porcentagem das variáveis, sendo: (0) ausência, (1) médio, correspondente a 50% e (2) intenso, correspondente a 100%. Do mesmo modo, foram dadas notas referentes à coloração dos calos em relação ao desenvolvimento regenerativo: (0) bege escuro (1) bege e (2) bege claro. O bege escuro refere-se a calos de coloração mais escura, mas que não estão oxidados.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade. As médias de fator qualitativo foram comparadas pelo teste de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade, pelo programa SISVAR[®] (Ferreira, 2000).

Para confirmação de que os calos regenerados apresentavam células meristemáticas com competência organogênica, foi realizada análise citoquímica de uma fração do material regenerado. Foram coletadas frações de 100mg de cultura, em seguida coradas com azul de Evans e carmim acético e as mesmas foram fixadas em lâminas, segundo protocolo de Valente (2007). As fotomicrografias foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da UFLA, utilizando-se máquina fotográfica acoplada a um microscópio Olympus modelo BX 60 em objetiva de 10x.

Para melhor definição das gemas regeneradas, amostras das culturas *in vitro* foram coletadas e desidratadas em série etanólica crescente, utilizando-se ponto crítico, em seguida as amostras foram metalizadas e observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo Zeiss DSM 940,

realizadas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Fitopatologia, segundo protocolo de Alves (2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes meios de cultura e concentrações de sais:

A formação de calos iniciou-se ao longo da segunda semana de cultivo, a partir de pontos que se expandiam e recobriam a superfície do explante.

Considerando a proporção de recobrimento entre os diferentes meios testados, indiferente das concentrações de sais utilizadas, a diferença foi significativa apenas para o meio BDS (Tabela 1), com média inferior aos demais tratamentos em relação à porcentagem de calo. A maneira complexa com que os meios de cultura e suas concentrações salinas interagem com as células indica que, se o tecido cultivado não se encontra em estágio responsivo, este não irá responder adequadamente à condição que lhe foi imposta, o que não foi verificado no trabalho, uma vez que todos os explantes corresponderam satisfatoriamente à variável avaliada. Pelas observações, o pinhão-mansão não apresenta dificuldades quanto à formação de calejamento. Observa-se na Figura (1) que os explantes foliares não têm apresentado dificuldades para gerar calos quando cultivados em meio de cultura com 50% dos sais minerais. Para os autores do presente trabalho, a eficiência na emissão de calos/gemas aumenta com a diminuição da concentração desses sais.

Quanto à porcentagem de gemas adventícias, os meios e suas concentrações de sais (50 e 100%) mostraram diferente capacidade de desenvolver gemas. Melhores respostas foram obtidas com metade dos sais dos meios MS e MSM, correspondendo a 55% e 35% de formação de gemas, respectivamente. Os demais meios de cultura sequer apresentaram competência regenerativa, não sendo os explantes considerados responsivos para formação de gemas. Para a concentração total de sais, as médias foram iguais ou inferiores a

20% de presença de gemas, exceto para os meios JADS e OM que não foram significativos (Tabela 1).

Diferentes fontes de explantes e fitorreguladores:

Houve interação significativa entre os fatores fitorreguladores e fonte de explante para as variáveis: coloração, presença de gema adventícia e número de brotações adventícias (Tabela 2).

A maximização da coloração bege claro foi obtida pelo explante folha cotiledonar de plântula *in vitro* nas combinações dos fitorreguladores: 2, 3, 4, 9, 10 e 11, seguido de folha cotiledonar de plantas de casa de vegetação e com menor expressividade no explante folha madura. A coloração bege foi mais abundante nas combinações: 2, 3, 6, 10 e 11 exibida por calos oriundos de folhas maduras, sendo sua ocorrência semelhante nos demais explantes. Folhas cotiledonares de plantas de casa de vegetação exibiram maior número de calos com coloração bege escuro quando cultivados na presença dos fitorreguladores: 4, 5, 6 e 7 e menor ocorrência foi observada pelas folhas cotiledonares de plântulas *in vitro* (Tabela 2).

O parâmetro coloração de calo tem sido utilizado como indicativo de material vegetal com capacidade regenerativa. Essa variedade de características observadas referentes a diferentes colorações dos calos foi citada por Warrag et al. (1991) e Hervé et al. (2001), como sendo resultado da influência de diferentes concentrações de fitorreguladores. Pelas observações, os calos que apresentavam coloração bege e bege claro foram considerados como responsivos. Estes apresentavam protuberâncias em sua superfície, caracterizando o desenvolvimento de gemas, com conseqüente formação de brotações, diferente dos calos com coloração bege escuro que não apresentaram competência regenerativa.

O experimento indica que o uso do AIB em combinação com TDZ ou BAP produziu resultados insatisfatórios na indução e/ou presença de gemas adventícias, em relação a todos os explantes. Estes tratamentos foram considerados indesejáveis na organogênese de pinhão-manso, diferentemente do que foi observado nos demais tratamentos com presença isolada dos fitorreguladores TDZ e BAP e ambos em combinação com AIA, os quais não apresentaram dificuldades para gerar calos com competência organogênica (Tabela 2). Estes resultados corroboram respostas encontradas por Sujatha et al. (2005), os quais registraram regeneração de calos de explantes foliares, com a utilização dos mesmos fitorreguladores para a mesma espécie utilizada no presente trabalho.

É importante ressaltar que o uso do AIB não foi interessante, talvez a concentração utilizada fosse demasiadamente elevada, não correspondendo às expectativas do trabalho. Porém, ao comparar os resultados do presente trabalho com os obtidos por Deore & Johnson (2008) percebemos que estes obtiveram um pequeno número de brotações com o cultivo de segmentos foliares em meio de cultura contendo AIB em concentrações bem menores do que as testadas no presente trabalho, sendo os fitorreguladores TDZ e BAP também utilizados em concentrações menores por estes autores.

Nota-se pela figura (2) que isoladamente ou em combinação, os fitorreguladores podem induzir a formação de calos no mesmo explante, no entanto, o tipo de calo proveniente de cada tratamento pode diferir quanto à competência organogênica. Sabe-se que certos tecidos são mais favoráveis à regeneração de gemas do que outros, um exemplo são os diferentes explantes de pinhão-manso e suas respostas regenerativas, apresentadas na figura (2). De posse desses resultados infere-se que explantes nos estágios mais juvenis, como por exemplo, as folhas cotiledonares, apresentam maior totipotencialidade que explantes em estágios mais avançados de desenvolvimento, como folhas

maduras. Segundo Kerbauy (1999), as diferenças celulares são estabelecidas e mantidas pelas influências mútuas das células e dos tecidos entre si (ambiente celular interno).

Com a formação de brotos em calos de coloração bege e bege claro a partir da sétima semana, foi possível observar o desenvolvimento de gemas, verificando a formação de protuberâncias densas que culminavam na formação de brotações em pinhão-manso (Figura 2). Assim, a coloração e a relação auxina/citocinina são parâmetros que devem ser usados na escolha de um tratamento em que se objetiva a organogênese.

Observou-se germinação diferencial *in vitro*, o que pode estar associada ao efeito totipotencial específico, peculiar de cada explante, resultando em diferenças na indução de brotações. Maior número de brotos foi observado na superfície organogênica de folhas cotiledonares de plântulas *in vitro*, seguido do explante folha madura e folhas cotiledonares de plantas de casa de vegetação na presença isolada de 1,0 mg.L⁻¹ BAP e/ou associada com 0,5mg.L⁻¹ AIA, respectivamente (Tabela 2). Explantes cultivados nos tratamentos com presença de AIB não corresponderam às expectativas do estudo, pois apresentaram baixa frequência ou ausência de competência regenerativa. Os resultados deste trabalho assemelham-se aos obtidos por Rajore & Batra (2005), que detectaram maior número de brotos em segmento apical de *J. curcas* mediante a incorporação de BAP e AIA no meio de cultura e discordam dos obtidos por Shrivastava & Banerjee (2008), que verificaram maior número de brotos em explantes axilares de *J. curcas* com a adição de 3,0mg.L⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de AIB no meio MS.

Os explantes apresentaram, na região do calo formado por gemas em estágio inicial de desenvolvimento, diferentes respostas para os três tipos de explante. Contudo, essas gemas não se desenvolveram quando subcultivadas em

meio de regeneração ou alongamento, provavelmente devido ao balanço hormonal endógeno nos tecidos da planta.

As culturas inoculadas nos tratamentos contendo as citocininas BAP e TDZ, isoladas ou na presença da auxina AIA, apresentaram reação positiva ao corante carmim acético, sendo a reação com BAP mais expressiva. A coloração vermelha, característica do carmim acético, possui afinidade com células meristemáticas, ou seja, células que apresentam competência de regeneração seja embriogênica ou organogênica. No presente estudo foi possível observar protuberâncias originando partes aéreas ou radiculares na superfície calosa dos três explantes estudados, os quais foram corados para a confirmação da presença de células meristemáticas (Figura 3). Também foram observadas células desprovidas de competência regenerativa nos tratamentos contendo AIB, característica de culturas que apresentaram reação positiva ao azul de Evans, com células coradas de azul.

Pelas observações em MEV foi possível a visualização nítida de mudança de formato celular (Figuras 4, 5 e 6), supondo que a presença de BAP isolada ou associada ao AIA nas concentrações de $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP e $1,0\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,5\text{mg.L}^{-1}$ AIA seja fator crucial para a sinalização de desdiferenciação celular e consequente retomada de características meristemáticas, favorecendo a organogênese dos três explantes testados.

Por estas análises, verifica-se que houve alterações celulares a partir do cultivo com BAP e AIA, de maneira que as células tiveram condições fisiológicas suficientes para desenvolver a capacidade organogênica.

As células apresentam formato alongado com formação de protuberâncias sobre a superfície calosa que caracterizam células meristemáticas caulinares e radiculares. A fase inicial de proliferação e crescimento de calo foi seguida por indução de brotos ou raízes e consequente desenvolvimento desses tecidos. Os calos oriundos de folhas cotiledonares de plântulas *in vitro* seguidas

de folhas cotiledonares de plantas de casa de vegetação apresentaram maior competência regenerativa em comparação ao tecido oriundo de folhas maduras de plantas de casa de vegetação. Quando o objetivo é a multiplicação de plantas via organogênese, somente é interessante a formação de meristemas caulinares, os quais originarão plantas completas. A formação de primórdios foliares e/ou radiculares encontrados nas figuras (4E e H); (5E) e (6E e F) são erroneamente interpretados como brotos e estes comprometem o êxito da cultura *in vitro*.

As citocininas induzem a divisão celular de calos na presença de auxina, levando à formação de gemas ou raízes adventícias diretamente no explante ou a partir de calos, entre outros (Taiz & Zeiger, 2004). O tipo de citocinina e concentração são fatores essenciais para o desempenho de multiplicação *in vitro*. Para os autores do presente trabalho, BAP é a mais indicada para o sucesso da micropropagação de pinhão-manso, via organogênese.

Como indicadores para uma segunda fase de experimentos, sugere-se novamente o uso de folhas cotiledonares como explantes por terem sido seguramente os tecidos que mais produziram gemas.

6 CONCLUSÕES

O meio MS com metade da concentração dos sais favorece a formação de calos.

A intensidade da coloração do calo e a fonte de explante são parâmetros que devem ser usados na avaliação e na escolha de um tratamento objetivando a organogênese em pinhão-manso.

O fitorregulador BAP proporciona maiores índices de formação de gemas e brotações.

A regeneração de gemas utilizando como fonte de explantes folhas cotiledonares de plântulas *in vitro* é desejável para a resposta morfo genética.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.
- COENEN, C.; LOMAX, T. L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 9, p. 351-356, 1997.
- CORREIA, D.; GONÇALVES A. N.; COUTO, H. T. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus. urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, Piracicaba, v. 48/49, p. 107-116, 1995.
- DATTA, M. M.; MUKHERJEE, P.; GHOSH, B.; JHA, T. B. *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). **Current Science**, Bangalore, v. 93, n. 10, p. 1438-1442, 2007.
- DEORE, A. J.; JOHNSON, T. S. High frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel crop. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 2, n. 1, p. 7-11, 2008.
- DUNSTAN, D. I.; SHORT, K. C. Improved growth of tissue cultures of the onion. *Allium cepa*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 41, n. 1, p. 70-72, 1977.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA, 2000.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Great Britain: Exegetics, 2008. 479 p.
- HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 4, p. 645-653, 2001.

JHA, T. B.; MUKHERJEE, P.; DATTA, M. M. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 1, n.3, p. 135-140, 2007.

JOY IV, R.W.; THORPE, T. A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: SOH, W. Y.; BHOJWANI, S. S. (Ed.). **Morphogenesis in plant tissue cultures**. London: Kluwer Academic, 1999. p. 171-214.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 519-531.

LIN, J.; TANG, L.; CHEN, F. Tissue culture and plantlet regeneration of *Jatropha curcas*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 38, p. 252, 2002.

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

LU, W. D.; WEI, Q.; TANG, L.; YAN, F.; CHEN, F. Induction of callus from *Jatropha curcas* and rapid propagation. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, Chengdu, v. 9, p. 127-130, 2003.

MARQUES, D. A.; FERRARI, R. A. O papel das novas biotecnologias no melhoramento genético do pinhão-manso. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 65-67, 2008.

MONTEIRO, A. C. B. de A.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on leaf discs of *Passiflora* spp cultivated *in vitro*. In: CONGRESS ON IN VITRO BIOLOGY, 1999, New Orleans. **Anais...** New Orleans: Society For In Vitro Biology, 1999. p. 13.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473- 479, 1962.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. 4. ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. 348 p.

RAJORE, S.; BATRA, A. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology**, New York, v. 14, p. 73-75, 2005.

RUGINI, E. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 123-134, 1984.

SHRIVASTAVA, S.; BANERJEE, M. *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.). **International Journal of Integrative Biology**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 73-79, 2008.

SUGIYAMA, M. Organogenesis in vitro. **Current Opinion in Plant Biology**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 61-64, 1999.

SUJATHA M.; DHINGRA M. Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 35, n. 3, p. 293-296, 1993.

SUJATHA, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 47, n. 1, p. 83-90, 2005.

SUJATHA, M.; MUKTA, N. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 135-141, 1996.

SUJATHA, M.; REDDY, T. P. Role of cytokinins and explant interaction on adventitious shoot regeneration in *Jatropha integerrima*. **Jacq. Biologia**, Bratislava, v. 55, n. 8, p. 99-104, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 690 p.

VALENTE, C. **Caracterização de fungos mitocondriais em *Araucaria angustifolia***. 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

WARRAG, E.; LESNEY, M. S.; ROCKWOOD, D. J. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, n. 10, p. 586-589, 1991.

WEI, Q.; LU, W.; LIAO, Y.; PAN, S.; TANG, L.; CHEN, F. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, Beijing, v. 30, n. 4, p. 475-478, 2004.

YANG, H.; XIULIAN, G.; RAN, L.; BEI, N.; VIJAYA, P.; PEI, H.; FENG, C.; YING, X.; FANG, C. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 1, p. 11-17, 2009.

ANEXOS

TABELA 1 Porcentagem de calo (PC) e de gemas adventícias (GA) em folhas cotiledonares de plântulas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) cultivadas *in vitro* sob diferentes meios de cultura e concentrações de sais.*

	PC (%)		GA (%)	
	Concentração de sais			
Meios de cultura	50%	100%	50%	100%
MS	100 aA	95 aA	55 aA	15 aB
WPM	100 aA	100 aA	00 bA	10 aA
BDS	85 bB	100 aA	00 bA	20 aA
JADS	100 aA	90 aA	00 bA	00 aA
OM	100 aA	100 aA	00 bA	00 aA
MSM	100 aA	100 aA	35 aA	20 aA

* Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.



FIGURA 1 Calos obtidos de segmentos foliares de plântulas de pinhão-manso cultivadas em meio MS contendo metade da concentração de seus sais, suplementado com BAP e AIA (3mg.L^{-1}). Calo aos 40 dias de cultivo (A); calo cobrindo toda superfície da folha cotiledonar (B) e calo regenerando gemas adventícias ao final das nove semanas (C)-seta.

TABELA 2 Coloração de calos (coloração), presença de calos que regeneraram gemas adventícias (PGA) e números de brotações adventícias (NBA) originadas de folhas cotiledonares (C) e folhas completas (FC) oriundas de plantas em casa de vegetação (CV) e folhas cotiledonares (C) de plântulas *in vitro* (IV) de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) cultivadas em meio MS com diferentes concentrações de fitorreguladores.*

Combinações de fitorreguladores	Tipos de explantes								
	C. (CV)	FC (CV)	C. (IV)	C. (CV)	FC (CV)	C. (IV)	C. (CV)	FC (CV)	C. (IV)
	Coloração			PGA			NBA		
1 -TDZ 0,5 + BAP 0,5 + AIB 0,1	2,00 aA	2,00 aA	1,00 bA	1,00 aA	0,00 bB	1,00 aA	0,64 cB	0,32 cB	2,92 bA
2 - TDZ 1,0	2,00 aA	1,00 aA	2,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	0,96 cB	4,12 aA	1,40 cB
3 - BAP 1,0	2,00 aA	1,00 aA	2,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	4,80 aA	2,64 bB	4,80 aA
4 - TDZ 1,0 + AIB 0,5	0,00 cB	0,00 cB	2,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 dA
5 - TDZ 2,0 + AIB 1,0	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 dA
6 - BAP 1,0 + AIB 0,5	0,00 cB	1,00 bA	1,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 dA
7 - BAP 2,0 + AIB 1,0	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 cA	0,00 dA
8 - TDZ 1,0 + AIA 0,5	1,00 bA	2,00 aA	1,00 bA	1,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	0,84 cB	1,60 bB	3,40 bA
9 - TDZ 2,0 + AIA 1,0	1,00 bB	2,00 aA	2,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	1,00 dC	2,00 bB	3,60 bA
10 - BAP 1,0 + AIA 0,5	2,00 aA	1,00 aB	2,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	3,60 bB	3,40 aB	4,56 aA
11 - BAP 2,0 + AIA 1,0	1,00 bB	1,00 aB	2,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	1,00 aA	0,84 cC	2,00 bB	4,16 aA

* Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

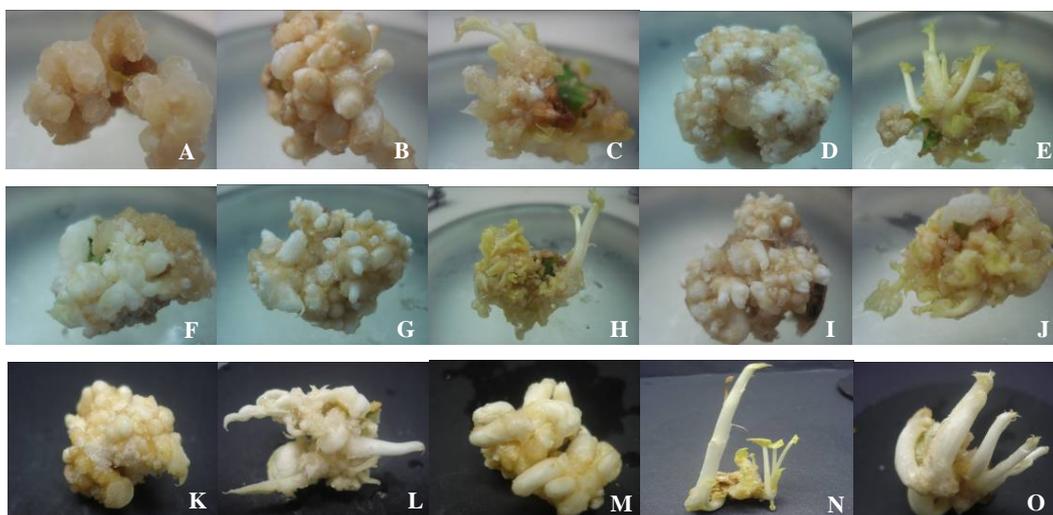


FIGURA 2 Organogênese de explantes de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) oriundos de folhas cotiledonares (A-E) e folhas maduras (F-J) de plantas em casa de vegetação e folhas cotiledonares de plântulas *in vitro* (K-O), apresentando colorações do tipo (2) bege claro e do tipo (1) bege, nas condições de regeneração de gemas na presença de diferentes fitorreguladores.

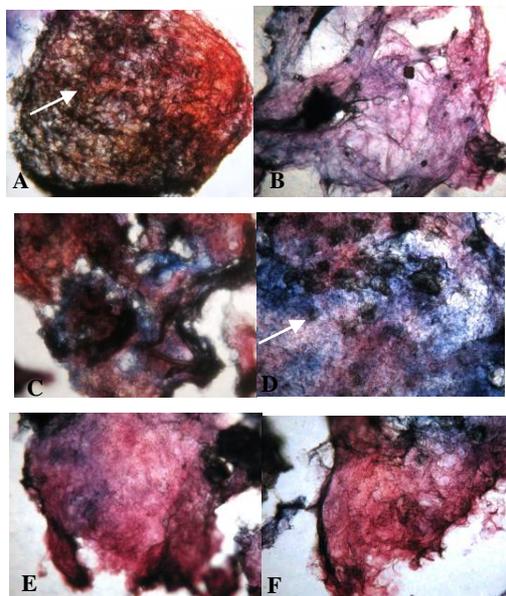


FIGURA 3 Fotomicrografias de frações de cultura de calos com células meristemáticas coradas de vermelho (seta) e não meristemáticas coradas de azul (seta). (A-B) explante de folhas cotiledonares e (C-D) explante de folha madura de plantas em casa de vegetação, (E-F) folhas cotiledonares de plântula *in vitro* oriundos dos tratamentos $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP e $1,0\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ AIA, respectivamente.

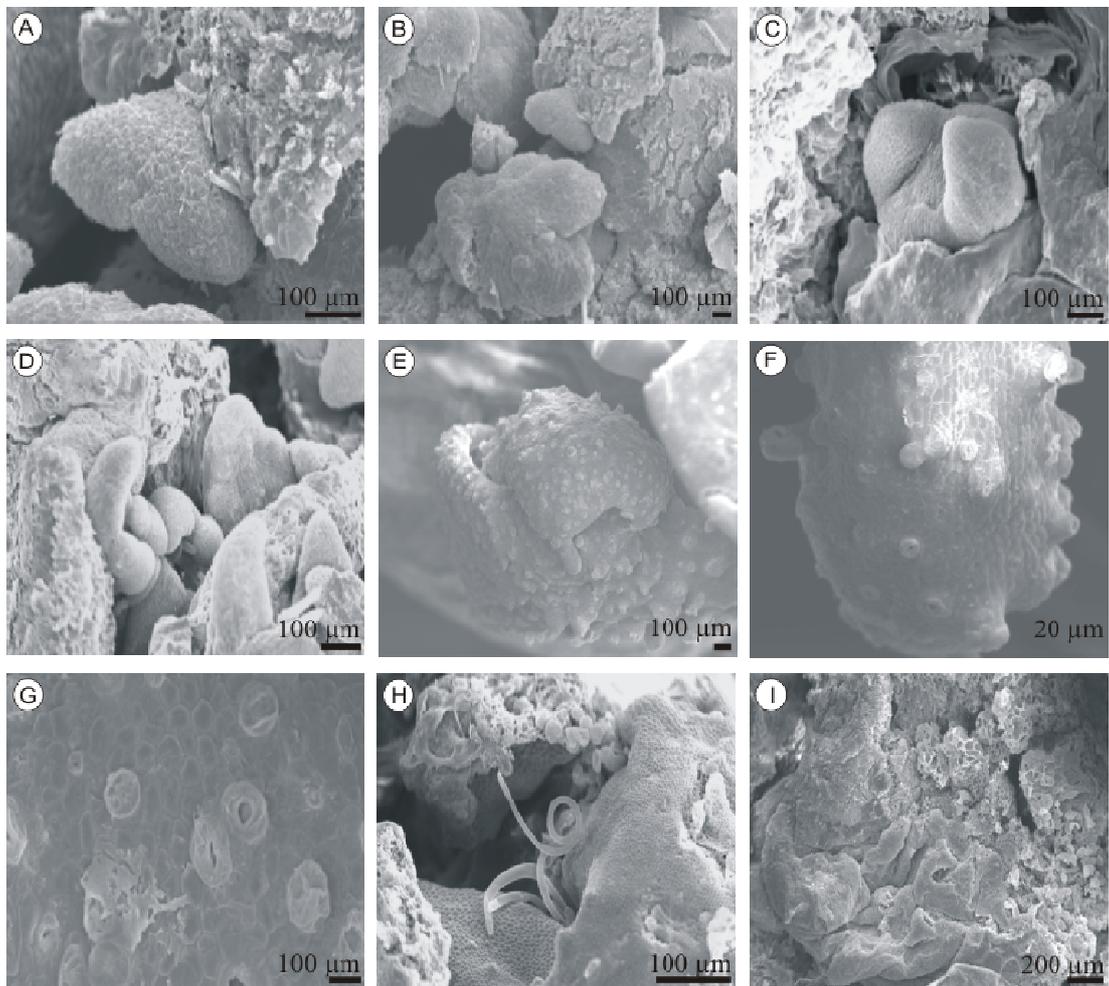


FIGURA 4 Eletromicrografias de calos oriundos de folhas cotiledonares de plantas de pinhão-mansó (*Jatropha curcas*) cultivadas em casa de vegetação. Calos desenvolvidos *in vitro* em meio MS com metade dos sais e diferentes concentrações de fitorreguladores e incubados sob ausência de luz e diferentes concentrações de fitorreguladores: (A-B) desenvolvimento de gema adventícia, (C) meristema, (D-F) gema foliar, (G) presença de estômatos na superfície da gema foliar, (H) presença de raízes e (I) superfície calosa.

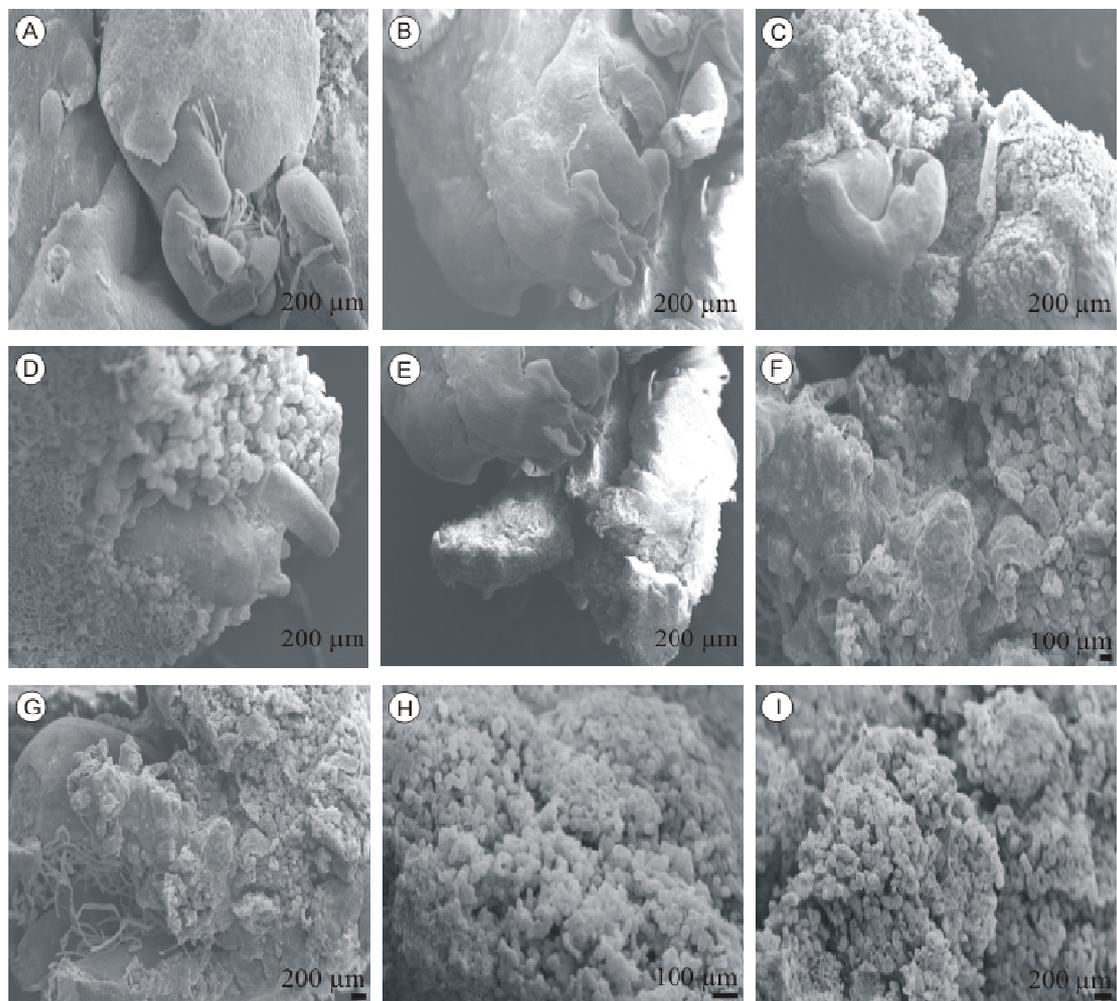


FIGURA 5 Eletromicrografias de calos oriundos de folhas maduras de plantas de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) cultivadas em casa de vegetação. Calos desenvolvidos *in vitro* em meio MS com metade dos sais e diferentes concentrações de fitorreguladores e incubados sob ausência de luz e diferentes concentrações de fitorreguladores: (A-F) desenvolvimento de gema adventícia, (G) presença de raízes, (H-I) superfície calosa.

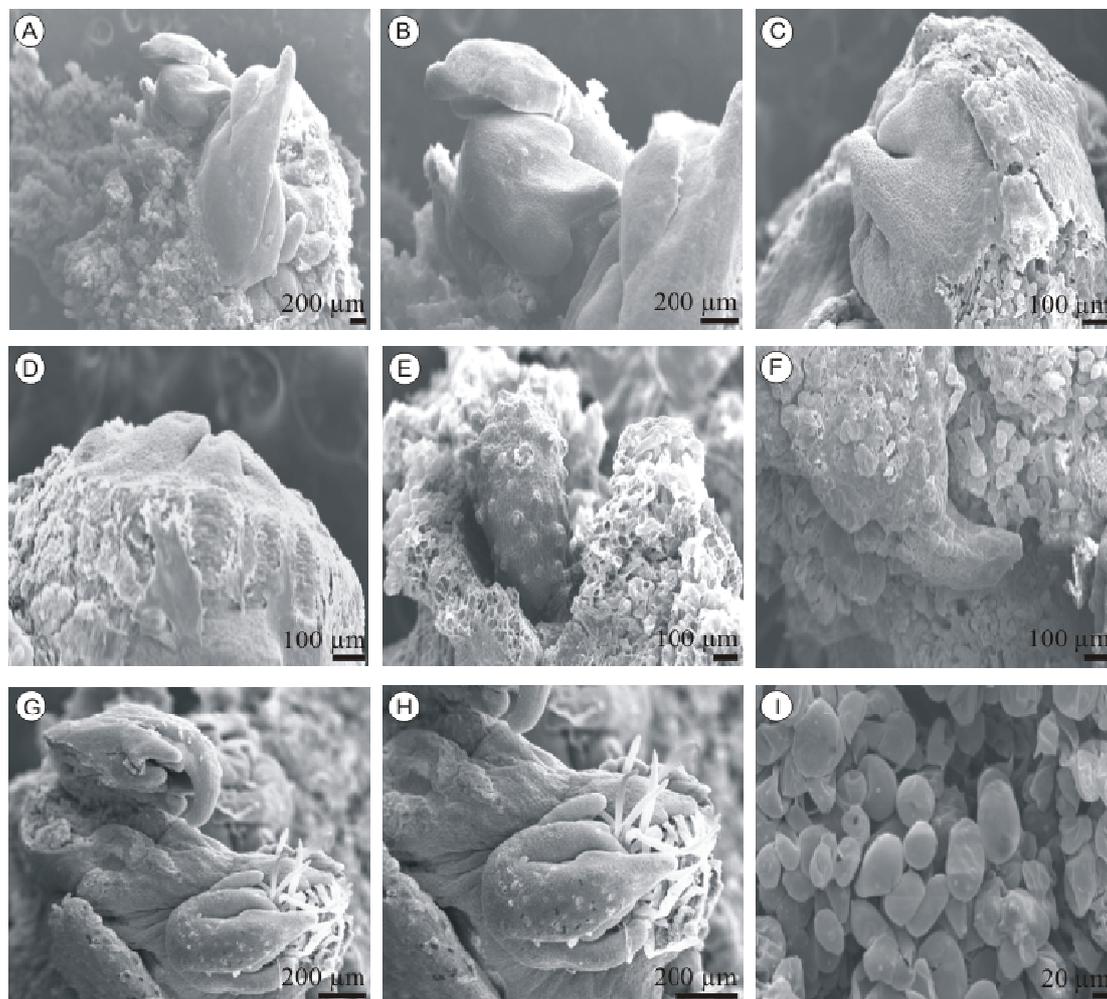


FIGURA 6 Eletromicrografias de calos oriundos de folhas cotiledonares de plântulas de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) cultivadas *in vitro*. Calos desenvolvidos *in vitro* em meio MS com metade dos sais e diferentes concentrações de fitorreguladores e incubados sob ausência de luz e diferentes concentrações de fitorreguladores: (A, B e D) desenvolvimento de gema adventícia, (C) meristema, (E e H) gema foliar, (F) presença de estômatos na superfície da gema foliar, (G) presença de raízes e (I) superfície calosa.

CAPÍTULO 4

ÁGUA DE COCO E TIPO DE VEDAÇÃO NA MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)

1 RESUMO

Devido à importância do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) para múltiplos propósitos e à dificuldade de otimização de protocolos de regeneração *in vitro* para obtenção de mudas micropropagadas, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de concentrações de água de coco e tipo de vedação dos frascos na indução da organogênese e nas características morfológicas de pinhão-mansão. Folhas cotiledonares oriundas de plântulas *in vitro* foram inoculadas em meio MS com metade dos sais, suplementado com vitaminas do meio B₅, 30g.L⁻¹ de sacarose, 3mg.L⁻¹ de BAP (6-Benzilaminopurina) e 3mg.L⁻¹ AIA (Ácido 3-indolacético). Os tratamentos consistiram de concentrações de água de coco (0, 50, 100, 150 e 200mL.L⁻¹) e tipos de vedação dos frascos (filme plástico transparente, tampa de polipropileno com filtro de membrana permeável a gases e tampa de polipropileno sem filtro). O material foi mantido sob ausência de luz por nove semanas. A ausência de água de coco no meio de cultivo favorece a multiplicação das brotações em explantes de pinhão-mansão. O uso do filme plástico, seguido da tampa de polipropileno com filtro tem efeito positivo na indução da organogênese em explantes de pinhão-mansão. As características de formação de gemas sobre a superfície dos explantes de pinhão-mansão podem ser utilizadas como descritores da organogênese, e as estruturas formadas, em meio nutritivo com menores concentrações de água de coco e uso de vedações que permita o mínimo de troca gasosa com o meio externo, são satisfatórias.

2 ABSTRACT

Due to the importance of physic nut (*Jatropha curcas* L.) for multiple purposes and the difficulty of optimizing protocols for *in vitro* regeneration to the obtainment of micropropagated plants, this study aimed to evaluate the influence of concentrations of coconut water and type of flasks sealing in the induction of organogenesis and morphological characteristics of physic nut. Cotyledonary leaves originated from *in vitro* seedlings were inoculated on MS medium with half of the salts, supplemented with vitamins from B₅ medium, 30g.L⁻¹ of sucrose, 3mg.L⁻¹ BAP (6-Benzilaminopurina) and 3mg.L⁻¹ AIA (3-indolacetic acid). The treatments consisted of coconut water concentrations (0, 50, 100, 150 and 200mL.L⁻¹) and types of flasks sealing (transparent plastic film, polypropylene cap with permeable membrane filter to gases and polypropylene cap without filter). The material was kept in the dark for nine weeks. The absence of coconut water in the culture medium favors the multiplication of shoots in explants of physic nut. The use of plastic film, followed by the polypropylene cap with filter has a positive effect on the induction of organogenesis in explants of physic nut. The characteristics of buds formation on the surface of explants of physic nut can be used as descriptors of organogenesis, and the structures formed, on nutrient medium with lower concentrations of coconut water and the use of sealing that allow the minimum of gas exchange with the external environment, are satisfactory.

3 INTRODUÇÃO

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) pertence à família Euphorbiaceae, é uma espécie que se desenvolve bem em climas tropicais e subtropicais, e vem sendo pesquisada como alternativa na área de biocombustíveis. No entanto, uma das dificuldades encontradas pelos pesquisadores é a obtenção de tecnologias para produção de grande número de plantas micropropagadas com alta qualidade fitossanitária para oferecer aos produtores. Tal processo é limitado pela baixa disponibilidade de protocolos eficientes, capazes de induzir altas taxas de multiplicação via organogênese ou embriogênese somática.

Em comparação às técnicas de propagação tradicional, a micropropagação apresenta significativas vantagens, entre as quais, a possibilidade de propagar rapidamente em larga escala novos genótipos, obter plantas livres de doenças e propagar vegetativamente espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos. Entretanto, para que a aplicação da micropropagação de pinhão-mansão se torne viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação, são necessários a otimização da técnica, pela redução dos seus custos de produção, e o estabelecimento de protocolos eficientes.

A maioria dos fatores relacionados ao sucesso do cultivo *in vitro* das espécies está direta ou indiretamente ligada ao sistema de produção *in vitro* e ao ambiente de cultivo. Elementos aditivos complexos como, por exemplo, coco (endosperma, água, leite), são utilizados nos meios de cultura com o propósito de favorecer o crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Taiz & Zeiger (2004) relatam que a água de coco é o líquido do endosperma de sementes de coco que contém citocininas e outros fatores nutricionais. A Zeatina, uma citocinina de ocorrência natural que estimula a divisão de células vegetais maduras, foi identificada na água de coco. Algumas culturas possuem necessidade desse hormônio vegetal para melhor desenvolvimento e produtividade no meio de

cultura e, para outras, esse componente é fator de sucesso ou insucesso no cultivo *in vitro*.

Em estudo com germinação *in vitro* de pinhão-manso, a água de coco proporcionou bons resultados (Nunes et al., 2008). Outros estudos com diferentes espécies como algodão (*Gossypium hirsutum*) e híbrido de orquídea (*Cattleya loddgesii* 'Grande' x *Cattleya loddgesii* 'Alba') apontam que a utilização da água de coco em suplementação ao meio de cultura é requerida para suprir as exigências nutricionais, fisiológicas e conseqüentemente, a regeneração do material cultivado (Carvalho et al., 2003; Araujo et al., 2006).

Outro fator relevante é o sistema de vedação dos frascos na micropropagação, que surge como possibilidade potencial para aumentar a eficiência do processo *in vitro*, viabilizando-o comercialmente. Os cultivos *in vitro* são mantidos em frascos vedados e, em geral, apresentam elevada umidade relativa, temperatura constante, grande flutuação na concentração de CO₂ e alta concentração de sais no meio de cultura (Arigita et al., 2002). Essas condições proporcionam baixa taxa de transpiração e fotossíntese, dificuldade de absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, baixa taxa de crescimento de muitas espécies de plantas cultivadas *in vitro*.

De acordo com o tipo de vedação, verifica-se também baixa troca de ar entre o ambiente externo e interno (Chen, 2004), induzindo ao acúmulo de compostos gasosos nos frascos, afetando o crescimento e a morfogênese dos explantes cultivados (Marino & Berardi, 2004).

É possível reduzir a umidade relativa utilizando-se filtros permeáveis a gases, como o polipropileno ou poliuretano (Zobayed, 2000). Esses sistemas consistem na utilização de tampas com membranas facilitadoras de trocas gasosas, impedindo o acúmulo de gases, entre estes o etileno. Dessa maneira, aumentam-se as trocas gasosas e a atmosfera interna dos frascos de cultura fica menos contrastante daquela encontrada no ambiente externo (Gonçalves, 2004).

Estudos com jojoba (*Simmondsia chinensis*), berinjela (*Solanum melongema*), mirtilo (*Vaccinium* spp.) e araticum (*Annona glabra*) têm revelado que o controle do ambiente pode vir a se tornar uma técnica essencial para obter cultivos micropropagados de boa qualidade (Mills et al., 2004, Ribeiro, 2006, Damiani & Schuch, 2008; Moreira, 2008).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de concentrações de água de coco e tipo de vedação dos frascos na indução da organogênese e nas características morfológicas em pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Agricultura, na Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

Utilizou-se como material vegetal, sementes colhidas na safra de 2008, provenientes da matriz Oracília, acesso selecionado do banco de germoplasma do município de Janaúba (MG), cedidas pela empresa NNE Minas Agroflorestal. As sementes para manutenção de sua qualidade foram armazenadas por seis meses sob condições de câmara fria (temperatura de 10°C e umidade relativa de 60%), no Setor de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

Antes da inoculação nos diferentes tratamentos, as sementes foram submetidas ao processo de assepsia com duas gotas de detergente comercial por 1 min, em álcool 70% v/v por 1 min e em hipoclorito de sódio 1% v/v por 20 min, sob agitação constante e os agentes desinfestantes foram removidos com tríplice lavagem em água destilada estéril. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os embriões zigóticos foram retirados e inoculados em meio MS

(Murashige & Skoog, 1962), adicionado de vitaminas do meio B₅ (Gamborg et al., 1968), 30g.L⁻¹ de sacarose, para posterior utilização das plântulas originadas.

Folhas cotiledonares provenientes de plântulas *in vitro* (etapa anterior) com 10 dias de cultivo, foram utilizadas na indução da organogênese. Os segmentos de folhas cotiledonares foram retirados da região central das folhas com cerca de 1cm² e inoculados em frascos de vidro com capacidade de 300 mL contendo 40 mL/frasco de meio de cultura. Os segmentos foliares foram colocados com a face abaxial voltada para o meio de cultivo MS com metade dos sais, acrescido de vitaminas do meio B₅, 30g.L⁻¹ de sacarose, 3mg.L⁻¹ de BAP (6-Benzilaminopurina) e 3mg.L⁻¹ AIA (Ácido 3-indolacético). Os tratamentos consistiram da suplementação do meio de cultivo com concentrações de água de coco (0, 50, 100, 150 e 200mL.L⁻¹) proveniente do fruto e tipos de vedações dos frascos (filme plástico transparente, tampa de polipropileno com filtro de membrana permeável a gases e tampa de polipropileno sem filtro). Os meios foram solidificados com 6g.L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C por 20 min. As culturas foram mantidas por nove semanas, no escuro, dentro de um compartimento de metal (armário) instalado em sala de crescimento a 25±2°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 5x3, constituído de oito repetições com quatro explantes cada uma.

As avaliações da capacidade organogênica do material foram realizadas com base na porcentagem de brotações, número de brotos, comprimento médio das brotações, porcentagem de folhas e de primórdios radiculares. Foram aplicadas notas de 0 a 2 como critério na avaliação da porcentagem das variáveis, sendo: (0) ausência, (1) médio, correspondente a 50% e (2) intenso, correspondente a 100%.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR[®] (Ferreira, 2000).

Para melhor definição das gemas regeneradas, amostras das culturas *in vitro* foram coletadas e desidratadas em série etanólica crescente, utilizando-se ponto crítico, em seguida as amostras foram metalizadas e observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo Zeiss DSM 940, realizadas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Fitopatologia, segundo protocolo de Alves (2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando-se a indução de organogênese, observou-se que o tipo de vedação e concentração de água de coco influenciam significativamente nos resultados das variáveis analisadas, com interação significativa para todas as variáveis analisadas (Tabela 1).

Em relação à porcentagem de brotos, apenas as concentrações de 0 e 50mL.L⁻¹ de água de coco combinadas com todos os tipos de vedações dos frascos tiveram significância. Maior porcentagem de brotos (96,34%) foi observada quando não adicionou-se água de coco ao meio, sendo os frascos vedados com filme plástico. A concentração de 50mL.L⁻¹ de água de coco associada com os diferentes tipos de vedações não apresentou diferença significativa. Nas combinações de tipos de vedações com concentrações de 100 a 200mL.L⁻¹ de água de coco não houve formação de brotações, exceto para a concentração de 100mL.L⁻¹ de água de coco com a vedação sem filtro, apresentando 25,08% de brotações (Tabela 1 e Figura 1). Concentrações crescentes de água de coco promoveram redução e/ou ausência na porcentagem de brotos (Figura 1); provavelmente, sua presença pode ter desequilibrado os nutrientes do meio de cultivo, prejudicando a emissão de brotos.

Comportamento semelhante também foi observado para número de brotos (Tabela 1). Novamente, a ausência de água de coco, em combinação com as três vedações, apresentou melhores resultados. Maior número de brotos foi

verificado sem a adição de água de coco para as vedações de filme plástico com 2,07/explante e vedação com filtro (1,84/explante), não apresentando diferenças significativas entre si. O uso do filme plástico é interessante no que diz respeito à redução de custo, uma vez que a tampa com filtro torna-se mais onerosa. Embora deva-se considerar que o número de brotos encontrado nos resultados pareça pequeno, os trabalhos de organogênese com a espécie *J. curcas* se encontram em fase de estabelecimento de protocolos e, num primeiro momento, os autores Rajore & Batra (2005) e Deore & Johnson (2008), trabalhando com ápices caulinares e segmento foliar de pinhão-manso, respectivamente, verificaram números de 1 a 3 brotos por explante, corroborando resultados observados no presente estudo.

Para número de brotos, analisando a concentração de 50mL.L⁻¹ de água de coco em interação com os tipos de vedação, não foi verificada diferença significativa e, de forma comparativa entre a maior média de brotos (2,07) na ausência de água de coco e com 50mL.L⁻¹ (0,62) desta substância no meio de cultura, a diferença de 1,45 brotos por explante é representativa, não justificando a utilização de um meio com água de coco para a indução da organogênese em explantes de pinhão-manso. Observa-se que concentração crescente de água de coco influenciou de forma negativa na variável número de brotos (Tabela 1).

Sabe-se que a tampa de polipropileno sem filtro é o tipo de vedação que não permite troca gasosa com o meio externo. Esse impedimento teve efeito negativo na formação e número de brotos no presente trabalho. Estes resultados diferem de Moreira (2008) que obteve melhoria no número de brotos quando os explantes de *Annona glabra* L. foram colocados em condições de maior troca gasosa com tampas plásticas com um par de filtros de membranas permeáveis a gases, em ambiente de luz natural.

Para comprimento de brotos, diferenças significativas foram observadas entre tipos de vedação com adição de 50mL.L⁻¹ de água de coco. Na ausência de

água de coco não houve diferença significativa para tipos de vedação dos frascos. O mesmo foi observado nas demais concentrações de água de coco. Verificou-se melhores respostas de alongamento de brotos na ausência de água de coco e utilização da tampa com filtro (1,82cm), seguido do filme plástico (1,59cm) e da tampa sem filtro (1,29cm) (Tabela 1 e Figura 1).

Em contraste, Nunes et al. (2008), estudando o efeito de concentrações de água de coco no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Jatropha curcas*, observaram maior crescimento quando foram adicionados 100mL.L⁻¹ de água de coco ao meio MS.

Com a utilização do filme plástico espera-se poucas trocas gasosas, mas o suficiente para permitir respostas positivas e semelhantes à vedação com filtro no alongamento de explantes de *Jatropha curcas*, quando comparada com a vedação que não permite trocas gasosas. Estas descrições corroboram com Mills et al. (2004), que observaram, no tratamento de ventilação intermediário, que os propágulos de jojoba alongaram a uma extensão maior que os propágulos crescidos sem ventilação. Ribeiro (2006) também observou que a utilização de diferentes tipos de vedações que permitam maior troca gasosa proporciona efeito positivo na organogênese em berinjela.

Para o parâmetro porcentagem de folhas apresentado na Tabela 1, interações significativas foram observadas para os níveis de 0 a 50mL.L⁻¹ de água de coco e as vedações testadas. Observou-se maior porcentagem de folhas na ausência de água de coco e uso de filme plástico (52,81%), resultado superior às demais vedações. Respostas inferiores foram observadas na concentração de 50mL.L⁻¹ na presença do filme plástico e vedação com filtro.

Interações significativas da porcentagem de primórdios radiculares foram observados nas concentrações de 50 e 100mL.L⁻¹ de água de coco, sendo a melhor resposta encontrada na combinação de 50mL.L⁻¹ de água de coco com vedação com filtro e filme plástico (28,12 e 25,08%, respectivamente) e 27,34%

na concentração de 100 mL.L^{-1} de água de coco com a vedação de filme plástico (Tabela 1). Pela Figura (2) é possível visualizar a formação de raízes adventícias sobre a superfície do explante.

O efeito inibitório da água de coco na indução da organogênese de pinhão-manso pode ser explicado pela presença de elevados teores de glicose, frutose e sais minerais, além de hormônios vegetais, necessários ao processo de formação e desenvolvimento de culturas *in vitro*, que provavelmente em combinação com os constituintes do meio MS, meio rico em sais minerais e outros elementos, apresentaram efeito desestimulador.

Concentrações crescentes de água de coco incorporadas ao meio MS em associação com frascos vedados com tampas de polipropileno sem filtro influenciaram o desenvolvimento organogênico dos explantes de maneira negativa. Para água de coco, como a relação foi direta para a maioria das variáveis, exceção para primórdios radiculares, quanto maior a concentração menor a resposta, pode-se inferir que o comportamento não regenerativo dos explantes foi devido ao uso de água de coco no meio de cultura.

De modo geral, o meio de cultura nos frascos tem uma concentração adequada de água e nutrientes de tal maneira que a umidade relativa interna é muito alta. A alta umidade dentro do frasco com vedação sem filtro pode afetar o crescimento e a morfogênese de cultivos *in vitro*, sendo, provavelmente, uma das causas da baixa taxa de crescimento dos explantes.

Pelas observações em MEV foi possível visualizar mudanças no formato celular dos calos cultivados em meio MS na ausência e na presença de 50 mL.L^{-1} de água de coco, em frascos com diferentes tipos de vedação (Figura 3). Pelas observações é possível inferir que explantes de pinhão-manso somente apresentaram competência regenerativa quando na ausência ou em baixas concentrações de água de coco. Estes tratamentos podem ser considerados como fatores sinalizadores de desdiferenciação celular e conseqüente retomada de

características meristemáticas, favoráveis à organogênese da espécie. Em altas concentrações de água de coco, acima de 50mL.L^{-1} pode-se afirmar que o desenvolvimento das estruturas organogênicas foi limitado ou impedido. É sabido que as células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados, explicando bem os resultados obtidos no trabalho.

Em relação à Figura 3 A, B e C, observa-se as características mais persistentes, mas não necessariamente melhores; são mais facilmente discerníveis e, em certa extensão, também em número maior do que as características apresentadas pelos indivíduos da Figura 3 D, E e F. Um exemplo desta situação é a mudança da concentração de água de coco e o tipo de vedação em que os explantes ou indivíduos foram submetidos. Foi verificado que, quanto menor a concentração de água de coco e o uso de vedações que permita o mínimo de troca gasosa com o meio externo, melhores são as respostas.

Contudo, dependendo da concentração de água de coco, a organogênese *in vitro* foi positiva, ou seja, houve formação de protuberâncias e gemas nas condições de ausência e da menor concentração de água de coco. Concentrações elevadas não são vantajosas para a micropropagação, uma vez que o número de gemas formado é significativamente e morfológicamente inferior nos tratamentos com concentrações superiores a 50mL.L^{-1} de água de coco. Estes resultados corroboram resultados obtidos por Fernando et al. (2005), que verificou um maior número de gemas e protuberâncias em segmentos de hipocótilo de *Passiflora edulis* inoculados em meio MS contendo 5% de água de coco.

Observa-se, no presente estudo, que em calos de *J. curcas* há formação de estruturas foliares, as quais são erroneamente interpretadas como gemas que não se alongam (Figura 3F). As análises estruturais da organogênese *in vitro* em *J. curcas* mostra grande capacidade dos explantes para a formação de primórdios

caulinares e não foliares (Figura 3). O caminho organogênico via primórdio foliar compromete o sucesso da cultura *in vitro*, pois a presença de meristema apical caulinar é essencial para a produção de brotos.

Para Kerbaux (1999), a utilização de substâncias reguladoras de crescimento tem-se mostrado de importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, condições estas necessárias à formação de meristemas caulinares e/ou radiculares. Era o que se esperava com o uso de altas concentrações de água de coco, mas percebe-se que esta substância, quando elevada, não proporciona tal evento em cultivos *in vitro* de explantes de pinhão-manso. Neste trabalho, a ausência de água de coco ou concentrações até 50mL.L⁻¹ e vedação do tipo filme plástico ou tampa de polipropileno com filtro de membrana são indicativos para o êxito da organogênese em pinhão-manso.

6 CONCLUSÕES

A ausência de água de coco no meio de cultivo favorece a multiplicação das brotações em explantes de pinhão-manso.

O uso do filme plástico, seguido da tampa de polipropileno com filtro tem efeito positivo na indução da organogênese em explantes de pinhão-manso.

As características de formação de gemas sobre a superfície dos explantes de pinhão-manso podem ser utilizadas como descritores da organogênese, sendo que as estruturas formadas, em meio nutritivo com menores concentrações de água de coco e uso de vedações que permita o mínimo de troca gasosa com o meio externo, são satisfatórias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.
- ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; COSTA, F. C. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 53, n. 310, p. 608-613, 2006.
- ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 166-173, 2002.
- CARVALHO, J. M. F. C.; SOUSA JÚNIOR, R. L. de; LOPES, K. P.; SANTOS, J. W. dos. **Otimização da metodologia da regeneração de embrião imaturo de algodão**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2003. 3 p. (Embrapa Algodão. Comunicado técnico, 173).
- CHEN, C. Humidity in plant tissue culture vessels. **Biosystems Engineering**, London, v. 88, n. 22, p. 231-241, 2004.
- DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 482-487, 2008.
- DEORE, A. J.; JOHNSON, T. S. High frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel crop. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 2, n. 1, p. 7-11, 2008.
- FERNANDO, J. A.; VIEIRA, M. L. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Organogênese *in vitro* a partir de explantes foliares e hipocotiledonares de *passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PINTO, A. C. Q.; SOUZA, E. S. (Ed.). **Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro: trabalhos apresentados**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2005. p. 192-195.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3: sistema de análise estatística**. Lavras: UFLA, 2000.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

- GONÇALVES, L. A. *Herreira salsaparilha Martius (Herreriaceae):* anatomia, citogenética, citometria de fluxo e propagação *in vitro*. 2004. 88 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 519-531.
- MARINO, G.; BERARDI, G. Different sealing materials for petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of Quince 'BA 29'. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 4, p. 384-388, 2004.
- MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZIONE, A. Improved of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, p. 396-402, 2004.
- MOREIRA, C. V. **Ambiente de cultivo na micropropagação de *Annona glabra* L.** 2008. 137 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473- 479, 1962.
- NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N. dos; CUSTÓDIO, T. N.; ARAUJO, A. G. de. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2008.
- RAJORE, S.; BATRA, A. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology**, New York, v. 14, p. 73-75, 2005.

RIBEIRO, A. P. de O. **Influência de genótipo, agentes gelificantes, precursor (ACC) e inibidores (AVG e STS) do etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.)**. 2006. 127 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 690 p.

ZOBAYED, S. M. A. *In vitro* propagation of *Lagerstroemia* spp. From nodal explants and gaseous composition in the culture headspace. **Environment Control in Biology**, [S.l.], v. 38, p. 1-11, 2000.

ANEXOS

TABELA 1 Porcentagem de brotos (PB), número de brotos (NB), comprimento de broto (CB), porcentagem de folhas (PF) e porcentagem de primórdios radiculares (PPR) em explantes de folhas cotiledonares de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) cultivados em meio MS com diferentes concentrações de água de coco e vedações: filme plástico (FP), tampa de polipropileno sem filtro (TSF) e tampa polipropileno com filtro de membrana permeável a gases (TCF)*

	(FP)	(TSF)	(TCF)
Água de coco (mL.L ⁻¹)	PB (%)		
0	96,34 aA	39,53 aB	47,12 aB
50	34,21 bA	32,81 aA	41,40 aA
100	0,00 cB	25,08 aA	0,00 bB
150	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA
200	0,00 cA	0,00 bA	0,00 bA
	NB		
0	2,07 aA	1,05 aB	1,84 aA
50	0,60 bA	0,57 aA	0,62 bA
100	0,00 bA	0,56 aA	0,00 bA
150	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA
200	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA
	CB (cm)		
0	1,59 aA	1,29 aA	1,82 aA
50	1,35 aA	0,36 bB	0,95 bA
100	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA
150	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA
200	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA
	PF (%)		
0	52,81 aA	23,36 aC	45,30 aB
50	23,98 bA	0,00 bB	28,12 bA
100	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA
150	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA
200	0,00 cA	0,00 bA	0,00 cA
	PPR (%)		
0	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA
50	25,08 aA	0,00 bB	28,12 aA
100	27,34 aA	22,81 aB	0,00 bC
150	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA
200	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA

* Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, diferem entre si, pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

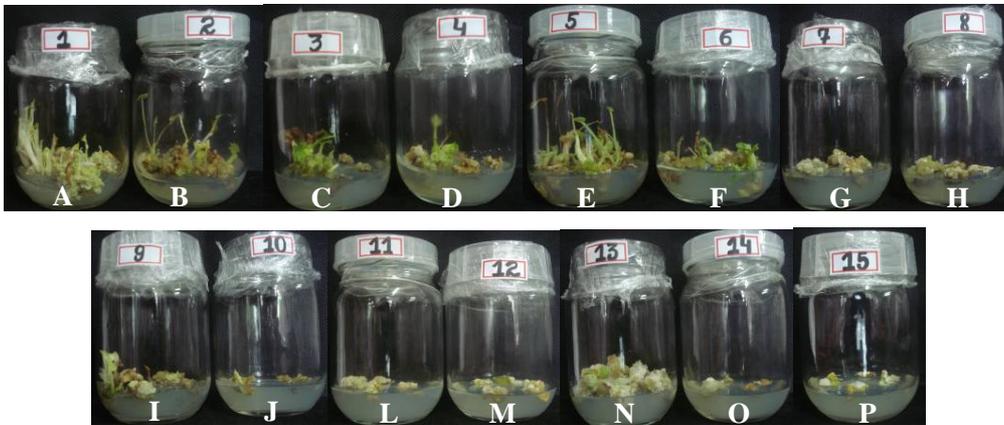


FIGURA 1 Influência do tipo de vedação e concentrações de água de coco sobre a indução de organogênese em *Jatropha curcas* L. Explantes mantidos em frascos vedados com: filme plástico (A, D, G, J e N); tampa polipropileno com filtro de membrana permeável à gases (B, E, H, L e O) e tampa polipropileno sem filtro (C, F, I, M e P); e concentrações de água de coco: ausência (A, B e C); 50mL.L⁻¹ (D, E e F); 100mL.L⁻¹ (G, H e I); 150 mL.L⁻¹ (J, L e M) e 200 mL.L⁻¹ (N, O e P).

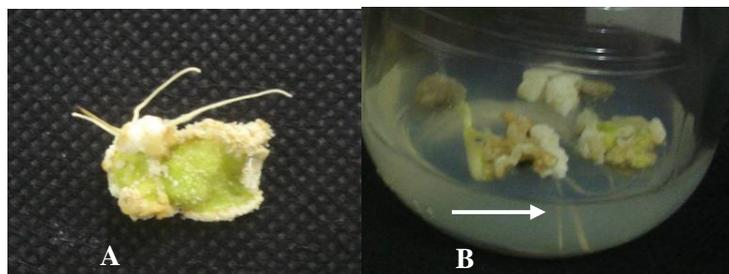


FIGURA 2 Indução de primórdios radiculares em explantes de *Jatropha curcas* L. cultivados em meio MS suplementado com 50mL.L⁻¹ e 100mL.L⁻¹ de água de coco. (A) Explante com pouca formação de calos e presença de primórdios radiculares e (B) Explantes com maior presença de calos e presença de primórdios radiculares (seta).

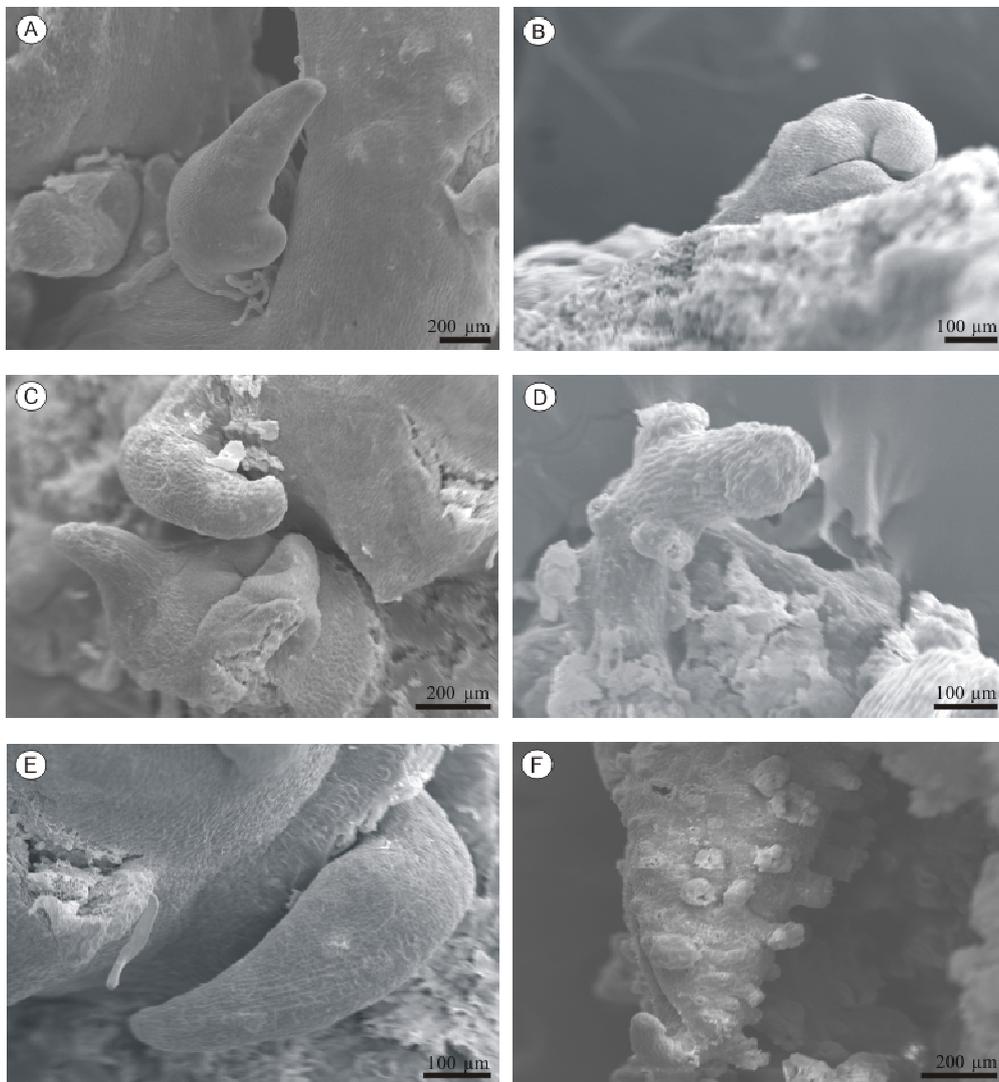


FIGURA 3 Eletromicrografias de calos oriundos de folhas cotiledonares de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) cultivados em meio MS com diferentes concentrações de água de coco e tipo de vedações dos frascos: filme plástico (A e D); tampa polipropileno com filtro de membrana permeável a gases (B e E) e tampa polipropileno sem filtro (C e F) e concentrações de água de coco: ausência (A, B e C) e 50mL.L⁻¹ (D, E e F). Meristema apical caulinar (B) e primórdio foliar (F).

CAPÍTULO 5

NITROGÊNIO NA ORGANOGÊNESE DE SEGMENTOS FOLIARES DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.) CULTIVADOS *IN VITRO*

1 RESUMO

Culturas *in vitro* tendem a responder diferentemente às formas minerais de nitrogênio e, considerando que a quantidade de N fornecida na forma de nitrato e amônio no meio de cultura MS é elevada, objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio usadas no meio de cultura de segmentos foliares de pinhão-manso. Folhas cotiledonares oriundas de plântulas preestabelecidas *in vitro* foram inoculadas em meio MS, com adição de 30g.L^{-1} de sacarose e vitaminas do meio B₅, $1,0\text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ de AIA. Os tratamentos consistiram da interação de concentrações 0, 50, 100, 150 e 200% de NH_4NO_3 e KNO_3 do meio MS, combinadas entre si. As culturas foram mantidas em câmara escura. Foi realizada avaliação da capacidade organogênica do material quanto à presença de explantes responsivos aos 30 dias e número de brotações aos 30 e 60 dias após a inoculação. Recomendam-se concentrações entre 50 e 100% de KNO_3 e NH_4NO_3 no meio MS, pois favorecem a indução de calos responsivos com formação de primórdios vegetais. O maior número de brotos é obtido aos 60 dias de cultivo com concentração de 150% para NH_4NO_3 e até 100% para KNO_3 , em relação à concentração padrão do meio MS.

2 ABSTRACT

The *in vitro* cultures tend to respond differently to the nitrogen minerals forms, and considering that the amount of N supplied as nitrate and ammonium in the culture medium MS is high, this work aimed to evaluate the effects of different concentrations of nitrogen used in the culture medium of leaf segments of physic nut. Cotyledonary leaves originated from *in vitro* plants were inoculated on MS medium added with 30g.L⁻¹ of sucrose and vitamins of B₅ medium, 1.0 mg.L⁻¹ BAP and 0.5 mg.L⁻¹ AIA. The treatments consisted of the interaction of concentrations 0, 50, 100, 150 and 200% of NH₄NO₃ and KNO₃ of the MS medium, combined with each other. The cultures were kept in the dark. It was evaluated the organogenic capacity of the material for the presence of responsive explants at 30 days and number of shoots at 30 and 60 days after inoculation. It is recommended concentrations between 50 and 100% of KNO₃ and NH₄NO₃ in MS medium because it favors the induction of responsive callus with formation of early plants. The highest number of shoots is obtained at 60 days of culture with concentration of 150% to NH₄NO₃ and up to 100% to KNO₃, compared to the standard concentration of MS medium.

3 INTRODUÇÃO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é normalmente propagado por semente e, em consequência, suas progênies são muito heterogêneas, inexistindo uniformidade de produto. Se por um lado esta variabilidade pode representar interessante material genético, por outro lado a uniformidade varietal poderá solucionar diversos problemas da produção e da comercialização. Diante disto, os métodos de propagação vegetativa assumem grande importância na expansão e consolidação da cultura. No entanto, a produção em larga escala destas plantas só é possível pela cultura *in vitro*, uma vez que pelo método tradicional de propagação vegetativa apenas algumas unidades de novas mudas podem ser obtidas.

Existe grande interesse do setor agroenergético para a obtenção de plantas oleaginosas com alto padrão de uniformidade, com características ímpares de qualidade produtiva e elevado teor de óleo. Dentre essas plantas oleaginosas, o pinhão-manso já é cotado como uma cultura agroenergética de destaque no mercado de biocombustíveis. Uma alternativa para obtenção de mudas uniformes em pinhão-manso seria estabelecer uma tecnologia de propagação vegetativa para a formação direta das mudas, o que representará um significativo avanço na cultura. Neste sentido, várias pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de desenvolver protocolos eficientes de organogênese e de embriogênese somática para a multiplicação dessa espécie (Sujatha et al., 2005; Jha et al., 2007; Deore & Johnson, 2008; He et al., 2009). Técnicas de multiplicação em pinhão-manso via cultura *in vitro* ainda devem ser aperfeiçoadas, porque existem dificuldades na taxa de brotação e multiplicação dos explantes.

No cultivo *in vitro*, as exigências nutricionais requeridas para um tecido variam de acordo com o genótipo, necessitando-se, assim, aperfeiçoar os meios de cultura. Esse aperfeiçoamento pode ser feito a partir de variações de

nutrientes minerais. Dentre os elementos presentes no meio de cultura, o nitrogênio é um dos principais nutrientes essenciais e ativos, sendo absorvido, principalmente, na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). Tanto o crescimento como a morfogênese e a totipotência celular em culturas *in vitro* são sensivelmente influenciados pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como é fornecido (Kirby et al., 1987)

Para alguns autores, dependendo da espécie em cultivo, pode-se observar um estímulo do crescimento e desenvolvimento da planta *in vitro*, evidenciando a essencialidade da combinação das duas formas de N, amônio e nitrato, tais como café (*Coffea arabica*), ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) e orquídea (*Cattleya loddigesii*) (Ribeiro et al., 2002; Maldaner et al., 2006; Pasqual et al., 2009).

Este trabalho visou contribuir com informações para o estabelecimento de um protocolo de organogênese *in vitro* do pinhão-manso que possa refletir na obtenção de mudas de boa qualidade e em larga escala. Considerando que as plantas tendem a responder diferentemente às formas minerais de N e que a quantidade de N fornecida na forma de nitrato e amônio no meio de cultura MS é elevada, aliado ao seu alto custo e dificuldade de aquisição, objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio usadas no meio de cultura de segmentos foliares de pinhão-manso.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Vegetais, do Departamento de Agricultura, na Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

Utilizou-se como material vegetal, sementes colhidas na safra de 2008, provenientes da matriz Oracília, acesso selecionado do banco de germoplasma do município de Janaúba (MG), cedidas pela empresa NNE Minas Agroflorestal.

As sementes para manutenção de sua qualidade foram armazenadas por seis meses sob condições de câmara fria (temperatura de 10°C e umidade relativa de 60%), no Setor de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA. Após processo de assepsia com álcool 70% v/v, hipoclorito de sódio 1% v/v e tríplice lavagem das sementes, os embriões zigóticos foram retirados e incubados para posterior utilização das plântulas no experimento.

Segmentos foliares de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) de aproximadamente 1cm² foram retirados da região central das folhas cotiledonares provenientes de plântulas preestabelecidas *in vitro* em meio Murashige & Skoog (1962) e inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL de meio de cultivo MS contendo metade dos sais, excetuando os sais de nitrato de amônio (NH₄NO₃) e nitrato de potássio (KNO₃). Os segmentos foliares foram inoculados com a face abaxial voltada para o meio de cultivo. Os tratamentos consistiram da interação de concentrações 0, 50, 100, 150 e 200% de nitrato de amônio (NH₄NO₃) e nitrato de potássio (KNO₃) do meio MS, acrescido com 30g. L⁻¹ de sacarose, 1,0 mg.L⁻¹ de BAP (6-Benzilaminopurina), 0,5 mg.L⁻¹ de AIA (Ácido 3-indolacético) e vitaminas do meio B₅ (Gamborg et al., 1968). O meio de cultivo foi solidificado com 6g.L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C por 20 min. As culturas foram mantidas por 8 semanas, no escuro, dentro de um compartimento de metal (armário) instalado em sala de crescimento a 25±2°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 5x5, constituído de quatro repetições com três tubos cada uma.

Foi realizada avaliação da capacidade organogênica do material quanto à presença de explantes responsivos e número de brotações aos 30 e 60 dias após a inoculação. Foram aplicadas as notas 0 e 1 como critério na avaliação dos explantes responsivos aos 30 dias: (0) ausência de brotações, (1) presença de

brotações. Posteriormente, as culturas foram transferidas para câmara clara (sala de crescimento), com fotoperíodo de 16 horas diárias e intensidade luminosa de 42 W.m^{-2} .

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade e os tratamentos comparados por meio de regressão polinomial, pelo programa SISVAR[®] (Ferreira, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Depois de alguns dias em meio de indução, muitos explantes apresentaram inchaço nas bordas de corte, caracterizando a formação de calos com aspecto organogênico (Figura 3A). Pela análise fatorial dos dados, aos 30 dias de cultivo observou-se interação significativa para explantes responsivos, em que a utilização de 50 e 100% das concentrações de NH_4NO_3 e todas as doses de KNO_3 , inclusive em sua ausência no meio de cultura, promoveram a formação de calos com capacidade organogênica. O uso de 150% de NH_4NO_3 em combinação às concentrações de 150 e 200% de KNO_3 mostrou-se ineficiente no processo de organogênese *in vitro*. Não houve formação de explantes responsivos tanto na ausência como na utilização de 200% da concentração desses nutrientes no meio de cultura (Tabela 1), confirmando que o estímulo para processos de organogênese dessa espécie é ativado na presença de concentrações de 50 até 150% das fontes de N.

Quando se utilizou somente o KNO_3 , como fonte de N, a resposta foi positiva para formação de explantes responsivos, resultado semelhante também foi verificado com o uso isolado do NH_4NO_3 (Tabela 1). Quando o N é fornecido somente na forma de nitrato, a quantidade desse nutriente no meio de cultura é abundante no início do estabelecimento do explante. Entretanto, com o crescimento do explante, o meio começa a apresentar deficiência desse nutriente.

Quando o N é fornecido nas formas de nitrato e amônio, inicialmente o N na forma nítrica é consumido mais rapidamente e, posteriormente, o N na forma amoniacal torna-se disponível para ser consumido pelo explante. Em trabalho realizado com segmentos nodais de *Coffea arabica*, obteve-se crescimento mínimo de brotações quando o cultivo foi realizado em meio contendo nitrato como única fonte de N (Ribeiro et al., 2002). Desta forma fica evidenciada a essencialidade da combinação de ambas as fontes no cultivo *in vitro*.

A análise fatorial apresentou interação significativa para número de brotos aos 30 e 60 dias após a inoculação (Figuras 1A-D), com a diminuição e/ou aumento das concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 .

Aos 30 dias após a inoculação (DAI), os maiores números de brotos (1,5 e 2,3) foram obtidos na presença de duas situações que se comportaram de forma linear decrescente, ou seja: pela combinação de maiores concentrações de NH_4NO_3 com menores concentrações de KNO_3 (Figura 1A). Estes resultados demonstram que variações de componentes essenciais do meio MS podem alterar o padrão de desenvolvimento das plantas. Provavelmente, a combinação de altas doses de NH_4NO_3 com baixas de KNO_3 afeta positivamente a formação de brotos, pois o nitrogênio contribui de forma efetiva tanto no metabolismo celular como na regulação do potencial osmótico do meio de cultura. Situação inversa visualizada pela Figura (1B) mostra que as concentrações de 150 % de KNO_3 combinada a menores de NH_4NO_3 não necessariamente são satisfatórias, pois correspondem a um número menor de brotos (1,2) (Figura 1B).

Os resultados encontrados são concordantes com os de Sato et al. (2001) que afirmam que a maioria das plantas prioriza a absorção de NH_4^+ a NO_3^- . Porém, situações contrárias também são verdadeiras quando se observa na Figura (1A) um comportamento quadrático na ausência de NH_4NO_3 em combinação KNO_3 , sendo possível estimar, pela equação de regressão, o número máximo de brotos (1,3), correspondente a 100% KNO_3 . Concentrações

crecentes de KNO_3 até 100% promoveram acréscimos significativos no número de brotos e pode-se deduzir que concentrações superiores a 100% de KNO_3 não são necessárias para esta variável, podendo ser tóxico a partir do mesmo e concentrações inferiores a 50%, não são eficientes para obtenção de maior número de brotos de explantes de pinhão-mansão.

Embora algumas espécies cresçam *in vitro* na presença apenas de nitrato, a maioria dos explantes derivados de plantas intactas, tecidos e órgãos, incorpora nitrogênio e cresce mais rapidamente em soluções contendo íons nitrato e amônia do que na presença de apenas uma dessas fontes (Pasqual, 2001).

Aos 60 dias após a inoculação (DAI), o número de brotações (3,0 e 5,0) por explante de pinhão-mansão também apresentou respostas semelhantes às variações das concentrações de N aos 30 (DAI), sendo que o aumento da concentração de NH_4NO_3 de 50 para 100% combinado com ausência e concentrações menores de KNO_3 da concentração original do meio MS proporcionou maior incremento de brotações (Figura 2A). Testando-se situação oposta (Figura 2B), ou seja: a combinação de concentrações de KNO_3 associada às concentrações de NH_4NO_3 verificou-se que a melhor resposta para número de brotações (7,0) foi a combinação da ausência de KNO_3 com porcentagens crescentes de NH_4NO_3 . Também observou-se que a presença de 150% de KNO_3 em interação com a diminuição das porcentagens de NH_4NO_3 afeta negativamente o número de brotações (1,0). De posse desses resultados pode-se inferir que os níveis de nutrientes inorgânicos nos substratos de cultivo *in vitro* influenciam os processos metabólicos nas culturas, apresentando efeito sobre o crescimento e a diferenciação dos tecidos.

Sato et al. (2001), estudando a influência da concentração de nitrato de amônio na micropropagação da mandioca (*Manihot esculenta*), verificaram que concentrações em torno de 50% da concentração original do MS favorecem o maior número de brotações sem apresentar vitrificação. Silva et al. (2005)

registraram que o incremento das concentrações de nitrato de amônio, na ausência de cinetina, aumentou o número de gemas e brotos em *Dyckia maritima* (Bromeliaceae). Maldaner et al. (2006), ao testarem o efeito de concentrações de N em combinação com sacarose, obtiveram maior número de brotos na presença de 70% de N, em segmentos nodais de *Pfaffia glomerata*. Também Araujo et al. (2009) constataram que concentrações até 450 mg.L⁻¹ de nitrato de amônio promoveram aumento de brotações na micropropagação de *Cattleya loddigesii* (Orchidaceae). Estes resultados demonstram que as respostas isoladas ou a interação entre concentrações reduzidas e/ou elevadas de N no meio de cultivo variam em função da espécie vegetal em questão.

Após a transferência dos calos com competência organogênica para câmara clara (sala de crescimento), o desenvolvimento da regeneração de estruturas foliares de pinhão-manso foi acompanhado conforme Figuras (3B-E). Passados 10 a 15 dias de estabelecimento dos calos na presença de luz, verificou-se início de formação de clorofila, indicando resposta ao estímulo luminoso. A coloração marrom clara exibida pelos calos não caracterizavam calos oxidados e estes não apresentaram dificuldades para regenerar suas brotações (Figura 3B). A Figura (3C) torna visível o desenvolvimento peculiar de brotações no estágio inicial e broto alongado após 2 meses de subcultivo em meio MS contendo metade dos sais, com presença de 150% de NH₄NO₃ e 50% de KNO₃, vitaminas do meio B₅ e dos fitorreguladores BAP e AIA. As imagens exibidas pela Figura (3A-F) corroboram o conceito de organogênese *in vitro*, que pode ser definida como o processo no qual células e tecidos vegetais são induzidos a sofrer mudanças que levam à produção de uma estrutura unipolar, denominada primórdio vegetativo, com sistema vascular conectado com o tecido de origem. Nos trabalhos com pinhão-manso, essas estruturas têm sido frequentemente observadas em diferentes explantes e de forma indireta (Sujatha

et al., 2005; Deore & Johnson, 2008), via formação de calos como mostra o trabalho.

Os calos foram novamente subcultivados e transferidos para o meio de cultivo onde permaneceram por mais 2 meses e potencializaram a fase de multiplicação (Figura 3D). Nessa fase, as células dos explantes adquiriram maior competência e habilidade de responder a sinais hormonais com consequente aumento da indução de órgãos. Durante essa fase, os autores puderam visualizar a múltipla formação e desenvolvimento de órgãos vegetativos sob a influência do balanço nutricional estudado no presente trabalho.

Finalmente, brotos com aproximadamente 3cm de comprimento foram individualizados e inoculados em meio de cultura com ausência dos fitorreguladores adicionados ao meio MS experimental (Figura 3E). Tais brotos apresentavam estrutura definida e habilidade em responder ao estímulo de enraizamento na fase final do processo de formação da muda. Desse modo, a natureza manipulável da cultura de tecidos para pinhão-manso pode ser explorada para a maximização da multiplicação via organogênese *in vitro*, pois estes resultados indicam que o ganho em número de brotos/explante pode trazer vantagens significativas porque é um importante parâmetro de crescimento, sendo fundamental quando se objetiva alta taxa de multiplicação para produção em larga escala de plantas.

6 CONCLUSÕES

Concentrações entre 50 e 100% de KNO_3 e NH_4NO_3 no meio MS favorecem a indução de calos responsivos com formação de primórdios vegetais.

O maior número de brotos é obtido aos 60 dias de cultivo com concentração de 150% para NH_4NO_3 e até 100% para KNO_3 , em relação à concentração padrão do meio MS.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após avaliação das condições de cultivo para o desenvolvimento de protocolo via organogênese *in vitro* em pinhão-manso, recomenda-se a realização do seguinte protocolo:

- Assepsia das sementes;
- Cultivo dos embriões em luz branca (sala de crescimento);
- Obtenção da plântula *in vitro* após 10 dias de cultivo;
- Retirada do segmento foliar de folhas cotiledonares *in vitro*;
- Inoculação em meio MS $\frac{1}{2}$ dos sais, sendo 150% NH_4NO_3 + 50% KNO_3 ; 1mg.L^{-1} de BAP + $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ de IAA; vitaminas B_5 , 30g.L^{-1} de sacarose; 6g.L^{-1} de ágar e filme plástico como vedação;
- Manter a cultura na ausência de luz por 60 a 90 dias;
- Transferir para luz (sala de crescimento) e, após 15 dias, repicagem dos calos e transferência para novo meio para multiplicação;
- Após 2 meses, repicagem dos brotos para meio de enraizamento (etapa não concluída).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, J. G. de; ZARRAGA, D. Z. A. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.
- DEORE, A. J.; JOHNSON, T. S. High frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel crop. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 2, n. 1, p. 7-11, 2008.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA, 2000.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.
- HE, Y.; GUO, X.; LU, R.; NIU, B.; PASAPULA, V.; HOU, P.; CAI, F.; XU, Y.; CHEN, F. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 1, p. 11-17, 2009.
- JHA, T. B.; MUKHERJEE, P.; DATTA, M. M. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 1, n.3, p. 135-140, 2007.
- KIRBY, E. G.; LEUSTEK, T.; LEE, M. S. Nitrogen nutrition. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Cell and Tissue Culture in Forestry**, Dordrecht, v. 1, p. 67-88, 1987.
- MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S. de; FLORES, R.; SKREBSKY, E. T. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1202-1206, jul./ago. 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 43, p. 473- 479, 1962.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**: meios de cultura. Lavras: UFLA, 2001.

PASQUAL, M.; FIGUEIREDO, M. A. de; REZENDE, J. C. de; ARAÚJO, A. G. de; SANTOS, F. C.; FERREIRA, E. A.; JUNQUEIRA, K. P. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, abr./jun. 2009.

RIBEIRO, L. S. de; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R. de; ARANTES, E. S. de; CHAGAS, E. A. Fontes de nitrogênio na micropropagação de *Coffea arabica*. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 3, n. 1/2, p. 107-112, 2002.

SATO, A. Y.; MARIA, J.; SEDIYAMA, T; BORÉM, A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Micropropagação da mandioca: influência da concentração de amônio com e sem BAP. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 48, n. 279, p. 405-413, 2001.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; BISOGNIN, D. A.; DORNELLES, E. B.; WALTER, J. M. Efeitos do nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker - Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 3, p. 369-371, 2005.

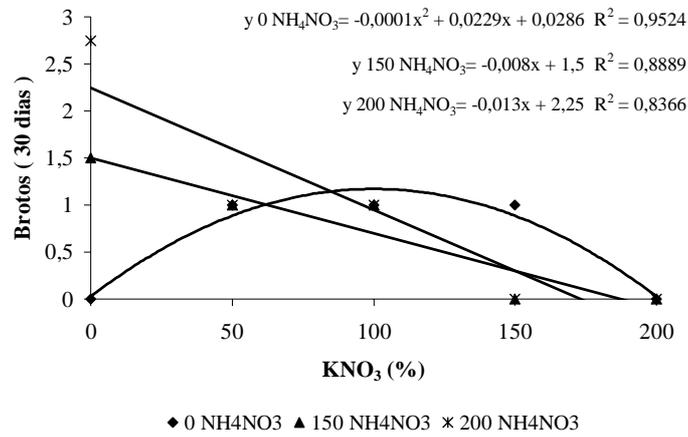
SUJATHA, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 47, n. 1, p. 83-90, 2005.

ANEXOS

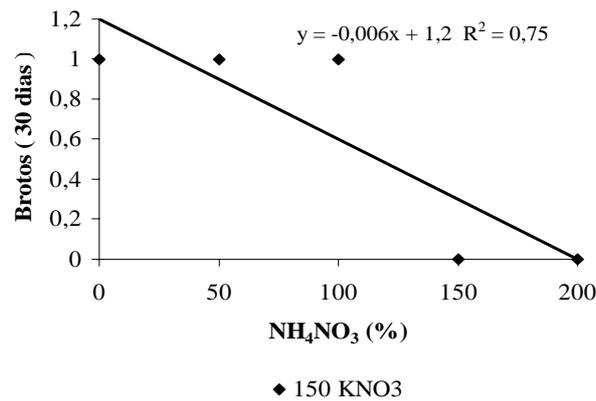
TABELA 1 Efeito de concentrações de nitrogênio do meio Murashige & Skoog (1962) na formação de explantes responsivos de folhas cotiledonares de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) cultivadas *in vitro* por 30 dias após a inoculação.*

		Explante responsivo				
NH ₄ NO ₃ (%)	KNO ₃ (%)					
	0	50	100	150	200	
0	0 bB	1 aA	1 aA	1 aA	1 aA	
50	1 aA	1 aA	1 aA	1 aA	1 aA	
100	1 aA	1 aA	1 aA	1 aA	1 aA	
150	1 aA	1 aA	1 aA	0 bB	0 bB	
200	0 bA	0 bA	0 bA	0 bA	0 bA	

* Médias seguidas por letras distintas, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, diferem entre si, pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

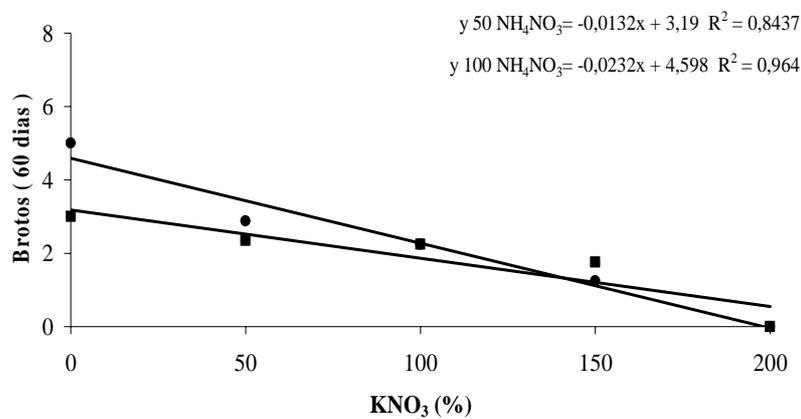


A

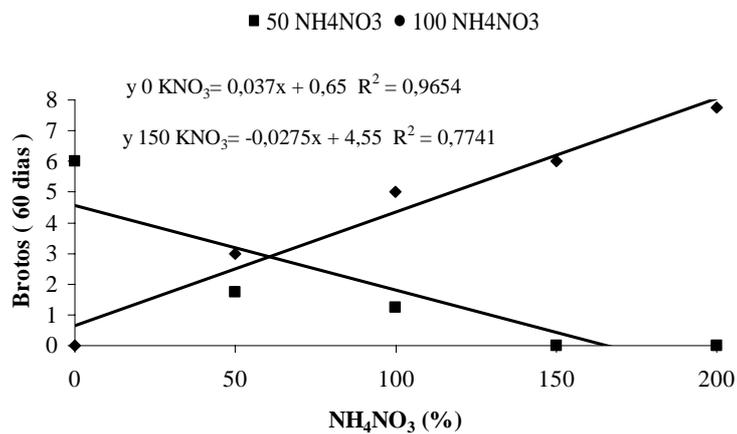


B

FIGURA 1. Efeito de concentrações de nitrogênio do meio Murashige & Skoog (1962) na formação de brotos em explantes de folhas cotiledonares de pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) cultivados *in vitro* por 30 dias após a inoculação.



A



B

FIGURA 2 Efeito de concentrações de nitrogênio do meio Murashige & Skoog (1962) na formação de brotos em explantes de folhas cotiledonares de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) cultivados *in vitro* por 60 dias após a inoculação.

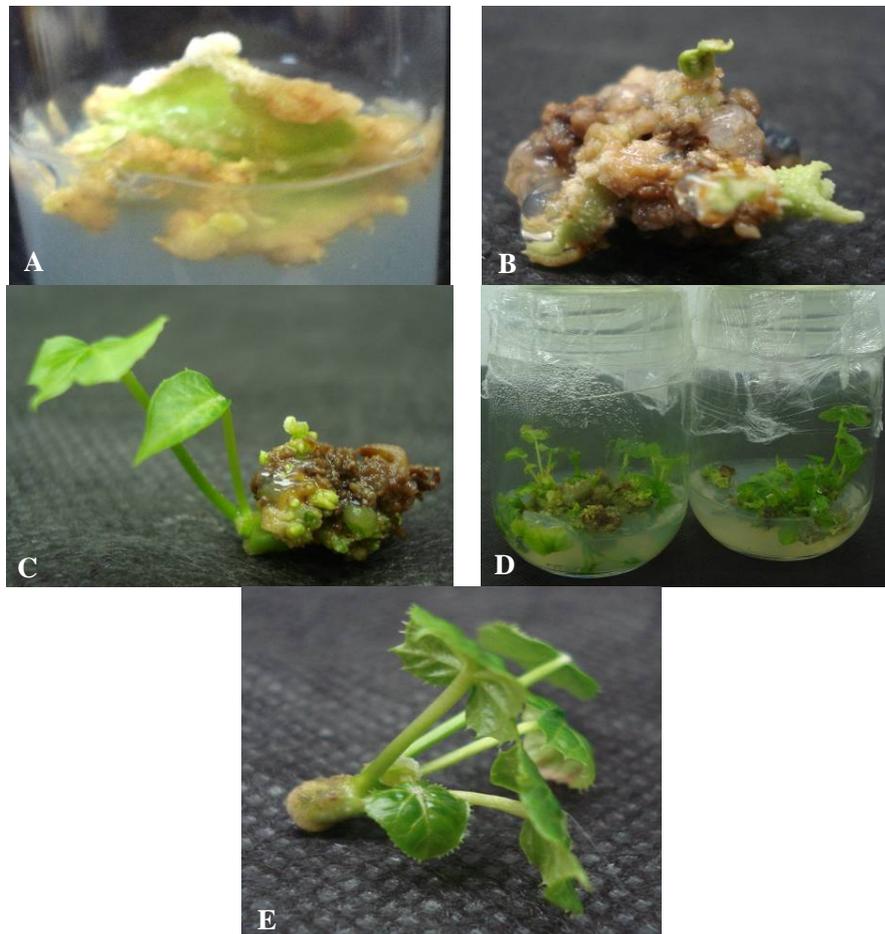


FIGURA 3 Organogênese de explantes de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) oriundos de folhas cotiledonares: (A) explante responsivo aos 30 (DAI), (B) explante com início de formação de clorofila após 15 dias de transferência para câmara clara, (C) desenvolvimento das brotações adventícias após 2 meses em câmara clara, (D) multiplicação de brotos e (E) brotos após 4 meses com aproximadamente 3cm de comprimento pronto para iniciar a formação de raízes.