

**CARACTERIZAÇÃO DE MASSAS PRÓ-
EMBRIOGÊNICAS EM PINHÃO-MANSO
(*Jatropha curcas* L.)**

DALILHIA NAZARÉ DOS SANTOS

2010

DALILHIA NAZARÉ DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS EM
PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

Santos, Dalíhíá Nazaré dos.

Caracterização de massas pro-embriogênicas em pinhão-mansó
(*Jatropha curcas* L.) / Dalíhíá Nazaré dos Santos. – Lavras : UFLA,
2010.

119 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Calogênese. 2. Curva de crescimento. 3. Ultraestrutura. 4.
Citoquímica. 5. Viabilidade celular. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 633.85

DALILHIA NAZARÉ DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS EM
PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2010

Pesq. Dr^a. Aparecida Gomes de Araujo

UFLA

Pesq. Dr^a. Ester Alice Ferreira

EPAMIG

Pesq. Dr^a. Leila Aparecida Salles Pio

EMBRAPA

Prof. Dr. Moacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus,

Pelo amor incondicional e presença cotidiana.

OFEREÇO

Aos meus amados pais, Lázaro C. Santos e Aparecida de N. S. Santos,

Aos meus queridos irmãos Vanilha e Danilo,

pelo amor e confiança.

DEDICO

Aos amigos,

pela torcida

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Agora, tenho um momento de reflexão e, nesta oportunidade, quero expressar a vocês minha gratidão. Início agradecendo a Deus, por ser meu amigo, me auxiliando nas escolhas e me confortando nas horas difíceis. Principalmente, pela graça da vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao CNPq pela oportunidade de estudo.

Ao meu orientador Moacir Pasqual, toda minha admiração por seu brilhantismo acadêmico, pela visão positiva do dia a dia e sorriso diário. Saiba que contemplo seu lado humanista e sua obstinação em fazer sutilmente um bom trabalho. Agradeço pela confiança depositada, sinônimo da liberdade em minha dissertação. É um orgulho ser sua orientada!

Aos membros da banca examinadora: Aparecida Gomes de Araujo, Ester Alice Ferreira e Leila Salles Pio, pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos laboratoristas Vantuil, pelo conhecimento e entretenimento; Claret, pela bondade e carinho; Antônio Carlos e Evaldo pela prestatividade.

A todos os colegas do laboratório de CTV, doutorandos, mestrandos e estagiários por tornarem meu trabalho mais agradável e promissor. De forma especial à Aurinete, Franciane, Joyce, Leila, Simone e Filipe.

À Cida, que veio me estimulando e permitindo o tempo para a construção pessoal de um trabalho. Agradeço a disponibilidade que sempre manifestou e a empatia com que recebeu minhas ideias, sua certeza me permitiu vencer as inseguranças deste processo. Você me ensina muito!

À Néia, que me fez sua discípula em “tudo”. Obrigada por sua amizade, alegria, pela irmandade toda especial que partilhamos desde nosso primeiro

encontro. Orgulho-me muito de ter sido merecedora de tão grande confiança e de compartilhar com você interesses comuns.

Agradeço aos amigos e colegas da Fisiologia Vegetal, por compartilharem tão grande esforço (Amanda, Carla, Cynthia, Fabiane, Kamila, Luciano, Marilza, Ordilena, Paôla e Rogério).

Às irmãs de república, Catarina, Lucília, Pauline e Thaís por se importarem comigo. Pela amizade sincera e por modificarem meu dia a dia positivamente, me enriquecendo como pessoa.

Às pessoas que se doaram. Cláudia, exemplo de generosidade; Douglas, pela paciência e auxílio; Prof. Eduardo Alves, Rosi e Neidi, pelos préstimos.

A todos do Laboratório de Microscopia Eletrônica (DFP-UFLA); Laboratório de Anatomia Vegetal (DBI-UFLA) e Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas (DBI-UFLA).

Meus agradecimentos à minha família chegam a ser redundantes, já que ela é o pilar em que sustento toda minha vida: Meu pai Lázaro, personificação do bom trabalho; minha mãe Aparecida, o amor e força em pessoa; minha irmã Vanilha, exemplo de perseverança e dedicação à família, que foi me guiando ao conhecimento e meu irmão Danilo, modelo de bom filho e irmão, que sempre me ouve e me orgulha;

Meu padrinho Antônio e minha madrinha Danilha, pela presença e ao meu cunhado Eder, por me impulsionar.

Enfim, mesmo que a palavra "obrigado" signifique tanto, neste momento ela me parece insuficiente para expressar, por inteiro, a minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram com essa formação. Mas espero que, ao lerem esse texto, se identifiquem e assumam para si o meu reconhecimento. Saibam que respeito e admiro muito, cada um de vocês.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução geral.....	02
2.1 Agroenergia.....	03
2.2 A espécie.....	04
2.3 Cultura de tecidos aplicada ao pinhão-mansô.....	05
2.4 Curva de crescimento de calo.....	07
2.5 Aspectos bioquímicos.....	09
2.6 Caracterização citoquímica.....	12
2.7 Caracterização ultraestrutural.....	13
2.8 Viabilidade celular.....	14
3 Referências bibliográficas.....	16
CAPÍTULO 2: Estabelecimento, análise ultraestrutural e citoquímica de explantes foliares de pinhão-mansô (<i>Jatropha curcas</i> L.) em resposta a diferentes balanços entre citocininas e auxinas.....	23
1 Resumo.....	24
2 Abstract.....	25
3 Introdução.....	26
4 Material e métodos.....	29
5 Resultados e discussão.....	32
6 conclusões.....	40
7 Referências bibliográficas.....	41
CAPÍTULO 3: Curva de crescimento e análise bioquímica de calos de pinhão-mansô (<i>Jatropha curcas</i> L.)	44

1 Resumo.....	45
2 Abstract.....	46
3 Introdução.....	47
4 Material e métodos.....	51
5 Resultados e discussão.....	55
6 conclusões.....	68
7 Referências bibliográficas.....	69
CAPÍTULO 4: Análise ultraestrutural de calos de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	73
1 Resumo.....	74
2 Abstract.....	75
3 Introdução.....	76
4 Material e métodos.....	78
5 Resultados e discussão.....	80
6 conclusões.....	95
7 Referências bibliográficas.....	96
CAPÍTULO 5: Análise citoquímica e de viabilidade celular em calos de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	99
1 Resumo.....	100
2 Abstract.....	101
3 Introdução.....	102
4 Material e métodos.....	105
5 Resultados e discussão.....	108
6 conclusões.....	115
7 Referências bibliográficas.....	116

RESUMO GERAL

SANTOS, Dalíllia Nazaré dos. **Caracterização de massas pró-embriogênicas em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2010. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa que tem despertado o interesse de produtores, governos e instituições de pesquisa, visando o desenvolvimento de tecnologia, como a cultura de tecidos, que possibilite sua utilização como cultura agroenergética. Inicialmente, estudou-se a relação de fitorreguladores para calogênese e, a partir deste, estruturou-se a curva de crescimento dos calos por 16 períodos de cultivo. Para cada período de cultivo foi determinado o comportamento dos metabólitos primários, carboidratos: açúcar solúvel total (AST), açúcar redutor (AR) e amido; proteína e aminoácidos. Foi feita análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET); avaliando o potencial embriogênico mediante a dupla coloração Carmim acético (C.A.)/Azul de Evans (A.E.) e, por fim, mensurando a viabilidade celular destas culturas, via trifeniltetrazólio (CTT). O desenvolvimento dos calos foi promissor em meio MS com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, o comportamento cinético exibiu 5 fases, exponencial (0-7 dias), linear (7-14 dias), desaceleração (14-28 dias), estacionária (28-77 dias) e declínio (77-112 dias), ao final da desaceleração, aos 28 dias, é recomendada a repicagem dos calos. Carboidratos solúveis e insolúveis não são identificados ao princípio do cultivo. Na desaceleração, observou-se picos de açúcares solúveis. Ao fim do cultivo, na fase de declínio detectou-se baixos teores de AST e picos de AR, há também a identificação do máximo teor de amido. Ao final do declínio há redução de proteínas e aminoácidos. Pela MEV entre 77 e 90 dias de cultivo, observou-se a formação de embriões em estágio globular e codiforme, mas estes não prosseguiram o desenvolvimento. O período de expressão do potencial embriogênico ocorreu de 21 aos 70 dias de cultivo e o maior índice de viabilidade no dia da inoculação e posteriormente aos 28 e 35 dias de cultivo. Os intervalos identificados como positivos pelas ferramentas acima envolveram o período de 28 dias, portanto as técnicas de MEV, MET, C.A./A.E. e CTT, respaldaram e confirmam o período de 28 dias como o mais adequado à repicagem dos calos de *J.curcas*.

Palavras chave: Cultura de tecidos, cinética, bioquímica, ultra-estrutura, citoquímica, viabilidade.

Comitê orientador: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador), Aparecida Gomes de Araujo – UFLA, Ester Alice Ferreira – EPAMIG e Leila Aparecida Salles Pio – EMBRAPA

GENERAL ABSTRACT

SANTOS, Dalilhia Nazaré dos. **Characterization of pro-embryogenic masses in physic nut (*Jatropha curcas* L.)**. 2010. 119 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is an oilseed crop that has aroused the interest of producers, governments and research institutions, to develop technology such as tissue culture, which allows its use as an agro-energy culture. Initially, we studied the relationship of growth regulators for callus induction, and from this structured on the curve of growth of callus for 16 growing seasons. For each growing season was determined the behavior of primary metabolites, carbohydrates: total soluble sugar (TSS), reducing sugar (RS) and starch protein and amino acids. It was made ultrastructural analysis in scanning electron microscopy (SEM) and transmission (TEM), evaluating the embryogenic potential by double staining carmine acid (CA) / evans blue (EB) and finally, measuring cell viability of these cultures through triphenyltetrazolium (TTC). The development of a promising callus on MS medium with 1 mg.L^{-1} 2,4-D, the kinetic behavior exhibited 5 phases, exponential (0-7 days), linear (7-14 days), deceleration (14 - 28 days), stationary (28-77 days) and decline (77-112 days) at the end of deceleration, on the 28 days, it is recommended to transplanting the callus. Soluble and insoluble carbohydrates are not identified at the beginning of cultivation. In the deceleration observed peaks of soluble sugars. After cultivation in the decline phase was detected low levels of AST and peak RS, there is also the identification of the maximum starch content. At the end of the decline is the reduction of protein and amino acids. SEM between 77 and 90 days of cultivation, we observed the formation of globular-stage embryos and codiforme, but these did not continue development. The period of expression of embryogenic potential occurred 21 to 70 days of cultivation and increased viability index on the day of inoculation and subsequently at 28 and 35 days of cultivation. The intervals identified as positive by the tools above involved the period of 28 days, so the techniques of SEM, TEM, CA / AE and CTT, have supported and confirmed the 28-day period as the most suitable for transplanting the callus *J.curcas*.

Keywords: Tissue culture, kinetics, biochemistry, ultrastructure, cytochemistry,viability

Guidance committee: Moacir Pasqual – UFLA (Advisor), Aparecida Gomes de Araujo – UFLA, Ester Alice Ferreira – EPAMIG and Leila Aparecida Salles Pio – EMBRAPA

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS EM PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.).

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde o século passado, os combustíveis derivados de petróleo têm sido a principal fonte de energia no mundo. No entanto, previsões de que esse recurso se extinga, somadas às crescentes preocupações com o ambiente, têm levado à busca de fontes de energia alternativa e renovável (Ghassan et al., 2003).

A produção de combustíveis a partir de óleos vegetais constitui uma estratégia importante, devido às dimensões territoriais brasileiras, à elevada diversidade edafoclimática, além do grande número de espécies que podem ser utilizadas (Teixeira, 2005).

Os óleos vegetais têm sido bem aceitos e utilizados na produção do biodiesel, apesar de algumas dificuldades que surgiram inicialmente devido à viscosidade natural e ao baixo poder de ignição desse material. Algumas de suas vantagens como combustível, em relação ao diesel, são: alto valor energético, baixo conteúdo de enxofre e de aromáticos, além de serem biodegradáveis e renováveis (Fangrui, 1999).

O futuro do biodiesel é função de grandes produtividades em teor de óleo pelas oleaginosas e baixos custos de produção. Abre-se, então, mercado para o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). Esta espécie é considerada uma cultura rústica, adaptada às mais diversas condições edafoclimáticas, que sobrevive bem em condições de solos marginais de baixa fertilidade natural (Arruda et al., 2004; Saturnino et al., 2005; Dias et al., 2007).

Segundo Saturnino et al. (2005), o conhecimento técnico sobre esta planta é limitado. Apesar das inúmeras características favoráveis da espécie, não se tem até o presente momento um acesso melhorado, tratos culturais completamente estabelecidos, zoneamento agrícola definido. Isto demonstra que os estudos com esta espécie são ainda insipientes.

Portanto, todos os esforços científicos são válidos para gerar conhecimento que proporcione o estabelecimento do pinhão-manso como cultura no sistema agroenergético brasileiro. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi investigar a calogênese em explantes foliares coltiledonares de pinhão-manso, bem como identificar o potencial embriogênico destes calos e o período adequado para a repicagem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Agroenergia

Iniciou-se o século vislumbrando uma revolução energética, condicionada por dois fatores. O primeiro refere-se à cadeia energética atual que é embasada em recurso não renovável (os combustíveis fósseis), esse fator condiciona sua eminente escassez, que vem elevando seu valor de mercado. Segundo Wingert (2005), na ocasião de sua pesquisa, para cada cinco barris consumidos, só um foi encontrado, daí a tendência para a alta dos preços do ouro negro. É justamente essa alta dos preços que irá retardar no tempo a escassez que era prevista para a próxima década. O segundo fator se deve às excessivas emissões de gás carbônico, que ocorrem em elevados níveis pelos combustíveis fósseis, e que vem potencializando o efeito estufa com consequências deletérias.

Na tentativa de controlar tanto o preço de mercado dos combustíveis fósseis, quanto as emissões de gás carbono que estes ocasionam, um novo padrão energético é vislumbrado na agroenergia.

A agroenergia é, de acordo com o Ministério da Agricultura, o uso da agricultura como alternativa viável, do ponto de vista econômico, social e ambiental, para a geração de energia renovável. Envolve o carvão vegetal, o etanol e os biocombustíveis.

O Brasil é um país que congrega ótimas condições para liderar o mercado agroenergético. Por localizar-se na faixa tropical e subtropical, recebe elevada incidência luminosa e a radiação solar é justamente a fonte energética que potencializa a produção de biomassa. Além disso, o país possui ampla diversidade vegetal, inclusive oleaginosas, as quais produzem insumos para geração de energia, seja o carboidrato para síntese do álcool (cana-de-açúcar, milho ou eucalipto) ou os derivados do lipídeo para a produção de biodiesel (soja, girassol, mamona ou pinhão-manso).

2.2 A espécie

O pinhão-mansô é uma oleaginosa pertencente à família Euphorbiaceae, seu gênero é o *Jatropha*, o qual possui 175 espécies. É uma planta perene, as folhas são decíduas na estação seca, ressurgindo logo após as primeiras chuvas. É considerada uma planta xerófita, com elevada resistência à seca (Arruda et al., 2004; Saturnino et al., 2005). De acordo com Severino (2006), é uma espécie que se desenvolve sob condições climáticas diversas, desde regiões tropicais muito secas a úmidas, tolerando precipitações entre 600 e 1.500 mm/ano. Com relação à altitude, é encontrado até 1.000 m, sendo o seu cultivo mais indicado em regiões que apresentem entre 500 e 800 m (Peixoto, 1973).

O pinhão-mansô é considerado como adaptado a solos de baixa fertilidade e, com relação às exigências nutricionais, foi desenvolvido um trabalho por Laviola & Dias (2008), que identificaram que o pinhão-mansô apresenta a seguinte ordem de acúmulo de nutrientes nas folhas: $N > Ca > K > Mg > P > S > Mn > Fe > B > Zn > Cu$; e nos frutos: $N > K > Ca > P \geq Mg > S > Mn > Fe > B > Zn > Cu$. A relação N/K é de 2,3 em folhas e de 1,4 em frutos, indicando que na fase em que a planta entra em produção aumenta a necessidade de K. Os autores concluíram que o pinhão-mansô extrai elevada quantidade de nutrientes na colheita. Isso indica que a planta pode sobreviver em solos pobres, mas sua boa capacidade produtiva é melhorada mediante a aplicação de fertilizante.

A capacidade produtiva do pinhão-mansô foi estudada por diversos autores ao longo do tempo em território nacional e segundo Brasil (1985), esta é função dos tratos culturais. Esse mesmo autor estudou a capacidade produtiva do pinhão-mansô, e identificou que ela varia de 3000 a 4000 Kg/ha de semente. Por ocasião próxima, Purcino & Drumommd (1986) identificaram capacidade produtiva menor, em torno de 2000 Kg/ha de semente. Mais recentemente, a

produtividade foi superiormente avaliada, em torno de 5000 Kg/ha de semente (Arruda et al., 2004; Saturnino et al., 2005; Teixeira, 2005). Em plantas com apenas 12 meses de idade foi identificada uma produtividade de 3542 Kg/ha de semente (Drumond et al., 2009). A produtividade dessas plantas é muito especulada em relação a sementes, pois estas são a fonte de lipídeos para a produção de óleo.

Diante da preocupação atual com o aquecimento global e a escassez das reservas mundiais de combustível fóssil, o pinhão-manso tem despertado interesse de produtores, governos e instituições de pesquisa (Nery et al., 2009). Desta forma, com a possibilidade do uso do óleo de pinhão-manso para a produção de biodiesel, abrem-se amplas perspectivas para o aumento das áreas de plantio com esta cultura no semi-árido nordestino (Arruda et al., 2004). Segundo o CEPEA (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada), a possibilidade de substituir o diesel, integral ou parcialmente, por óleo vegetal no uso em motores, dentre os quais os automotivos, pode levar a ganhos sócio-econômicos consideráveis, viabilizando o desenvolvimento sustentável, em especial nas comunidades rurais. Para o sucesso deste prenúncio, tecnologia agrônômica deve ser desenvolvida, visando potencializar a produção de matéria prima, por procedimentos sustentáveis.

2.3 Cultura de tecidos aplicada ao pinhão-manso

A cultura de tecidos se configura como uma tecnologia agrônômica, pois possibilita a produção de biomassa em grande escala, curto espaço de tempo e pequeno espaço físico.

Os primeiros relatos do cultivo do pinhão-manso *in vitro* se dão com Sujatha & Mukta (1996), que testaram diversos explantes, dentre eles folhas, hipocótilo e pecíolo em 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (benzilaminopurina) e 1,0 mg.L⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico), obtendo como resposta 100% de regeneração dos

explantes foliares, 62% de regeneração com o explante hipocótilo, e para pecíolo, 67% de regeneração. Bons resultados foram obtidos para a organogênese em explantes foliares cotiledonares de pinhão-manso, em trabalho conduzido por Deore & Johnson (2008), os quais usaram 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ (thidiazuron), 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico), alcançando 53,5% de regeneração de brotos, sem passar pela fase de calo. No mesmo período, Li et al. (2008) também regeneraram brotos, mas por via calogênica, usando como explante cotilédones de plantas adultas, com 1.5 mg.L⁻¹ de BAP, 0.05 mg.L⁻¹ de AIB e 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ (ácido giberélico).

Com relação à embriogênese somática, Sardana et al. (2000) utilizou 3,0 mg.L⁻¹ de BAP e 3,0 mg.L⁻¹ de AIA (ácido indol-3-acético), mas sem nenhuma frequência de regeneração. Entretanto Jha et al. (2007), trabalhando com a espécie *J. curcas*, obtiveram sucesso com embriogênese somática, 90% dos embriões somáticos foram convertidos em plântulas. Neste trabalho foram utilizadas como explantes folhas, das quais, 56% se diferenciaram em calos embriogênicos, na presença de 0,5 mg.L⁻¹ de KN (Cinetina) e 0,2 mg.L⁻¹ de AIB, e para a maturação dos embriões foi utilizado 5,0 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina.

No Brasil ainda não há publicações brasileiras que relatem a embriogênese somática ou organogênese em pinhão-manso. O trabalho mais recente se trata do cultivo *in vitro* com a espécie, porém, investigando diferentes suplementos para a cultura de embriões (Nunes et al., 2008). O que já representa um grande avanço, pois primeiramente é necessário o estabelecimento *in vitro* da espécie, para posteriormente, ajustar a ela as demais técnicas que a cultura de tecidos dispõe. Portanto, trabalhos nacionais que visem o estabelecimento de protocolos das diferentes formas de propagação *in vitro* para esta espécie são necessários. Afinal, após seleção de plantas elites de pinhão-manso, estas poderão ser propagadas em escala comercial, com auxílio de técnicas de cultura

de tecidos associada a biorreatores, visando à rápida disponibilização de mudas uniformes, com qualidade genética e fitossanitária (Marques & Ferrari, 2008).

Como demonstrado, a técnica de cultura de tecidos têm incrementado as pesquisas, básica e aplicada, em plantas superiores (Costa, 1995). Numa visão mais minuciosa, a cultura de tecidos é ferramenta que gera conhecimento, ela possui diversos mecanismos que podem ser utilizados, em estudos de fisiologia do desenvolvimento da espécie, como é o caso da calogênese.

2.4 Curva de Crescimento de calos

Calo é um grupo ou massa de células com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação (Torres et al., 2000). O calo é uma resposta morfológica da planta a uma injúria que lhe é causada. *In vitro*, tal resposta se dá por injúria a um tecido, seja de forma física ou química, podendo ocasionar uma diferenciação, que é o objeto de estudo. Essa diferenciação será potencializada quanto mais juvenil for o tecido, pois este possui regiões meristemáticas as quais tem maior capacidade de expressão da totipotencialidade. Também influenciam na calogênese a composição do meio de cultura e os reguladores de crescimento. Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e citocinina no meio de cultura promovem a formação de calos, mas esse efeito varia em função do balanço hormonal endógeno de cada explante (Pierik, 1990).

O protocolo de calogênese pode ser usado para ampliação de conhecimentos de fisiologia do desenvolvimento da espécie, através da técnica da curva de crescimento de calos. A curva é de extrema importância para identificar as distintas fases do crescimento do calo, podendo-se presumir assim o momento adequado de repicagem dos explantes potencializando sua morfogênese.

Segundo Smith (1992), a curva de calos exibe cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. Essas cinco fases normalmente se congregam num comportamento sigmóidal e o platô final dessa sigmóide representa a fase estacionária. Nessa fase, as células não estão mais em divisão celular, por isso o crescimento se estabiliza. Portanto, se o objetivo é a multiplicação do explante, a repicagem não deve ultrapassar essa fase, pois a multiplicação demanda alta divisão celular.

O cessar de crescimento na fase estacionária pode ser devido a uma característica da espécie, ou devido à carência nutricional. De qualquer forma, denota que o explante está necessitando de um novo estímulo para continuar se desenvolvendo. Portanto, este é um bom momento, seja para a repicagem do calo a um novo meio ou para a transferência de massas embriogênicas para meios de conversão de embriões.

A curva de crescimento de calo é objeto de estudo em diversas lenhosas, como café (Santos et al., 2003), detectado o crescimento tipo sigmóide, mas somente com três fases distintas: lag (0 - 42 dias de inoculação), exponencial (42 - 77 dias) e linear (77 - 84 dias). Já Pereira et al. (2007) pesquisaram a curva de calo em função de diferentes reguladores em unha-de-gato e identificaram comportamento diferente quanto à estabilização para cada regulador (picloram - 25 dias de cultivo e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), ANA (ácido nafataleno acético) e AIB - 30 dias de cultivo), mas identificaram sempre uma sigmóide. Abbade (2008), em trabalho com ipê-branco, identificou uma sigmóide com cinco fases distintas e recomenda a repicagem aos 60-75 dias. Nogueira et al. (2008) identificaram uma curva de crescimento padrão sigmóide e seis fases distintas de crescimento em murici-pequeno, com repicagem aos 60 dias.

As repostas obtidas com a curva de crescimento de calo podem ser potencializadas se a técnica for associada a outras ferramentas do conhecimento

como análises bioquímicas, citoquímicas, microscopia eletrônica e viabilidade celular.

2.5 Aspectos bioquímicos

Os compostos orgânicos são essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, dentre eles os lipídeos, os carboidratos, as proteínas e os aminoácidos. A extração e isolamento destas moléculas da sua fonte biológica são essenciais para a compreensão do metabolismo dos vegetais, seja a nível *ex* ou *in vitro*.

Durante o crescimento e o desenvolvimento dos calos ocorrem mudanças bioquímicas nas células e o estudo dessas mudanças fornecem subsídios aos processos de estabelecimento *in vitro*, propiciando a otimização das condições de cultivo (Abbade, 2008).

Os carboidratos abrangem um dos maiores grupos de compostos orgânicos encontrados na natureza e juntamente com as proteínas formam os constituintes principais dos organismos vivos (Bobbio & Bobbio, 1989).

O estudo dos carboidratos permite verificar se a fonte de açúcares adicionada ao meio de cultura está sendo absorvida pelo explante ou permite identificar em qual fase há maior absorção desses açúcares. Essa fase de maior demanda por carboidrato representa o período de maior respiração do explante e é nesta fase, portanto, que o complexo celular está metabolicamente mais ativo, representado aqui pelo maior consumo de energia. Períodos de baixo consumo de açúcares podem ser entendidos como explante em baixa atividade, seja pela não iniciação de seu metabolismo caso seja recém inoculado ou caso já tenha decorrido um tempo de cultivo, representando a senescência da cultura. Vale ressaltar que o comportamento é variável em função da espécie e do tipo de explante. É perfeitamente comum se encontrar elevado teor de açúcar em explantes recém inoculados, exemplo dado por Nogueira et al. (2008), após

quantificação de açúcares em calos de murici-pequeno. Essas inferências são feitas pela quantificação do teor de carboidrato nos tecidos, seguindo metodologia específica em função do tipo de açúcar.

Os açúcares são distinguidos em redutores, não redutores e totais. Os redutores são aqueles que possuem o grupamento carbonila de sua molécula livre ($\overset{|}{\text{C}}=\text{O}$), um exemplo são glicose e frutose. Se glicose e frutose estiverem unidas, o grupamento carbonila estará envolvido para união de ambas as moléculas, formando assim a sacarose. Devido a este fato, diz-se que o grupamento carbonila está preso, constituindo a sacarose como um açúcar não redutor. A soma de açúcares redutores e não redutores são os chamados açúcares solúveis totais. A característica redutora ou não redutora é relevante, porque é justamente essa característica de oxidação-redução que permite a quantificação dos açúcares.

Com relação às proteínas, sabe-se que estas desempenham papéis extremamente importantes, na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através das membranas celulares e outros (Ganong, 1995).

Para que as proteínas possam ser estudadas adequadamente, faz-se necessária uma avaliação quantitativa destas no material desejado, e só então é possível prosseguir com estudos qualitativos de tal material ou amostra. Segundo Zaia et al. (1998), o desenvolvimento de metodologias e estudos para a determinação de proteínas totais sempre foi de grande interesse para profissionais, tanto ligados à indústria de alimentos, laboratórios de análises clínicas, como para pesquisadores de diversas áreas inclusive relacionadas aos vegetais.

Uma forma de quantificação de proteínas é a utilização do corante “Comassie brilliant blue” G-250 (BG-250). Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e as macromoléculas de proteínas, as quais contêm

aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante G-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Zaia et al., 1998).

Assim como os carboidratos, as proteínas também influenciam nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos, pois segundo Castro et al. (2009), quando ocorre a replicação do DNA há a síntese de RNAm para proteínas utilizadas na divisão celular. Sendo assim, pela observação da concentração protéica no tecido estudado, inferências com relação à iniciação do ciclo celular da espécie podem ser realizadas.

Como as proteínas são moléculas constituídas por polímeros de aminoácidos, a quantificação destes torna as inferências mais precisas. Os aminoácidos podem ser quantificados pelo método da Ninhidrina, que se baseia na desaminação oxidativa dos aminoácidos, liberando amônia e reduzindo a ninhidrina a hidrindantina, que posteriormente forma um complexo de coloração roxa (DYDA) com a amônia liberada, que é absorvida no comprimento de onda de 570nm. A coloração roxa é específica para todos os aminoácidos, exceto para a prolina e hidroxiprolina (Stein & Moore, 1948).

Ronchi et al. (1984), trabalhando com explantes de hipocótilo da variedade de cenoura S. Valery, verificaram o efeito marcante dos aminoácidos prolina e serina no aumento de divisões mitóticas e produção de embriões no meio de cultura contendo 2,4-D em diversas concentrações. Maior número e melhor qualidade de embriões somáticos também foram observados por (Higashi et al., 1997), devido à adição dos aminoácidos L-glutamina, ácido L-glutâmico e α -alanina, ao meio.

Assim, fica demonstrado o papel dos carboidratos, proteínas e aminoácidos como compostos orgânicos influentes nos processos de

crescimento e desenvolvimento *in vitro*, e a necessidade de sua quantificação para inferências sobre o comportamento fisiológico destes.

2.6 Caracterização citoquímica

Diversas são as maneiras de identificação da expressão morfogenética que ocorrem na cultura em estudo. Se o intuito é a identificação de embriogênese somática, pode-se usar aspectos morfológicos. Em modelos diretos, a primeira expressão morfogenética é o surgimento de estruturas globulares brancas e translúcidas que correspondem a embriões somáticos globulares. Em modelos indiretos, inicialmente há a diferenciação de calo e o surgimento neste de setores friáveis, normalmente brancos e translúcidos, convencionalmente designados de massas ou complexos celulares pró-embriogênicos, os quais se dividem para formar pró-embriões somáticos (Guerra et al., 1999).

As chamadas massas pró-embriogênicas (MPE) são, de acordo com Xu & Huang (2008), aglomerados celulares capazes de produzir embriões somáticos e possuem como característica células de tamanho reduzido e um denso citoplasma (Fehér et al., 2003). Segundo Castro et al. (2009), tais características também são inerentes às células meristemáticas.

De acordo com Castro et al. (2009), a morfologia típica de células meristemáticas são, dentre outras: células pequenas, isodiamétricas, homogêneas, parede celular apenas primária e extremamente delgada, citoplasma denso e vacúolo pequeno. Os autores analisam a relação morfologia/função da seguinte forma: tamanho pequeno possibilita maior número de células por volume de tecido e divisões celulares mais rápidas, o que otimiza a função primordial dos meristemas; células isodiamétricas otimizam as divisões pois o sentido não afetará a eficiência das mesmas, já que não existe um eixo celular maior que o outro; parede celular delgada é primordial, pois se espessas e

lignificadas podem dificultar as divisões celulares, assim a delgada facilita as divisões e ainda o maior influxo de nutrientes, sem o qual as células morreriam de exaustão; e o vacúolo pequeno possibilita maior espaço para as organelas que são estruturas a serem replicadas nas divisões.

Além das características morfológicas citadas, as massas calosas e pró-embriônicas podem ser distinguidas por características citoquímicas. Steiner et al. (2005) afirmam que o uso dos corantes Carmim acético e Azul de Evans possibilitam a diferenciação de culturas embriônicas. Células que reagem fortemente ao Carmim acético e fracamente ao Azul de Evans são embriogênicas e células com reação fraca ao primeiro e intermediária ao segundo são células calosas.

Esta distinção é possível pois as células embriônicas que apresentam citoplasma denso são isodiamétricas e reativas ao Carmim acético, resultando em coloração avermelhada. Associa-se essa reação com a competência celular para o desenvolvimento embriônico e integridade cromossômica (Durzan, 1988; Steiner et al., 2005; Munhoz et al., 2008). Já o Azul de Evans age penetrando através de rupturas da membrana, de células que estão em processo de morte celular ou, segundo Silva & Yuffá (2006), células já mortas. Células com sinais de morte celular têm alto grau de vacuolização, e esta vacuolização configura a célula formato alongado (Filonova et al., 2000; Bhargava et al., 2007).

2.7 Caracterização ultraestrutural

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) foi introduzido como instrumento de pesquisa por volta de 1950 e sua utilização trouxe contribuições marcantes ao conhecimento humano ao mostrar detalhes jamais antes visualizados na área biológica e de ciências de materiais. Praticamente na mesma época do desenvolvimento do MET surge o microscópio eletrônico de

varredura (MEV), o qual causou uma segunda revolução no estudo do mundo microscópico, devido às suas características como alta profundidade de campo, conferindo aspecto tridimensional às imagens, larga gama de aumento, rápida digitalização do sistema na captação de imagens, além das facilidades de operação e preparação da amostra, que tornaram esse aparelho extremamente popular (Bossola & Russell, 1998; Souza, 1998; Alves, 2004).

Portanto, a microscopia eletrônica é empregada há décadas como ferramenta habilitada para quantificar e mensurar estruturas superficiais e/ou internas, a exemplo das células animais e vegetais. Segundo Nogueira et al. (2008), as análises ultraestruturais, através da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, têm sido utilizadas em vários estudos de embriogênese somática para fornecer maiores detalhes da morfologia interna e externa de tecidos embriogênicos. Como relatado em *Carya illinoensis* (Almeida, 2002), *Theobroma grandiflorum* (Ferreira et al., 2005) ou *Araucaria angustifolia*, *Pinus sylvestris* e *Picea abies* (Steiner, 2009).

2.8 Viabilidade celular

Segundo Silva & Yuffá (2006), a estimativa da viabilidade é necessária para avaliar as condições da cultura. Dentre as diversas metodologias adotadas para se medir a viabilidade celular de tecidos, optou-se por quantificar a atividade respiratória destes, como inferência à viabilidade celular, por meio do teste de tetrazólio.

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases (Moore, 1973), as quais catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Estas enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5- cloreto de trifetil tetrazólio ou CTT) nos tecidos vivos. Quando uma semente é imersa na solução incolor de CTT, este é difundido através dos tecidos, ocorrendo nas

células vivas a reação de redução que resulta na formação de um composto vermelho, estável e não-difusível, conhecido por trifenilformazan (França Neto et al., 1998; Verleysen et al., 2004), o mesmo se aplica a calos.

Quando o CTT é reduzido, formando o trifenilformazan, isto indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade celular no tecido estudado. Portanto, a coloração resultante da reação é uma indicação positiva da viabilidade através da detecção da respiração a nível celular. Tecidos não viáveis não reagem e conseqüentemente não são coloridos. Sendo o tecido vigoroso, haverá a formação de um vermelho carmin claro; se o tecido está em deterioração, um vermelho mais intenso será formado, em virtude da maior intensidade de difusão da solução de CTT pelas membranas celulares comprometidas de tais tecidos; se o mesmo é não viável, a redução do sal não ocorrerá, e o tecido morto contrastará como branco (França Neto et al., 1998). As observações de tais diferenças de cor permitem a determinação da presença, da localização e da natureza dos distúrbios que podem ocorrer nos tecidos embrionários (Moore, 1973), ou tecidos somáticos, a exemplo de calos embriogênicos, aplicando-se também a não somáticos, como calos organogênicos.

De acordo com Mikula et al. (2006), o teste de viabilidade celular mediante o uso do CTT foi primeiramente utilizado em sementes. A descrição do uso deste no cultivo *in vitro* teve seu primeiro relato por Stein & Gerarde (1950) e posteriormente Towill & Mazur (1975). Hoje, o teste é amplamente utilizado, inclusive para a avaliação da viabilidade celular em massas pró-embriogênicas, como descrito por Silva (2009) em murici-pequeno.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADE, L. C. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco**. 2008. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ALMEIDA, W. A. B. de; NOGUEIRA, N. de N.; ROSSI, M. L.; RODRIGUEZ, A. P. M. Anatomia e ultra-estrutura de embriões somáticos de pecan (*carya illinoensis*). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 14, n.1, p. jan./jun. 2002. Disponível em: <<http://www.magistra.ufrb.edu.br/publica/magist14/02-14-06c.html>>. Acesso em: 13 set. 2009.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2004. 43 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, jan./abr. 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **The seed vigor test committee: seed vigor testing handbook**. Lincon, 1983. 88 p.

BHARGAVA, A.; OSUKY, M.; FORWARD, B. S.; HANCOCK, R. E.; KAY, W. W.; MISRA, S. Expression of a polyphemusion variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and virus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 88, n. 3, p. 301-312, Mar. 2007.

BOBBIO, F.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1989.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2. ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretária de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília: STI/CIT, 1985. 364 p.

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

COSTA, M. P. da. **Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação**. 1995. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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**, Japan, v. 2, n. 1, p. 7-11, Apr. 2008.

DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI FILHO, A.; PEREIRA, O. L.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S.; SOUSA, L. C. A.; OLIVEIRA, T. S.; DIAS, D. C. F. S. **Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007. v. 1, 40 p.

DRUMOND, M. A.; SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. de; MARTINS, J. C.; ANJOS, J. B. dos; EVANGELISTA, M. R. V. Desempenho agrônomo de genótipos de pinhão manso no Semi-árido pernambucano. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 44-47, jan./fev. 2009.

DRUMMOND, O. A. **Cultura do pinhão-manso**. Belo horizonte: EPAMIG, 1984. 99 p.

DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: FRANS SYMPOSIUM DEPARTMENT OF FOREST GENETICS AND PLANT PHYSIOLOGI, 8., 1998, Swedish. **Proceedings...** Swedish: University of Agricultural Sciences, 1988. p. 147-186.

FANGRUI, M.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, n. 1, p. 1-15, Oct. 1999.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, Sept. 2003.

FERREIRA, M. das G. R.; CARVALHO, C. H. S. de; CARNEIRO, A. de A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 500-503, dez. 2005.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; ARNOLD, S. V. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 343, p. 249-264, Feb. 2000.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. **O teste do tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 1998. 72 p. (Documentos, 116).

GANONG, W. F. **Review of medical physiology**. 17. ed. San Francisco: Prentice-Hall, 1995.

GHASSAN, T. Q.; MOHAMAD, I.; AL-WIDAN, B.; ALI, O. A Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace. **Applied Thermal Engineering**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 285-293, Feb. 2003.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1999. v. 2, p. 533-568.

HIGASHI, K.; KAMADA, H.; HARADA, H. The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 45, n. 2, p. 109-114, May 1997.

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

LAVIOLA, B. G.; DIAS, L. A. dos S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, n. 5, p. 1969-1975, set./out. 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 Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 2, p. 173-181, Feb. 2008.

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, jul./dez. 2008.

MIKULA, A.; NEIDZIELSKI, M.; RYBCZNSKI, I. J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana spp.* Cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 28, n. 4, p. 331-324, Aug. 2006.

MOORE, R. P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. (Ed.). **Seed ecology**. London: Butterworth, 1973. v. 14, p. 347-366.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; MEISSNER FILHI, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, jun. 2008.

NERY, A. R.; RODRIGUES, L. N.; SILVA, M. B. R.; FERNANDES, P. D.; CHAVES, L. H. G.; DANTAS NETO, J.; GHEYI, H. R. Crescimento do pinhão-manso irrigado com águas salinas em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 5, p. 551-558, out. 2009.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E. B.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, out. 2008.

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

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 284 p.

- PEREIRA, R. de C.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; BERTOLLUCI, S. K. V. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *uncaria guianensis* J. F. GMEL. (unha de gato). **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 69-77, dez. 2007.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Martins Nijoff, 1990. 326 p.
- PURCINO, A. A. C.; DRUMMOND, A. O. **Pinhão manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1986. 7 p.
- RONCHI, V. N.; CALIGO, M. A.; NOZZOLINI, M.; LUCCARINI, G. Stimulation of carrot somatic embryogenesis by proline and serine. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 3, n. 5, p. 210-214, Oct. 1984.
- SANTOS, C. G. dos; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar RUBI. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 571-577, maio/jun. 2003.
- SARDANA, J.; BATRA, A.; ALI, D. J. An 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.
- SEVERINO, L. S. **Viagem à Índia para prospecção de tecnologia sobre mamona e pinhão-manso**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 56 p. (Documento, 153).
- SILVA, L. C. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de murici-pequeno**. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SILVA, R. F. da; YUFFÁ, A. M. Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 9, n. 5, p. 593-597, Oct. 2006.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic, 1992. 171 p.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998. 179 p.

STEIN, R. J.; GERARDE, H. W. Triphenyltetrazolium chloride in tissue culture. **Science**, Washington, v. 111, n. 2895, p. 691, June 1950.

STEIN, W.; MOORE, S. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 176, n. 2, p. 367-372, Nov. 1948.

STEINER, N. **Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* (Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK**. 2009. 74 p. Tese (Doutorado Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba v. 48, n. 6, p. 895-903, nov. 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, Feb. 1996.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 18-27, 2005.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.; SÁ, M. F. G. de; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M.; PINHO, E. R. C. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TOWILL, L. E.; MAZUR, P. Studies on reduction of 2,3,5 – triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 53, n. 1/2, p. 1097-1102, Jan. 1975.

VERLEYSSEN, H.; SAMYN, G.; BOCKSTAELE, E. van; DEBERGH, P.
Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, v. 77, n. 1, p. 11-21, Apr.
2004.

WINGERT, J. L. **La vie après le pétrole, de la pénurie aux énergies
renouvelables**. Paris: Autrement, 2005.

XU, C.; HUANG, B. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis*
grass species contrasting in heat tolerance. **Journal of Experimental Botany**,
New Brunswick, v. 59, n. 15, p. 4248-4294, Nov. 2008.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas
totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes.
Química Nova, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 187-793, nov. 1998.

CAPÍTULO 2

ESTABELECIMENTO, ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E CITOQUÍMICA DE CALOS DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.) EM RESPOSTA A DIFERENTES BALANÇOS ENTRE CITOCININAS E AUXINAS

1 RESUMO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) tem estudos recentes e ainda insuficientes. A cultura de calos é uma técnica utilizada para estudar o crescimento e o desenvolvimento de plantas. No intuito de contribuir para com este conhecimento, objetivou-se cultivar segmentos foliares de pinhão-manso visando desenvolver protocolo para calogênese da espécie mediante diferentes concentrações de reguladores. Os explantes foram inoculados em meio MS, suplementado com fitoreguladores, nas seguintes combinações: (1) testemunha; (2) 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D; (3) 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D; (4) 1,0 mg.L⁻¹ PIC; (5) 2,0 mg.L⁻¹ PIC; (6) 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.L⁻¹ KIN; (7) 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ KIN; (8) 1,0 mg.L⁻¹ PIC + 0,5 mg.L⁻¹ KIN; (9) 2,0 mg.L⁻¹ PIC + 1,0 mg.L⁻¹ KIN; (10) 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.L⁻¹ BAP; (11) 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ BAP; (12) 1,0 mg.L⁻¹ PIC + 0,5 mg.L⁻¹ BAP; (13) 2,0 mg.L⁻¹ PIC + 1,0 mg.L⁻¹ BAP. Constituiu-se assim o delineamento inteiramente casualizado com 13 tratamentos e 4 repetições de 3 tubos cada. As avaliações foram feitas após 30 e 60 dias de cultivo, referentes à porcentagem de cobertura dos explantes por calos e porcentagem dos explantes formadores de calos. Também foi feita análise via microscopia eletrônica de varredura (MEV) e dupla coloração com carmim acético e azul de evans. Aos 30 e 60 dias, a porcentagem de explantes formadores de calos não diferenciaram estatisticamente. Já a cobertura dos explantes por calos foi mais significativa sob efeito de 2,0 mg.L⁻¹ de PIC aos 30 dias, resposta que não foi observada aos 60, pois os tratamentos não diferenciaram estatisticamente. De forma secundária, mas não menos importante, se equivaleram outros balanços como 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Apesar de 2,0 mg.L⁻¹ de PIC se configurar como a melhor resposta estatisticamente, esta não o é morfogeneticamente. Calos cultivados com 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D tiveram desenvolvimento estrutural mais adequado, sendo 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D o tratamento que apresentou melhor potencial morfogenético, comprovado pela análise em MEV e pela dupla coloração com Carmim acético/Azul de evans.

Palavras Chave: embriogênese, reguladores de crescimento, microscopia.

2 ABSTRACT

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) recent studies have and still insufficient. The callus culture is a technique used to study the growth and development of plants. In order to contribute to this knowledge, aimed to cultivar leaf segments of physic nut in order to develop protocol for callus induction of the species by different concentrations of regulators. The explants were inoculated on MS medium supplemented with growth regulators, in the following combinations: (1) control, (2) 1.0 mg.L⁻¹ 2,4-D, (3) 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D, (4) 1.0 mg.L⁻¹ PIC; (5) 2.0 mg.L⁻¹ PIC; (6) 1.0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0, 5 mg.L⁻¹ KIN, (7) 2.0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg.L⁻¹ KIN, (8) 1.0 mg.L⁻¹ PIC + 0, 5 mg.L⁻¹ KIN; (9) 2.0 mg.L⁻¹ PIC + 1.0 mg.L⁻¹ KIN; (10) 1.0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0, 5 mg.L⁻¹ BAP; (11) 2.0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg.L⁻¹ BAP; (12) 1.0 mg.L⁻¹ PIC + 0, 5 mg.L⁻¹ BAP; (13) 2.0 mg.L⁻¹ PIC + 1.0 mg.L⁻¹ BAP. Constituted as a completely randomized design with 13 treatments and 4 replicates of 3 tubes each. Evaluations were made after 30 and 60 days of cultivation, on the percentage of coverage of explants for callus and percentage of explants forming callus. Also analysis was performed through scanning electron microscopy (SEM) and double staining with Carmine acetic and Evans blue. At 30 and 60 days, the percentage of explants forming callus did not differentiate statistically. Since the coverage of explants for callus was higher under the effect of 2.0 mg.L⁻¹ PIC to 30 days, no response was observed at 60, because treatments did not differentiate statistically. In a secondary, but not least, was similar to other items as 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹ 2,4-D. Although 2.0 mg.L⁻¹ PIC is set as the best answer statistically, this is not the morphogenetic. Calli grown with 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹ 2,4-D had the most appropriate structural development, and 1.0 mg.L⁻¹ 2,4-D treatment showed the best potential morphogenetic evidenced by SEM analysis and by double staining with Carmine acetic/Evans blue.

Key-words: embryogenesis, growth regulators, microscopy.

3 INTRODUÇÃO

A demanda bioenergética atual é eminente e sem precedentes. Para suprir tal necessidade busca-se o cultivo de oleaginosas como o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). O pinhão-manso apresenta como pontos favoráveis à sua produção a síntese de óleo não comestível, não desviando uma fonte de alimento para produção de energia. Seu rendimento é relevante, em torno de 5000 Kg/ha de semente (Arruda et al., 2004; Teixeira, 2005)

O pinhão-manso, apesar de ser uma alternativa promissora e comercialmente viável à produção de biodiesel, é uma espécie ainda rústica, que tem estudos recentes e ainda insuficientes. Uma técnica a ser utilizada, que pode ampliar conhecimentos, é a cultura de tecidos vegetais, seja por seu uso como ferramenta na transformação genética de plantas, regenerando órgão e tecidos de plantas transgênicas; ou por esclarecer aspectos de fisiologia do desenvolvimento das plantas, através da técnica de calogênese.

A calogênese é uma técnica utilizada para estudar o crescimento e o desenvolvimento de calos, além de ser comumente empregada para viabilizar mecanismos de propagação, seja pela rota organogênica ou pela embriogênica.

Para a proliferação de calos por qualquer uma destas rotas morfogênicas é necessária a utilização de fitorreguladores, que atuem na retomada mitótica de tecidos diferenciados, modificando o metabolismo celular quiescente em um metabolismo ativo (Kielse et al., 2007). Essa reiniciação do metabolismo é possível porque os fitorreguladores agem de forma semelhante aos fitohormônios que são compostos químicos endógenos, ambos são facilmente transportados para células responsivas. Estas células responsivas são aquelas que possuem receptores para os fitohormônios, havendo o reconhecimento do sinal hormonal, o qual é traduzido em eventos bioquímicos e fisiológicos. Tudo isso se dá porque os fitohormônios estão diretamente

envolvidos com o controle da atividade gênica a nível de transcrição e tradução, em diversos processos (Guerra et al., 1999).

Dentre as classes dos fitorreguladores, citocininas e auxinas, o balanço adequado entre estas é de extrema importância. Apesar de já ter sido observado que o balanço para indução de calogênese pode ser obtido somente mediante uso de auxinas, quando foi adicionado citocinina houve incremento na proliferação de calos (Tisserat, 1985).

As auxinas estão envolvidas na indução e na iniciação de embriões somáticos. O processo de iniciação é verificado ao se cultivar o explante em meio com concentração relativamente elevada de 2,4-D, o subsequente desenvolvimento destes embriões ocorre após transferência do calo para meio com baixa concentração ou mesmo ausência de auxinas, pois o 2,4-D inibe o desenvolvimento dos embriões. Já as citocininas podem favorecer a produção de calo embriogênico e, na maioria das culturas de células de dicotiledôneas, baixas concentrações de citocininas são necessárias para a embriogênese somática (Guerra et al., 1999).

Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na indução de calos destacam-se como auxina o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Nogueira et al., 2007), mas outras como o Picloram (ácido 4-amino-3,5,6- tricloropicolínico) são constantemente utilizadas (Péran-Quesada et al., 2004). A cana-de-açúcar, espécie que também é largamente utilizada como insumo aos biocombustíveis, tem em seu protocolo de regeneração *in vitro* o uso de 2,4-D (Gallo-Meagher et al., 2000) ou de Picloram (Fitch & Moore, 1990). O 2,4-D é o regulador comumente utilizado na obtenção de calos embriogênicos (George et al., 2008). Jha et al. (2007) obteve como melhor resposta à produção de calos embriogênicos de *J. curcas* a utilização das combinações entre AIB e Cinetina.

Para a identificação e confirmação deste potencial regenerativo, algumas ferramentas podem ser utilizadas. As análises ultraestruturais têm sido utilizadas

em vários estudos de embriogênese somática, para fornecer maiores detalhes da morfologia externa e interna de tecidos embriogênicos (Nogueira et al., 2007) e os corantes carmim-acético e azul-de-evans possibilitam a diferenciação de culturas embriogênicas (Steiner et al., 2005).

A utilização de técnicas citoquímicas permite a diferenciação de massas pró-embriogênicas, uma vez que as células dos calos podem se apresentar sob duas conformações morfológicas diferentes. Existem células que são pequenas e isodiamétricas e que por característica possuem citoplasma denso, permitindo que sejam mais reativas ao carmim acético (George et al., 2008) e, para Steiner et al. (2005), células de citoplasma denso são consideradas embriogênicas. As demais são alongadas devido à alta vacuolização que possuem e essas células vacuoladas não são embriogênicas e são permeáveis ao azul de evans, pigmentando-se, portanto, de azul (Suarez et al., 2004).

Valente (2007) utilizou-se da dupla coloração carmim acético/azul de evans para caracterização mitocondrial em *Araucaria angustifolia*. Silva (2009) se utilizou do mesmo sistema para identificar o potencial embriogênico em três subcultivos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).

Mediante o exposto, objetivou-se, com o presente trabalho, desenvolver calogênese a partir de explantes foliares cotiledonares de *Jatropha curcas* L., por submissão destes a diferentes balanços entre reguladores de crescimento, bem como identificar o potencial embriogênico dos calos obtidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

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 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 foram estabelecidas *in vitro* e, para tal, tiveram o tegumento removido por meio de choque mecânico e em seguida foram submetidas ao procedimento de assepsia, que constituiu-se de 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. Ao fim, os agentes desinfestantes foram lixiviados por tríplice lavagem em água destilada estéril.

Após assepsia em câmara de fluxo laminar, os endospermas das sementes foram separados longitudinalmente pela região oposta à micrópila. Os embriões excisados foram colocados individualmente em tubos de ensaio de 25x150 mm, contendo 15 mL do meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), onde permaneceram até obtenção de uma plântula com os cotilédones foliares totalmente expandidos.

As folhas cotiledonares foram seccionadas com tamanho médio de 1cm² através de bisturi, em ambiente estéril na câmara de fluxo laminar. Essas seções constituíram os explantes que foram inoculados em meio MS, suplementado com fitorreguladores, nas seguintes combinações: (1) testemunha; (2) 1,0 mg.L⁻¹

2,4-D; (3) 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D; (4) 1,0 mg.L⁻¹ PIC; (5) 2,0 mg.L⁻¹ PIC; (6) 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.L⁻¹ KIN; (7) 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ KIN; (8) 1,0 mg.L⁻¹ PIC + 0,5 mg.L⁻¹ KIN; (9) 2,0 mg.L⁻¹ PIC + 1,0 mg.L⁻¹ KIN; (10) 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.L⁻¹ BAP; (11) 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ BAP; (12) 1,0 mg.L⁻¹ PIC + 0,5 mg.L⁻¹ BAP; (13) 2,0 mg.L⁻¹ PIC + 1,0 mg.L⁻¹ BAP.

Em comum aos tratamentos, o meio MS foi preparado com adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 5,5 g.L⁻¹ de ágar, antecipadamente à autoclavagem que ocorreu a 121°C por 20 min a 1 atm. Posteriormente, as culturas foram acondicionadas em armário de metal, propiciando a ausência de luz, em sala de crescimento a 25±2°C.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 13 tratamentos e 4 repetições de 3 tubos cada. As avaliações referentes à porcentagem de cobertura dos explantes por calos (%CEC) foram realizadas após 30 e 60 dias, por intermédio do teste Scott-Knott t, via Software Sisvar (Ferreira, 2000) e porcentagem dos explantes formadores de calos (%EFC), que foi realizada somente de forma descritiva. Ambas as avaliações foram efetuadas por meio de pontuações (0 – 0% por cento de formação ou cobertura do explante calos, 1 – 50% por cento de formação ou cobertura do explante calos e 2 – 100% por cento de formação ou cobertura do explante calos), realizadas de forma subjetiva. A %CEC pode ser visualizada pela figura 1.

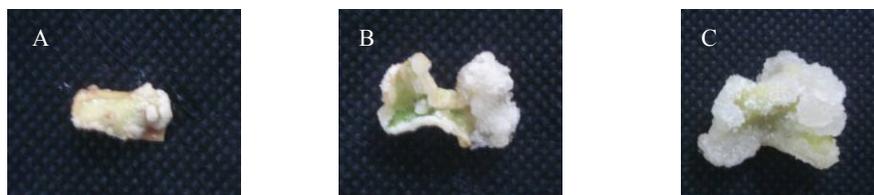


FIGURA 1 Aspecto visual de explantes foliares de *Jatropha curcas* L., com suas respectivas pontuações. A- Nota 0 - 0 % de cobertura do explante por calo. B- Nota 1 - 50 % de cobertura do explante por calo. C- Nota 2 - 100 % de cobertura do explante por calo.

Para elucidação da natureza morfo genética dos calos obtidos, amostras dos mesmos foram coletadas e desidratadas em série etanólica crescente, utilizando-se ponto crítico (Horridge & Tamm, 1969); em seguida foram metalizadas e observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo Zeiss DSM 940, localizado no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Ainda foi realizada uma análise citoquímica de uma fração do material regenerado. Assim, coletaram-se frações de 100mg de calos de cada tratamento, macerando-os sobre vidro de relógio com auxílio de bastão. A este macerado adicionaram-se três gotas do corante azul de evans 0,1% por três minutos, seu excesso foi retirado e adicionadas três gotas do corante Carmim acético 2% pelo mesmo tempo (Valente, 2007). Ao término montaram-se lâminas e destas fez-se fotomicrografias em microscopio de luz Olympus BX 60 com objetiva de 10x, utilizando-se máquina fotográfica digital acoplada ao microscópio, localizado no Laboratório de Anatomia do Departamento de Biologia da UFLA. A análise das imagens foi realizada pela técnica RGB (Red, Green, Blue) e por meio da ferramenta histograma do Software *Adobe® Photoshop® CS3* versão 10.0.

A análise computacional RGB aplicada à citoquímica permite a identificação de diversas cores através das cores básicas iniciais: vermelho (Red), verde (Green) e azul (Blue). Computacionalmente, cada cor é representada por números, ou seja, bits. Cada 8 bits constitui um byte, o byte é usado em sistema binário (2^8), permitindo 256 combinações: preto é ausência de cor ou (0, 0, 0) enquanto branco é o conjunto de todas as cores ou (256, 256, 256).

Apesar de o Software analisar três intensidades de cores (vermelho, verde e azul), a análise estatística foi realizada somente com vermelho e azul, pois estes são os matizes resultantes dos corantes utilizados. Esta estatística também foi avaliada por intermédio do teste Scott-Knott t, pelo Software *Sisvar®* (Ferreira, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os segmentos foliares apresentaram intumescimento 3 dias após a inoculação e o aparecimento dos calos ocorreu dentro de uma semana. Resultados semelhantes foram obtidos por Ferreira et al. (2005) quando empregaram folhas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) como explantes para embriogênese somática desta espécie.

A variável %EFC (porcentagem de explantes formadores de calo) não teve variação quando observada aos 30 e nem aos 60 dias, demonstrando que 30 dias são suficientes para que o total de explantes inoculados atinja seu potencial de cobertura calogênica. De forma semelhante, a lenhosa *Eremanthus erythropappus* (candeia) apresentou o mesmo comportamento, em estudo de calogênese conduzido por Rosal (2004).

Quando os dados obtidos se referiam a %CEC (cobertura dos explantes por calos), houve evolução com os períodos decorridos em função dos diferentes balanços de fitorreguladores aplicados (Tabela 2). Aos 60 dias, todos os explantes, independente do balanço de fitorreguladores submetidos, se encontravam com cobertura calogênica estatisticamente equivalente.

TABELA 2 Porcentagem de cobertura de explantes por calos (%CEC), representados por folhas cotiledonares de *J. curcas* inoculadas em meio MS, sob diferentes balanços de fitorreguladores, aos 30 e 60 dias de cultivo ⁽¹⁾.

Balanço Fitorreguladores (mg.L ⁻¹)	% CEC 30 dias	% CEC 60 dias
T1	0 c	0 b
T2	1 b	2 a
T3	1 b	2 a
T4	1 b	2 a
T5	2 a	2 a
T6	0 c	2 a
T7	0 c	2 a
T8	1 b	2 a
T9	1 b	2 a
T10	0 c	2 a
T11	0 c	2 a
T12	0 c	2 a
T13	0 c	2 a

(1) Notas seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott t, a 5% de probabilidade.

Aos 30 dias, a melhor resposta obtida ocorreu sob efeito de 2,0 mg.L⁻¹ de PIC. De forma secundária, mas não menos importante, se equivaleram outros balanços, dentre eles ressalta-se 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Apesar de 2,0 mg.L⁻¹ de PIC se configurar como a melhor resposta estatística, esta não o é morfogeneticamente, pois a textura dos calos foi extremamente aquosa. Segundo Grandó et al. (1993), calos aquosos são formados por um tecido esponjoso, branco translúcido e sem consistência, semelhantes aos obtidos nessa pesquisa, os quais se desintegravam ao simples toque submetido, impossibilitando sua repicagem (Figura 2).

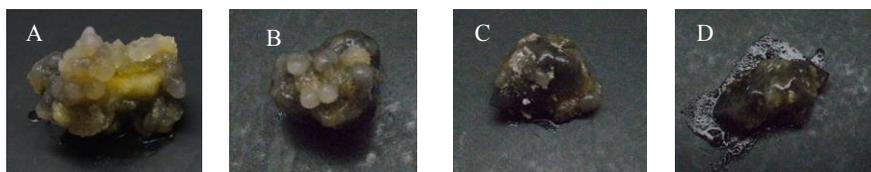


FIGURA 2 Aspecto textural de calos de *J. curcas* L., cultivados em: A - 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D; B - 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D; C- 1 mg.L⁻¹ de PIC; D - 2 mg.L⁻¹ de PIC.

Segundo Nabors et al. (1983) e Rashid & Quraishi (1989), calos totalmente aquosos não apresentam capacidade de regeneração e por este motivo devem ser descartados. Portanto, a textura é considerada como mérito para rejeite dos mesmos. De forma semelhante, Carvalho (2007) descarta o uso do PIC na regeneração de calos de eucalipto (*Eucalyptus* spp), também devido à textura dos calos, os quais apresentaram estrutura compacta.

Com desempenho similar e textura mais consistente, destacam-se os calos cultivados em 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Os calos sob efeito deste fitorregulador apresentaram também a proeminência de estruturas semelhante ao embrião globular, sendo característica da primeira fase de histodiferenciação desse órgão e é, portanto, o primeiro indício de sucesso num protocolo que vise à obtenção de embriogênese somática.

Como ambas as concentrações de 2,4-D proporcionaram efeitos similares, recomenda-se o uso 1,0 mg.L⁻¹, no intuito de reduzir custos. A mesma dosagem deste fitorregulador é recomendada por Nogueira et al. (2007). Para calogênese em explantes foliares de murici-pequeno, também verificaram que a combinação entre citocininas e auxinas não mostraram-se eficientes na calogênese da espécie estudada. Esses resultados se assemelham aos do presente trabalho, onde balanços combinados entre auxinas (2,4-D e PIC) e citocininas (KIN e BAP) não se apresentaram promissores, pois os calos se desenvolveram, mas com menor porcentagem de cobertura dos explantes.

Tal resultado é relevante, já que a indução de calo é dependente de um balanço hormonal intermediário de auxinas e citocininas. No desenvolvimento da *J.curcas*, provavelmente, o fornecimento da auxina no meio de cultura foi suficiente para equilibrar o conteúdo endógeno de citocininas do explante. Assim, os resultados indicam que as citocininas (KIN e BAP) presentes no meio nutritivo possivelmente proporcionaram elevada concentração deste regulador em relação à auxina, devido a um desbalanço na proporção auxina/citocinina, ocasionando diminuição na formação de calos.

Oliveira et al. (2007), fizeram observações semelhantes pesquisando calogênese em feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*), verificando que não houve formação de calo na presença de 2,4-D e BAP.

Pelas análises em MEV pode-se observar que as massas celulares sob influência de 1mg.L^{-1} de 2,4-D são mais arredondadas e que estruturas semelhantes a embriões apareceram entre a superfície calogênica (Figura 3 A-B). Ferreira et al. (2005) também observaram tal morfologia de embrião trabalhando com embriogênese somática em cupuaçu sob efeito de TDZ.

Os embriões somáticos apresentam quatro estágios: globular, codiforme, torpedo e cotiledonar. Pelas imagens MEV os embriões somáticos de *J.curcas* apresentavam-se na fase inicial, no estágio globular, ligados ao tecido do explante (Figura 3).

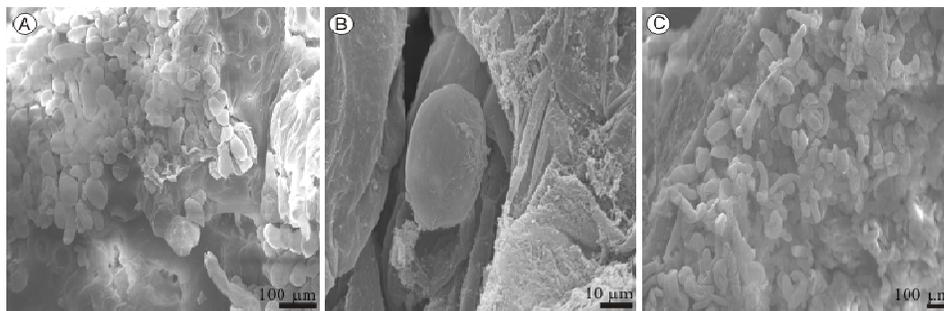


FIGURA 3 MEV de calos de *J. curcas* L. cultivados em: A - 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, apresentando células em formato arredondado; B - 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D com estrutura semelhante a embriãoide no estágio globular; C- 1 mg.L⁻¹ de PIC, apresentando células em formato alongado.

As massas celulares sob influência de 1mg.L⁻¹ de PIC apresentam-se mais alongadas. Essa diferença no formato das células arredondadas (2,4-D) e alongadas (PIC) demonstra a capacidade morfogenética de ambos os fitorreguladores, pois células com formato isodiamétrico são por característica embriogênicas (Steiner et al., 2005).

Análises ultraestruturais, através da MEV, são uma ferramenta que contribui no esclarecimento da capacidade morfogenética de explantes cultivados *in vitro* e com as informações conseguidas pelo uso desta, no presente trabalho, fica comprovado o potencial embriogênico de explantes foliares coltiledonares de *J. curcas*.

O diagnóstico visual da massa calogênica das lâminas obtidas pela dupla coloração carmin acético/azul de evans, pode ser realizado na Figura 4.

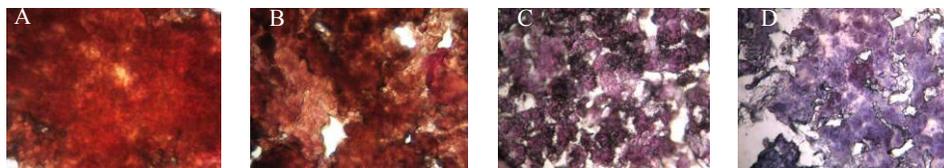


FIGURA 4 Massas celulares de *J. curcas* L., cultivados em: A - 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, reagindo fortemente ao carmim acético; B - 2 mg.L^{-1} de 2,4-D, também com reação ao carmim acético; C- 1 mg.L^{-1} de PIC, reagindo ao azul de evans; D - 2 mg.L^{-1} de PIC, com forte reação azul de Evans.

Pela análise RGB das lâminas confeccionadas pela dupla coloração carmim acético/azul de evans, observou-se que o nível de vermelho não diferiu estatisticamente entre os diferentes fitorreguladores e concentrações aplicadas (Figura 5). Portanto, as massas calogênicas advindas tanto do cultivo com 2,4-D como com PIC, reagiram de forma semelhante ao corante carmim acético, demonstrando que ambos os fitorreguladores conferiram resposta morfogênética aos explantes.

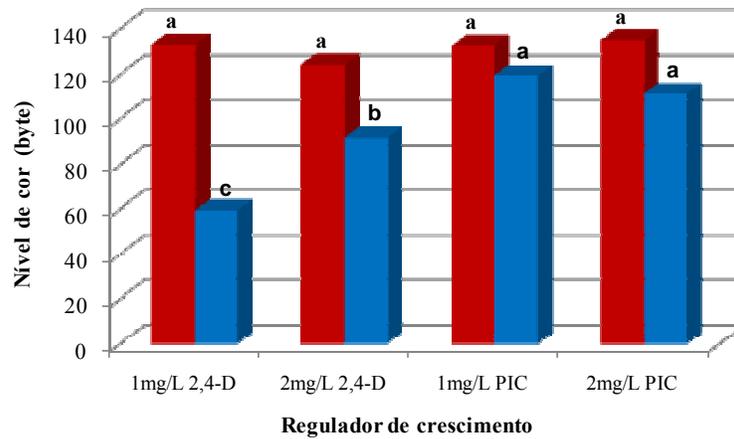


FIGURA 5 Nível de vermelho e azul obtido por imagem de lâminas de massas calogênicas de *J. curcas* L., cultivadas sob diferentes auxinas, coradas com carmim acético e azul de evans. * Letras iguais na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott t a 5% de probabilidade.

Observando-se o nível de azul, nota-se diferença estatística entre diferentes fitorreguladores e concentrações aplicadas, significando que os calos dos distintos tratamentos reagiram diferentemente ao corante azul de evans (Figura 5). As massas calogênicas mais reativas a este corante foram as que se desenvolveram na presença do PIC, sendo que entre suas doses, os níveis de azul se equivaleram.

De forma inferior, reagiram ao azul de evans as massas calogênicas desenvolvidas sob 2,4-D. Entre as doses de 2,4-D houve resposta diferente a este corante, pois 1mg. L⁻¹ de 2,4-D reagiu mais negativamente ao azul de evans (Figura 5).

Silva (2009) também se utilizou da dupla coloração carmim acético/azul de evans para identificação de massas calosas com potencial embriogênico. O autor subcultivou por três vezes a planta murici-pequeno, identificando que no subcultivo inicial o potencial embriogênico foi mais pronunciado. Lima (2009)

também se utilizou desta ferramenta para caracterizar aglomerados celulares de bananeira cv. prata anã, identificando que no 3^o e 6^o subcultivos de aglomerados tipo 2, nos meios CNPMF e MA2 respectivamente, ocorrem os maiores potenciais embriogênicos.

Os dados apresentados demonstram que a reação ao carmim acético foi idêntica para ambos os fitorreguladores, no entanto, o regulador menos reativo ao azul de evans foi o 2,4-D, mais especificamente a concentração de 1mg. L⁻¹ de 2,4-D. De acordo com Steiner et al. (2005) e George et al. (2008), reação positiva ao carmim acético em detrimento ao azul de evans identifica células embriogênicas, sendo assim, os calos de *J. curcas* cultivados mediante 1mg. L⁻¹ de 2,4-D exibem superior potencial embriogenético.

6 CONCLUSÕES

Indução de calogênese em explantes foliares cotiledonares de *J. curcas* é obtida em meio MS acrescido de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

O potencial embriogênico dos calos *J. curcas* cultivados em meio MS, com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, foi confirmado pela análise via MEV e dupla coloração carmim acético/azul de evans.

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-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, jan./abr. 2004.

BOBBIO, F.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1989.

CARVALHO, E. C. S. **Antioxidantes, reguladores de crescimento e estresse térmico na embriogênese somática de *eucalyptus* spp.** 2007. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - sistema de análise estatística, version 4.3. Lavras: UFLA/DEX, 2000.

FERREIRA, M. das G. R.; CARVALHO, C. H. S. de; CARNEIRO, A. de A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 500-503, dez. 2005.

FITCH, M. M. M.; MOORE, P. H. Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 20, n. 3, p. 157-163, Mar. 1990.

GALLO-MEAGHER, M.; ENGLISH, R. G.; ABOUZID, A. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. **In vitro Cellular and Developmental Biology**. Plant, Berlin, v. 36, n. 1, p. 37-40, Jan./Feb. 2000.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 501 p.

- GRANDO, M. F.; EICHLER, L.; TANABE, C. R.; SANTOS, J. F.; SANTOS, C. M. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 139-144, 1993.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1999. v. 2, p. 533-568.
- HORRIGE, G. A.; TAMM, S. L. Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. **Science**, New York, v. 163, n. 3869, p. 817-818, Feb. 1969.
- JHA, T. B.; MUKHERJEE, P.; DATTA, M. M. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. **Plant Biotechnology Reports**, Japan, v. 1, n. 3, p. 135-140, Aug. 2007.
- KIELSE, P. V. do N.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Indução de calogênese em explantes de *Parapiptadenia rígida*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 84-86, jul. 2007.
- LIMA, C. D. F. **Obtenção de suspensão celular e regeneração de embriões de bananeira cv. prata-anã**. 2009. 69 p. 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. 3, p. 473-497, July 1962.
- NABORS, M. W.; HEYSER, J. W.; DYKES, T. A.; DEMOTT, K. J. Long-duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. **Planta**, Heidelberg, v. 157, n. 5, p. 385-391, Apr. 1983.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. de; SOARES, G. de A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. de O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr. 2007.

OLIVEIRA, A. L. de; KIDO, E. A.; BENKO-ISEPPON, A. M.; KIDO, L. M. H. Efeito dos Fitorreguladores BAP e 2,4 – D sobre a indução de calos em *Vigna unguiculata*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 69-71, jul. 2007.

PERÁN-QUESADA, R.; SÁNCHEZ-ROMERO, C.; BARCELÓ-MUNÓZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Factors effecting maturation of avocado somatic embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 61-73, Oct. 2004.

RASCHID, H.; QURAIISHI, A. High frequency embryogenic callus induction and its regeneration in three wheat cvs. **Review of Advances in Plant Biotechnology**, Berlin, v. 15, n. 4, p. 205-215, 1989.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) Mac Leish)**. 2004. 106 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, L. C. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de murici-pequeno**. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba v. 48, n. 6, p. 895-903, nov. 2005.

SUAREZ, M.; FILONOVA, L.; SMERTENKO, A.; SAVENKOV, E.; CLAPHAM, D.; ARNOLD, S. von; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKOV, P. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. **Current Biology**, London, v. 14, n. 9, p. 339-340, May 2004.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 18-27, 2005.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis on plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL, 1985. p. 79-105.

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

CAPÍTULO 3

CURVA DE CRESCIMENTO E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE CALOS DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.).

1 RESUMO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie que vem ganhando estudo devido a seu potencial, como insumo no programa biodiesel. Os estudos visam à adequação de técnicas agronômicas e a cultura de tecidos vem contribuir com este aspecto, pois as respostas obtidas inferem sobre o crescimento e o desenvolvimento da planta. Nesse intuito, é fundamental a determinação da curva de crescimento dos calos, na qual é possível identificar e determinar fases da cinética do desenvolvimento bem como a determinação do comportamento dos metabólitos primários. Neste contexto, objetivou-se, no presente trabalho, determinar a curva de crescimento de calos e os teores de carboidratos (açúcar solúvel total, açúcar redutor e amido), proteína e aminoácidos durante todo o período de cultivo. Na fase exponencial (0 aos 7 dias) não há detecção de carboidratos solúveis nem insolúveis, o nível de aminoácidos é alto. Na fase linear (7 aos 14 dias) e na desaceleração (14 aos 28 dias) o comportamento é o mesmo, exceto para o nível de aminoácidos que começa a decrescer. Ao final da desaceleração é recomendada a repicagem, ou seja, aos 28 dias. Na fase estacionária (28 aos 77 dias) observam-se picos de açúcares solúveis. Ao final desta fase estacionária há a quantificação positiva de proteínas e consequentemente de aminoácidos. Ao fim do cultivo, na fase de declínio, detectam-se baixos teores de AST e picos de AR, foi observada também a identificação do máximo teor de amido. Durante o declínio (77 aos 112) ainda houve um pico de proteína, com um declínio ao final concomitantemente aos aminoácidos, o que pode ser devido às reações de Amadori e Mailhard com as elevadas quantidades de AR disponíveis nessa fase.

Palavras Chave: cinética de calos, carboidratos, proteínas, aminoácidos.

2 ABSTRACT

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is a species that has become the study due to its potential as a feedstock in biodiesel program. The studies aim the adequacy of agronomic techniques and tissue culture are contributing to this, because the answers obtained inferred about the growth and development of the plant. To that end it is essential to the curve of growth of callus, which can identify and determine the kinetic phases of development and the determination of the behavior of primary metabolites. In this context, the aim in the present study was to determine the growth rate of callus and the carbohydrates (total soluble sugar, reducing sugar and starch), protein and amino acids throughout the growing period. In the exponential phase (0 to 7 days) there is no detection of soluble or insoluble carbohydrates, the ninel the amino acid is high. In the linear stage (7 to 14 days) and deceleration (14 to 28 days) the behavior is the same except for the level of amino acids that begins to decrease. At the end of the deceleration is recommended the transplant, at the 28 days. In the stationary phase (28 to 77 days) there are peaks of soluble sugars. At the end of this stationary phase is the quantification positive of proteins and consequence of amino acids. At the end of cultivation in the decline phase, they exhibit low levels of TSS and peak RS, was also observed the identification the maximum starch content. During the decline (77 to 112) still was a peak of protein, with a decline at the end concurrently at the amino acids, which may be due to the reactions of Amadori and Mailhard with the high levels of RS available at this stage.

Key-words: kinetics of callus, carbohydrates, proteins, amino acids.

3 INTRODUÇÃO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma Euphorbiaceae que vem ganhando estudo devido a seu potencial, como insumo, no programa nacional de incentivo ao biodiesel do governo federal. As qualidades inerentes à espécie se devem à sua rusticidade, sobrevivendo bem em regiões áridas e à produtividade, que em território nacional gira em torno de 5000 Kg/ha de semente (Arruda et al., 2004; Saturnino et al., 2005; Teixeira, 2005).

A rusticidade da *J. curcas* se dá pelo fato desta ser ainda uma planta selvagem aos tratos agronômicos, um sinônimo da carência de informações quanto a sua domesticação. No intuito de poupar tempo, os estudos *in vitro* da *J. curcas* ganham destaque, pois a cultura de tecidos é uma ferramenta que, se bem utilizada, simula as condições de campo e permite inferências precisas com relação à resposta da planta a estresses e adversidades.

Dentro da cultura de tecidos, a técnica de cultura de calos propicia estudos precisos de fisiologia, pois as respostas obtidas inferem sobre o crescimento e o desenvolvimento da planta. Nesse contexto, é fundamental a determinação da curva de crescimento dos calos, na qual é possível identificar e determinar fases da cinética do desenvolvimento (Nogueira et al., 2008).

Segundo Smith (1992), essa cinética constitui-se de cinco fases, sendo primeiramente uma fase *lag*, na qual há maior produção de energia, correspondendo ao período em que as células se preparam para divisão, visando à expansão. Ocorre o início da mobilização de metabólitos, sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de compostos específicos. Esta fase resulta em um pequeno crescimento de calos. A segunda fase é a *exponencial*, a qual é biossintética. Observa-se maior crescimento dos calos, devido à máxima taxa de divisão celular, característica desse período, conseqüentemente, o número de células aumenta. A fase *linear* caracteriza-se pela redução da divisão celular e

aumento de volume celular. A fase de *desaceleração* é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio devido à redução de nutrientes, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células. Na fase *estacionária*, não há mais divisão celular e o desenvolvimento do calo entra em uma fase de *declínio*.

Segundo Soares (2003), a partir do estudo da cinética calogênica pode-se estabelecer o momento exato de repicagem dos calos para um novo meio ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares. A identificação correta do período de repicagem dos calos, de acordo com a curva de crescimento, é importante para maximizar o processo de multiplicação das células visto que, na fase de crescimento (crescimento ascendente da curva), as células mantêm alta capacidade de divisão. Após o período de crescimento, as células entram na fase estacionária onde há maior número de células com menor capacidade de divisão celular, e a célula entra em estágio de diferenciação celular (Pereira et al., 2007).

O desenvolvimento das distintas fases demanda uma intensa síntese de metabólitos primários, e a produção destes está diretamente relacionada com a síntese de biomassa. Portanto, o conhecimento dos níveis de metabólitos permite o entendimento da dinâmica do crescimento e desenvolvimento de calos. Segundo Mesquita et al. (2002), o conhecimento de mudanças bioquímicas e fisiológicas, que ocorrem durante o crescimento *in vitro* de tecidos vegetais de espécies lenhosas, pode fornecer importantes informações relacionadas ao processo de estabelecimento e, conseqüentemente, propiciar a otimização das condições para seu cultivo *in vitro*.

Os carboidratos, proteínas e aminoácidos são considerados metabólitos primários. Segundo Fumagali et al. (2008), estes são responsáveis por funções vitais básicas, como por exemplo, divisão, crescimento celular, respiração, estocagem e reprodução.

De acordo com Passos (1996), a determinação dos níveis de carboidratos revela a reserva prontamente disponível ao crescimento da planta e possui várias aplicações em estudos fisiológicos. Os carboidratos fornecem esqueletos de carbono e energia para a biossíntese de compostos orgânicos envolvidos no metabolismo celular. Segundo Silva et al. (2003), os monossacarídeos, glicose e frutose são açúcares redutores por possuírem grupo carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. Os dissacarídeos que não possuem essa característica sem sofrerem hidrólise da ligação glicosídica são denominados de açúcares não redutores. Os açúcares redutores e não redutores formam os chamados açúcares solúveis totais. É justamente essa característica de oxi-redução que permite a quantificação dos açúcares.

As proteínas são macromoléculas contendo número elevado de aminoácidos. Segundo Stryer (1992), elas participam de várias funções em um organismo vivo: transporte, catálise enzimática, controle do crescimento e diferenciação. O desenvolvimento de metodologias para determinar proteínas tem, cada vez mais, se tornado de fundamental relevância em várias áreas do conhecimento, como por exemplo, na Fisiologia Vegetal. Os métodos para a determinação da concentração de proteínas totais são muito variados, no entanto, as metodologias mais utilizadas são as espectrofotométricas.

Os aminoácidos constituem-se nas subunidades monoméricas das proteínas, fornecendo a chave para a estrutura de milhares delas. São vinte ao todo e apresentam como característica principal a ligação de um grupo amino e um grupo carboxílico ao mesmo átomo de carbono. Diferem entre si quanto ao radical ligado a este átomo de carbono, o que resulta em diferenças de carga elétrica, polaridade, tamanho da molécula e solubilidade em água. Os aminoácidos apresentam reações químicas características dos seus grupos funcionais. Por exemplo, os grupos amino podem ser acetilados e os

carboxílicos esterificados. Os métodos disponíveis para a quantificação de aminoácidos podem determinar aminoácidos totais ou específicos (Stryer, 1992).

Como os metabólitos primários são essenciais no desenvolvimento de explantes *in vitro* e o conhecimento dos níveis destes durante o desenvolvimento de calos contribui potencialmente para o conhecimento da cinética calogênica, o objetivo do presente trabalho focou-se em determinar a curva de crescimento de calos obtidos de segmentos foliares de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e os teores de carboidratos (açúcar solúvel total, açúcar redutor e amido), proteína e aminoácidos durante todos os períodos de cultivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Utilizou-se, como material vegetal, sementes colhidas na safra de 2008, provenientes da matriz Oracília. Tais sementes são advindas de campo comercial no município de Janaúba (MG) e foram cedidas pela empresa NNE Minas Agroflorestal. Para manutenção da qualidade das sementes, estas foram armazenadas 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.

Plantas obtidas por meio de germinação *in vitro*, em meio MS sem fitorreguladores, foram utilizadas como fonte de explantes foliares, as quais foram seccionadas em média com 1cm², em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar. Tais seções foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. O meio foi preparado com adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 5,5 g.L⁻¹ de ágar, antecipadamente à autoclavagem que ocorreu a 121°C por 20 min. Posteriormente, as culturas foram acondicionadas em armário de metal, propiciando a ausência de luz, em sala de crescimento a 25±2°C.

Curva de crescimento de calos

Calos de 1cm² e matéria fresca média de 0,29 g obtidos a partir de explantes foliares, cultivados em meio MS, suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D, foram repicados duas vezes, em intervalos de 30 dias. Após a segunda repicagem, estabeleceu-se a curva de crescimento dos calos através da

determinação da matéria fresca dos calos a partir do dia da inoculação (tempo 0), em intervalos de sete dias, durante 112 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 16 tratamentos, constituídos pelos intervalos de avaliação (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105 e 112 dias). Foram utilizados três repetições, sendo cada repetição constituída pela média de três tubos e cada tubo contendo um explante. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando software Sisvar® (Ferreira, 2000). A curva de crescimento foi plotada a partir da média de três repetições em cada tempo de determinação de matéria fresca.

De forma semelhante à matéria fresca, acompanhou-se a matéria seca dos calos, que foram coletados e secos em estufa até peso constante, e avaliados a cada 7 dias, por três repetições de três tubos. A estatística aplicada foi a mesma da matéria fresca.

Análises bioquímicas

Para determinação das análises bioquímicas dos calos procedeu-se a coleta dos mesmos em intervalos de 7 dias desde o dia da inoculação, sendo duas amostras de 500 mg para cada repetição. As amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de -80°C para futuras extrações e quantificações.

O extrato vegetal foi obtido por homogeneização em gral de uma amostra de 500 mg (peso da matéria fresca) de calos em 4 mL de água. O extrato foi levado a banho-maria a 40°C por 30 minutos. Posteriormente, foi centrifugado a 4.800g durante 30 minutos, ressuspensos com mais 4 mL de água, totalizando um volume de 8 mL de extrato vegetal. Para a extração do amido, o pellet foi novamente ressuspendido com 8 mL do tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8 e colocado em banho-maria (100°C) por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 16 unidades da enzima amiloglucosidase, e novamente incubado em banho-maria a 40°C por duas horas. Após a

centrifugação a 5.000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o volume completado para 15 mL.

A metodologia descrita por Yemm & Willis (1954) foi utilizada para determinar o teor de açúcares solúveis totais (AST). Utilizaram-se alíquotas de 0,02 mL de extrato aos quais foram adicionados 0,98 mL de água destilada e 2 mL do reagente antrona (20 mg de antrona, 0,5 mL de água destilada e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado). Após agitação, os tubos foram aquecidos a 100°C, por 5 minutos. As amostras foram submetidas a análise em espectrofotômetro a 620 nm e a quantificação dos açúcares baseou-se na curva padrão de glicose.

Para quantificação do amido, também utilizou-se a metodologia descrita por Yemm & Willis (1954).

Seguiu-se a metodologia descrita por Miller (1959) para determinação dos açúcares redutores (AR). Dos extratos de calos foram retiradas alíquotas de 0,5 mL, adicionados 0,25 mL de água e 0,5mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Com auxílio de agitador, homogeneizou-se a mistura a qual permaneceu em banho-maria a 100°C por 5 minutos, resfriando-se posteriormente a temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a análise em espectrofotômetro a 540 nm e a quantificação dos açúcares baseou-se na curva padrão de glicose.

A quantificação das proteínas solúveis totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), que se baseia no princípio da associação entre proteína e corante. Em alíquotas de 0,1 mL do extrato bruto foram adicionados água destilada e 5 mL do reagente Comassie Blue (constituído de 0,01% de Comassie Blue G – 250, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol). As amostras foram submetidas a análise em espectrofotômetro a 595nm e a quantificação das proteínas baseou-se na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de soro-albumina bovina (BSA).

Para determinação dos teores de aminoácidos foi utilizado o método da ninhidrina, descrito por Stein & Moore (1948). Adicionou-se, em tubos de ensaio, uma alíquota de 0,2 mL do extrato, juntamente com 1,7 mL do reagente A+B+C (A – tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 5,0; B – reagente de ninhidrina 5% em metilcelossolve e C – KCN 2% em metilcelossolve). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 100°C, durante 20 minutos. Após o resfriamento, foi adicionado 1,3 mL de etanol 60% (v/v) em cada tubo. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 570 nm. A quantificação dos aminoácidos baseou-se na curva padrão obtida por meio de diferentes concentrações do aminoácido glicina.

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando software Sisvar® (Ferreira, 2000), através do teste de Scott-Knott a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos de tempo em que os calos permaneceram em cultivo e, apesar da cinética da curva de crescimento de calos se diferenciar em seis fases, para a curva de *J. curcas*, somente cinco foram detectadas: exponencial, linear, estacionária, desaceleração e declínio (Figura 1).

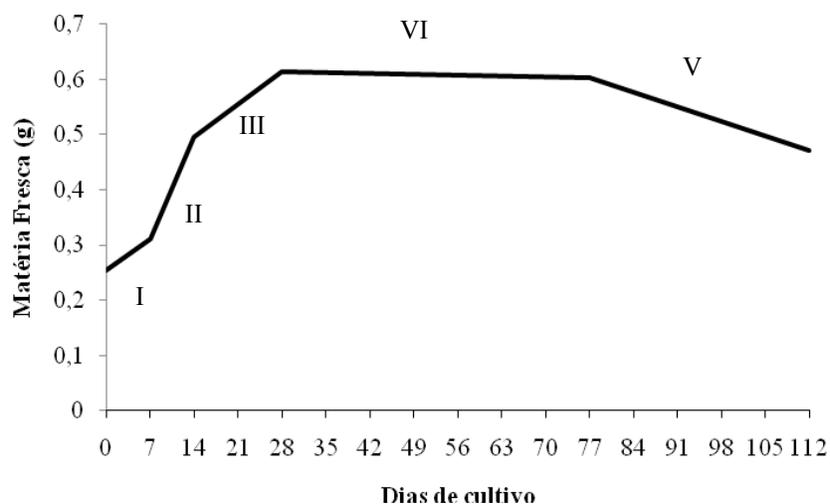


FIGURA 1 Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de *J. curcas*, inoculados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. I- fase de crescimento exponencial; II- fase linear; III- fase de desaceleração; IV- fase estacionária; V- fase de declínio.

O comportamento de uma curva de calos é função da espécie em estudo, do explante utilizado, etc. Santos et al. (2003), por exemplo, não identificaram as seis fases em trabalho com curva de calo em cafeeiro, para esta espécie somente três foram detectadas, sendo lag, exponencial e linear, segundo os autores, devido à baixa velocidade de crescimento que essa espécie apresenta.

A curva de crescimento dos calos de *J. curcas* inicia-se com a fase exponencial, na qual já se tem intensa divisão celular. Esta fase permaneceu de 0 aos 7 dias. O presente resultado contrasta com os obtidos com murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) (Nogueira et al., 2008) e sangra d'água (*Croton urucurama*) (Lima et al., 2007), nos quais a curva de crescimento de calos se inicia com a fase lag, a qual não foi identificada na curva de crescimento para *J. curcas*. Provavelmente a fase lag, que é a fase de preparo para divisão celular, ocorreu num tempo inferior a 7 dias e por isso não foi possível sua identificação, já que os intervalos de avaliação envolviam esse período. Deve-se considerar o fato da utilização de explante secundário (calo) para a avaliação cinética, o qual já se encontrava em divisão. Quando se utiliza, por exemplo, folha como explante inicial, a fase lag é alongada, como é o caso identificado por Serra et al. (2000), que usou folhas de castanha do Brasil para iniciar a curva de crescimento, detectando a fase lag com duração de 30 dias.

O período de crescimento linear, no qual os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular, foi observado entre 7 e 14 dias. Esse rápido período se deve ao explante, que por ser secundário, o tecido se apresenta mais homogêneo (Serra et al., 2000).

A fase de desaceleração envolve o período de 14 a 28 dias. Ela é curta em relação a diversas espécies como castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), de 60 a 67 dias (Serra et al., 2000), lechieira, de 63 a 77 dias (Mesquita et al., 2002) ou murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), de 60 a 80 dias (Nogueira et al., 2008). No entanto, é um tempo adequado e semelhante ao obtido por Lameira (1997) que, trabalhando com erva-baleeira, identificou a desaceleração entre 18 e 21 dias. Segundo Smith (1992), é na fase de desaceleração que os calos devem ser repicados, em razão principalmente da redução de nutrientes ou secagem do ágar. Todas as espécies citadas anteriormente atingiram a fase de desaceleração muito tardiamente em relação a

J. curcas e, por isso para aquelas, a repicagem é recomendada no início da fase de desaceleração. Como para a *J. curcas* a desaceleração inicia-se aos 14 dias, provavelmente, ainda não houve tempo o suficiente para as razões como redução de nutrientes ou secagem do ágar terem se estabelecido. Portanto, recomenda-se a repicagem no final da fase de desaceleração, ou seja, aos 28 dias.

Após esse período, os calos entraram na fase estacionária, a qual se estendeu até aos 77 dias. Essa fase é praticamente imóvel com relação ao ganho em matéria fresca porque nesta não há mais divisão celular, o calo está, portanto em subsistência. Ao final dos 77 dias, os calos de *J. curcas* entram na fase de declínio, em processo de senescência.

O padrão cinético para uma curva de crescimento de calos é uma sigmóide, contendo as fases lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. Esse comportamento foi observado em diversas lenhosas como castanha do Brasil (Serra et al., 2000), cafeeiro (Santos et al., 2003), sangra d'água (Lima et al., 2007) e murici-pequeno (Nogueira et al., 2008). Para *J. curcas*, como já explicado anteriormente, há ausência da fase lag e foi identificada uma fase além, a de declínio. Provavelmente a espécie *J. curcas* tem ciclo celular rápido e, ao analisar-se o comportamento da curva de calos, nota-se que esse modelo sigmóide se concentra em um período em torno, possivelmente de 35 dias. Esse crescimento acelerado se deve supostamente a um ciclo celular também veloz. Para esclarecimento da suposição, recomenda-se estudos de citogenética para a avaliação do ciclo celular desta espécie. Santos et al. (2003) depararam-se com necessidade semelhante, ao observar crescimento lento na curva de calos de cafeeiro.

Com relação à variável matéria seca, observou-se que esta foi crescente com o decorrer dos dias de cultivo (Figura 2). Mesmo enquanto a matéria fresca dos calos diminui, a partir dos 77 dias, a matéria seca continua aumentando, tal fato é sinônimo de que os calos estão incorporando esqueletos de carbono com o

passar do tempo. De forma subjetiva, foi perceptível que, ao início do cultivo, os calos se apresentavam aquosos e com o decorrer dos períodos notou-se que estes ganharam em consistência, proporcionalmente ao comportamento da curva. Essa incorporação de esqueletos de carbono é possível graças à fonte de sacarose disponível no meio de cultivo. A sacarose (3% m/v) é o carboidrato mais utilizado nos meios de cultura (Caldas et al., 1998), pois plantas cultivadas *in vitro* não dispõem de condições adequadas de iluminação (Donato et al., 2003) e disponibilidade de CO₂ para realização da fotossíntese que sustente o crescimento, sendo necessário adicionar ao meio nutritivo uma fonte de carbono.

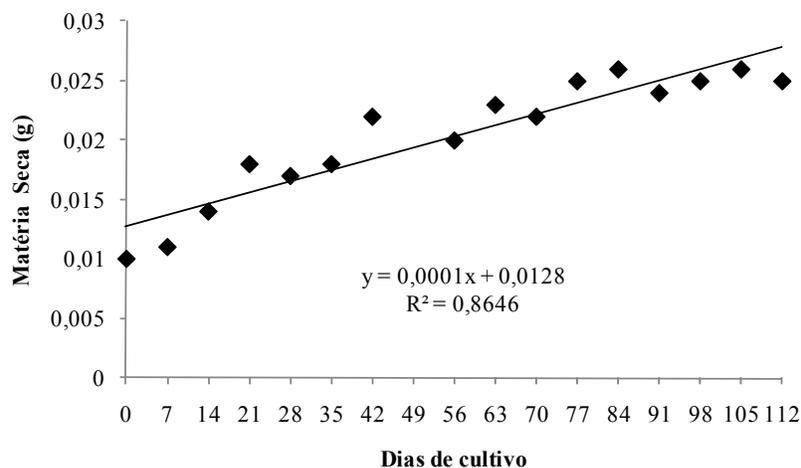


FIGURA 2 Matéria seca de calos de *J. curcas* formados a partir de explantes foliares, inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Uma reflexão sobre crescimento e desenvolvimento remete ao conceito de que desenvolvimento é um ganho qualitativo enquanto crescimento é um ganho quantitativo em matéria seca. Com isso, infere-se com o observado que os calos de *J. curcas* estão mais crescendo do que se desenvolvendo. O que é

esperado, já que a metodologia aplicada no experimento objetiva a coleta dos calos até sua senescência, não havendo repicagem destes para novo meio nutritivo. Consequentemente, sem nutrição adequada, os calos mais crescem e pouco se desenvolvem, portanto não deve ser esperado durante a condução da curva de crescimento de calos um processo morfogênético bem sucedido. Para o sucesso morfogênico, os calos devem seguir o tempo de repicagem estabelecido com a própria curva, ou seja, os 28 dias recomendados.

Considerando as análises bioquímicas realizadas, observou-se que o maior teor de carboidrato encontrado relacionava-se aos AST, independente do período de cultivo (Figura 3). Tal resultado procede, pois sua composição engloba desde hexoses únicas, como glicose e frutose (AR), até hexoses ligadas em cadeia como a sacarose (ANR), portanto, os AST advêm do somatório de todos esses açúcares, culminando em maior teor.

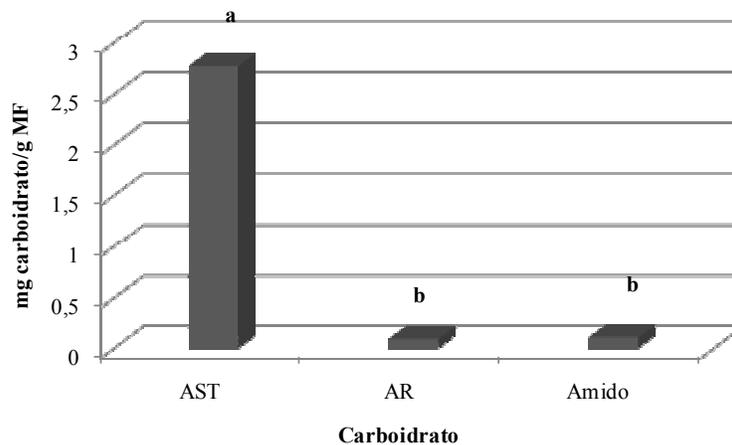


FIGURA 3 Teores de Carboidratos em calos de *J. curcas* formados a partir de explantes foliares, inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. (AR- Açúcares Redutores; AST- Açúcares Solúveis Totais; Amido- Amido). Letras iguais na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott , a 5% de probabilidade.

Analisando-se individualmente os AST nota-se que os teores se mantêm baixos do dia da inoculação até aos 77 dias de cultivo quando ocorre a melhor expressão destes açúcares (Tabela 1). Ao final do cultivo têm-se teores consideráveis de AST, mesmo que de forma secundária. Resultados elevados, porém tardios com relação ao período de cultivo para AST também foram obtidos por Azevedo (2003), aos 84 dias de cultivo de calos de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). Soares (2003), cultivando *in vitro* calos de ingá (*Inga vera*), observou que os AST se elevaram no 80º dia após a inoculação.

Com relação aos teores de AR, observa-se que inicialmente também foram baixos, mas somente até aos 42 dias, com uma queda e posterior aumento dos 63 até aos 77 dias. Ao término do cultivo, os teores são elevados dos 98 até aos 112 dias finais (Tabela 1).

TABELA 1 Teores de carboidratos de calos de *J. curcas* formados a partir de explantes foliares, inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, durante 112 dias de cultivo. AST - Açúcares Solúveis Totais; AR - Açúcares Redutores; Amido.*

Dias de cultivo	AST (mg/g MF)	AR (mg/g MF)	Amido (mg/g MF)
0	2,3167 g	0,076 c	0,093 d
7	2,3706 g	0,067 c	0,084 d
14	2,6765 e	0,071 c	0,104 c
21	2,0937 h	0,071 c	0,112 c
28	2,2543 g	0,074 c	0,091 d
35	2,0907 h	0,082 b	0,088 d
42	2,9769 d	0,115 a	0,097 c
49	2,6676 e	0,087 b	0,087 d
56	2,7033 e	0,087 b	0,082 d
63	3,2327 c	0,098 a	0,148 b
70	3,0304 d	0,102 a	0,142 b
77	3,6223 a	0,107 a	0,093 d
84	2,7747 e	0,092 b	0,119 c
91	2,4981 f	0,082 b	0,073 d
98	3,3189 b	0,109 a	0,168 a
105	3,3368 b	0,122 a	0,103 c
112	3,1792 c	0,109 a	0,104 c

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

Períodos semelhantes de maior teor de AR foram identificados por Abbade (2008), aos 45 dias de cultivo de calos de ipê branco (*Bertholletia excelsa*), enquanto Mesquita et al. (2002) observaram aos 70 dias de cultivo de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) o melhor teor de AR.

Alguns autores notaram que o cultivo *in vitro* induziu a uma diminuição nos teores dos açúcares, como em castanha do Brasil (Serra et al., 2000); café (Santos et al., 2003) e murici-pequeno (Nogueira et al., 2008). Numa observação geral dos açúcares no presente trabalho, conclui-se que tanto os AST quanto os AR tem como tendência um baixo teor a partir da inoculação, mantendo um nível superior nos períodos finais de cultivo, contrariando as observações anteriores. Deve-se considerar que o explante utilizado tratava-se de calo que, de acordo com a Tabela 1, praticamente não possuía reservas na forma de carboidratos, enquanto os demais autores partem de tecido foliar como explante inicial, o qual, segundo Abbade (2008), o elevado teor açúcares inicialmente, pode estar relacionado aos conteúdos nas folhas da planta mãe fornecedora do explante, que supre a demanda metabólica do crescimento do calo.

Com relação à curva de calo (Figura 1), o maior teor de AST aos 77 dias coincide exatamente com o início da fase de desaceleração da curva, isso explica o porquê mesmo em desaceleração o peso da matéria seca dos calos ainda aumenta, uma vez que os esqueletos de carbono que dão esse acréscimo vêm exatamente da absorção da sacarose do meio de cultura ao longo do cultivo. Já o AR tem seu pico aos 42 dias de cultivo, indicando que anteriormente houve absorção da sacarose e posterior degradação em açúcares menores, o que ocorre de forma geral até 112 dias finais. O pico de AR no final do cultivo não contribui para incrementos em AST. Isto indica que nem todos os AR disponíveis contribuem para a síntese de hexoses ligadas, demonstrando que os açúcares associados como sacarose e outros são sintetizados pelos AR até os 70 dias, depois deste período os mesmos são degradados pela respiração do tecido em açúcares menores, contribuindo para o incremento em AR, observado ao final da fase de declínio.

Em relação aos carboidratos insolúveis, observa-se, pela Tabela 1, que os níveis de amido mantiveram-se baixos, desde o dia da inoculação até os 91

dias de cultivo. O reduzido teor de amido no período da inoculação, juntamente com AST e AR, vem confirmar que provavelmente o calo utilizado era desprovido de reservas carboidratadas. Como explantes cultivados *in vitro* são praticamente heterotróficos, o acúmulo de reservas realmente não é a rota marcante em seu metabolismo.

De acordo com Silveira et al. (2004), em suspensões celulares de *Pinus tadea* L., os níveis de amido reduziram mediante a adição de 2,4-D ao cultivo. Como o cultivo dos calos de *J. curcas* foi iniciado em meio contendo tal regulador, este pode ter influenciado de forma semelhante. Nogueira (2006), avaliando o teor de amido por períodos de cultivo em murici-pequeno, também observou baixos teores de amido no cultivo inicial, do mesmo modo, com a adição de 2,4-D ao meio de cultura.

A relação entre os níveis de AST e AR nos explantes é indicativo para a formação ou degradação do amido durante seu desenvolvimento. O amido exibiu maior teor aos 98 dias de cultivo, como se sabe, a síntese de amido é diretamente dependente da disponibilidade de AST e AR, pois o amido é formado pela polimerização de moléculas de glicose em ligações α 1-4 e α 1-6 (Castro et al., 2009). Relacionando-se o fato à informação, entende-se o porquê de seu aparecimento ocorrer somente nos períodos finais de cultivo.

Apesar da presença de amido em calos de *J. curcas* ter sido pronunciada somente ao final do cultivo, vale ressaltar que o nível destas moléculas pode mudar dependendo da fase de crescimento (Silveira et al., 2004), do tipo de explante e até de espécie para espécie, como ocorrido em *Araucaria angustifolia*, que durante o desenvolvimento de células embriogênicas teve presença marcante do amido (Astarita & Guerra, 1998).

A determinação de proteínas e aminoácidos em tecidos é uma das análises mais comuns em fisiologia vegetal (Passos, 1996). Neste trabalho, observa-se que até aos 63 dias de cultivo obteve-se níveis inferiores de

proteínas, quando comparada aos níveis obtidos aos 70 e aos 98 dias de cultivo (Tabela 2).

Semelhantemente ao que ocorre com os carboidratos solúveis, no início do cultivo os níveis de proteína também são baixos. Isso se deve ao fato de que a formação de proteínas é dependente da disponibilidade de esqueletos de carbono.

Aos 70 e 98 dias de cultivo, nota-se maiores teores de proteínas totais no presente trabalho, informação que não corrobora com a resposta obtida para outras lenhosas. Em lechieira, por exemplo, maiores teores de proteína foram encontrados aos 42 dias de cultivo (Mesquita et al., 2002), já em sangra d'água e ipê branco o melhor teor de proteína foi detectado no início do cultivo (Lima et al., 2007; Abbade, 2008).

TABELA 2 Teores de Proteínas totais e Aminoácidos de calos de *J. curcas* formados a partir de explantes foliares, inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, durante 112 dias de cultivo.

Dias de cultivo	Proteína (mg/g MF)	Aminoácido (m mol/g MF)
0	0,0144 d	0,5398 a
7	0,0042 g	0,4318 c
14	0,0074 f	0,4374 c
21	0,0093 f	0,3384 d
28	0,0093 f	0,1824 f
35	0,0018 h	0,2672 e
42	0,0023 h	0,4247 c
49	0,0042 g	0,4134 c
56	0,0176 c	0,3273 d
63	0,0119 b	0,5759 a
70	0,0259 a	0,4466 c
77	0,0056 g	0,4677 c
84	0,0138 d	0,4189 c
91	0,0117 e	0,2745 e
98	0,0261 a	0,4979 b
105	0,0137 d	0,4167 c
112	0,008 f	0,2134 f

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

Os baixos teores de proteínas ao final do cultivo, dos 105 aos 112 dias coincidem com elevados teores de AR. Segundo Murthy & Sun (2000), níveis elevados de AR podem causar alterações químicas em proteínas por meio das reações de Amadori e Mailhard, que consiste numa série de ligações entre AR e

proteínas sem a necessidade de ser mediada por enzimas. Uma questão que dá respaldo a esta informação é o fato de que umidade elevada favorece a ocorrência da reação de Amadori e Mailhard (Wettlaufer & Leopold, 1991). Ao cultivo *in vitro* é característico o ambiente de extrema umidade, conseqüentemente tais reações são favorecidas, inativando as proteínas e, portanto, reduzindo seus teores nos tecidos.

Com relação aos aminoácidos, os níveis foram elevados no dia da inoculação, reduzindo drasticamente até os 28 dias e se mantendo baixos até aos 56 dias de cultivo (Tabela 2). Isto indica que provavelmente o explante não estava absorvendo os aminoácidos presentes no meio de cultura ou sua quantificação não foi possível pelo fato destes aminoácidos estarem envolvidos em futuras ligações protéicas.

Aos 63 dias de cultivo, nota-se novamente elevado teor de aminoácidos, que possivelmente pode ser advindo de absorção do meio de cultivo. Os teores de aminoácidos decrescem até o final do cultivo, aos 112 dias, podendo ser devido às reações de Amadori e Mailhard, pois como as proteínas são polímeros de aminoácidos, a inativação destas reduz a quantificação destes últimos.

Em calos de ipê branco (Abbade, 2008), notou-se que os teores de aminoácidos se elevam até o 15º dia, mesmo período identificado por Paiva Neto et al. (1997) em calos de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud). De forma idêntica, este foi o período identificado por Serra et al. (2000) em segmentos foliares de castanha do Brasil.

No presente trabalho, enquanto nos dias iniciais de cultivo os teores de aminoácidos eram altos, os de carboidratos solúveis foram baixos. Esses resultados contrários podem significar que os carboidratos solúveis foram consumidos durante o processo de redução do nitrogênio para a formação de compostos aminados como os aminoácidos. Para Mesquita et al. (2002), o aumento nos teores de aminoácidos pode ser devido a uma absorção

considerável do nitrogênio e de glicina do meio de cultura. Segundo George et al. (1988), a presença de amônio no meio de cultura resulta no aumento da síntese de aminoácidos e proteínas, os quais, geralmente, são produzidos utilizando energia liberada no catabolismo dos carboidratos.

Relacionando os dados obtidos com a curva de calos, observou-se que na fase exponencial não houve detecção de carboidratos solúveis nem insolúveis, possivelmente o explante inicial era desprovido de reservas, o nível de aminoácidos é alto, provavelmente por haver um preparo para a síntese de proteínas que ainda se encontram em déficit. Na fase linear e na desaceleração, o comportamento é o mesmo, exceto para o nível de aminoácidos que começa a decrescer. Na fase estacionária observam-se picos de açúcares solúveis, demonstrando que nesta fase, provavelmente, o explante inicia a absorção da sacarose adicionada ao meio de cultura e, portanto não há a detecção de açúcares de reserva como o amido. Ao final desta fase estacionária há a quantificação positiva de proteínas e consequentemente de aminoácidos, assim como ocorreu para os carboidratos, podendo ser uma resposta de absorção do meio de cultura. Ao fim do cultivo, na fase de declínio detectam-se baixos teores de AST e picos de AR, há também a identificação do máximo teor de amido, indicando que o calo inicia um acúmulo de reserva energética nesta fase. Durante o declínio ainda há um pico de proteína, e um declínio ao final concomitantemente aos aminoácidos, o que pode ser devido às reações de Amadori e Mailhard em função das elevadas quantidades de AR disponíveis nessa fase.

De forma geral, o fato do nível de aminoácidos ser alto no dia da inoculação, e decrescer durante as fases exponencial, linear e estacionária, concomitante ao aumento de proteínas, indica a síntese destas pelos aminoácidos do explante ou pelos absorvidos do meio de cultura, seja a glicina ou compostos nitrogenados para sua formação usados na sua síntese.

6 CONCLUSÕES

A repicagem dos calos de *J. curcas* deve ser realizada ao final da fase de desaceleração, ou seja, aos 28 dias, de acordo com a curva de crescimento de calos;

A massa calogênica inoculada é desprovida de reservas na forma de carboidratos. Os calos iniciam a absorção da sacarose adicionada ao meio durante a fase estacionária, aos 42 dias e o acúmulo desta no explante ocorre durante a fase de declínio, aos 98 dias de cultivo.

O nível de aminoácidos é alto no dia da inoculação, o qual decresce durante as fases exponencial, linear e estacionária, concomitante ao aumento de proteínas e ao final da fase de declínio tanto os níveis de aminoácidos quanto de proteínas decrescem.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADE, L. C. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco**. 2008. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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, jan./abr. 2004.

ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal – suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 113-118, ago. 1998.

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análise bioquímica de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, May 1976.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. J. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.

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

DONATO, V. M. T.; ANDRADE, A. G. de; SOUZA, E. S. de; FRANÇA, J. G. E. de. Metabolismo de plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1373-1379, fev. 2003.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - sistema de análise estatística, version 4.3. Lavras: UFLA/DEX, 2000.

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

GEORGE, E. F.; PUTTOCK, J. M.; GEORGE, H. J. **Plant culture media: commentary and analysis**. England: Exegetics, 1988. 420 p.

LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.)** 1997. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; NICIOLI, P. M. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de Sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 3, p. 184-190, set. 2007.

MESQUITA, A. C.; PAIVA, R.; SANTIAGO, E. J. A. de; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, L. V.; GOMES, G. A. C. Análises bioquímicas de calos obtidos de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinesisnsis* Sonn.). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, p. 1-6, abr. 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

MURTHY, U. M. N.; SUN, W. Q. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 348, p. 1221-1228, July 2000.

NOGUEIRA, R. C. **Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2006. 41 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E. B.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, out. 2008.

PAIVA NETO, V. B. de; PAIVA, R.; GOMES, G. C. A.; PÓVOA, J. S. R. Comportamento *in vitro* de segmento nodal de moreira [*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud]. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 40, n. 1, p. 135-141, jan. 1997.

PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1996. 223 p.

PEREIRA, R. de C.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; BERTOLLUCI, S. K. V. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (unha de gato). **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 69-77, dez. 2007.

SANTOS, C. G. dos; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar RUBI. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 571-577, maio/jun. 2003.

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.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 833-840, out. 2000.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, N. V.; ALCANFOR, J. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 337-341, set. 2003.

SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 76, n. 1, p. 53-60, Jan. 2004.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture:** techniques and experiments. San Diego: Academic, 1992. 171 p.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.]**. 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

STEIN, W.; MOORE, S. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 176, n. 2, p. 367-372, Nov. 1948.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 881 p.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 18-27, 2005.

WETTLAUFER, S. H.; LEOPOLD, A. C. Relevance of amadori and maillard products reactions to seed deterioration. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 1, p. 165-169, Sept. 1991.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, July 1954.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CALOS DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)

1 RESUMO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa de grande interesse na cadeia agroenergética brasileira. No entanto, os conhecimentos que envolvem a morfogênese *in vitro* da espécie são inexistentes. Com o intuito de contribuir para a explanação desse conhecimento, objetivou-se analisar calos de pinhão-manso, em função de sua curva de crescimento, via microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). Folhas cotiledonares obtidas *in vitro* foram inoculadas em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. A coleta de amostras para microscopia eletrônica foi realizada ao acaso, em intervalos de 7 dias, até 112 dias de cultivo. Cada amostra foi fixada em Karnovisk e preparada para visualização em microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Pela MEV entre 77 e 90 dias de cultivo, observou-se a formação de embriões em estágio globular e codiforme nas massas calogênicas, mas estes não prosseguiram seu desenvolvimento. Tanto as fotomicrografias da MEV quanto da MET permitiram inferir que o melhor período de repicagem deve ser aos 28 dias, dando respaldo à curva de crescimento de calos de *J.curcas*.

Palavras Chave: calogênese, *in vitro*, microscopia, curva de calos.

2 ABSTRACT

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is an oilseed of great interest in the Brazilian agro-energy chain. However, the skills involved in morphogenesis *in vitro* of the species are absent. In order to contribute to the explanation of this knowledge, aimed to analyze callus physic nut, according to its growth curve, electron microscopy (SEM) and transmission (TEM). Cotyledons grown *in vitro* were inoculated on MS medium supplemented with 1.0 mg.L^{-1} 2,4-D. The collection of samples for electron microscopy was performed at random intervals of 7 days to 112 days of cultivation. Each sample was fixed in Karnovisk and prepared for viewing by scanning electron microscopy and transmission. Between 77 and 90 days of cultivation by the SEM, we observed the formation of globular-stage embryos and codiforme the masses of callus, but these did not continue their development. Both photomicrographs, SEM and TEMd allowed to infer that the best time for transplanting should be at 28 days, giving support to the growth curve of callus *J.curcas*.

Key-words: *in vitro*, microscopy, curve callus.

3 INTRODUÇÃO

Entre as opções de insumo para contribuir na cadeia energética, as oleaginosas como girassol, macaúba, mamona e pinhão-manso, são cotadas. O pinhão-manso vem ganhando espaço devido as suas características de rusticidade. Segundo Sachs (2007), o pinhão-manso pode ser cultivado em terras degradadas e semidesérticas; para Deore & Jhonson (2008), o teor de óleo nas sementes está em torno de 37%.

O pinhão-manso ainda demanda por estudos e algumas tecnologias podem ser aplicadas para esse auxílio, como a micropropagação e a microscopia eletrônica, tanto de varredura como de transmissão.

A micropropagação pode ser obtida por organogênese ou embriogênese somática. A micropropagação via embriogênese somática envolve o desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes *in vitro*.

A embriogênese compreende uma rota ontogênica que inicia o ciclo de vida das plantas superiores e seus estudos têm impacto direto sobre a produtividade agrícola (Cairney et al., 1999).

Apesar de importante para propagação massal clonal de genótipos superiores, utilizada para a obtenção de plantas transgênicas (Gama, 1993) e sementes sintéticas (Schultheis et al., 1990), o sucesso na conversão dos embriões somáticos em plantas apresenta entraves. Estes podem ser potencialmente elucidados utilizando-se das ferramentas de análises ultraestruturais. Segundo Nogueira et al. (2007), as análises ultraestruturais, através da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, têm sido utilizadas em vários estudos de embriogênese somática para fornecer maiores detalhes da morfologia interna e externa de tecidos embriogênicos.

Como a conversão de embriões somáticos em plantas pode apresentar obstáculos ainda não esclarecidos, análises ultraestruturais são benévolas. Nesta perspectiva, o trabalho objetivou analisar calos de pinhão-manso, em função de sua curva de crescimento, via microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Utilizou-se, como material vegetal, sementes colhidas na safra de 2008, provenientes da matriz Oracília, do banco germoplasma de campo comercial do município de Janaúba (MG), cedidas pela empresa NNE Minas Agroflorestal. Para manutenção da qualidade das sementes, estas foram armazenadas 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.

Plantas obtidas por meio de germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes foliares, que foram seccionados em média com 1cm² por meio de bisturi, em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar. Tais seções foram inoculadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. O meio foi preparado com adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 5,5 g.L⁻¹ de ágar, antes de serem autoclavados a 121°C por 20 min. Posteriormente as culturas foram acondicionadas em armário de metal, propiciando ausência de luz, em sala de crescimento a 25±2°C.

A coleta de amostras para microscopia eletrônica foi realizada ao acaso, em intervalos de 7 dias, seguindo a curva de crescimento de calos, até 112 dias de cultivo. A preparação e observação das amostras para microscopia foram realizadas no laboratório de microscopia eletrônica e análise ultraestrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Tanto para MEV quanto MET, porções do tecido vegetal com aproximadamente 1cm² de cada tratamento foram cortados e imersos em solução fixadora (fixador Karnovsky modificado - Glutaraldeído 2,5%, formaldeído

2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M) por um período de 24 horas. Após esse período, foi feita a lavagem da amostra pré-fixada em aldeído com três passagens de cerca de 10 min em tampão cacodilato 0,05M e imersão em uma solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 por 1 hora a temperatura ambiente em uma capela de exaustão. As amostras fixadas em OsO₄ foram lavadas com água destilada e, a seguir, submetidas a soluções de concentração crescente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%) para serem desidratadas, permanecendo cerca de 10 min em cada uma, sendo que a imersão na solução 100% ocorreu por três vezes (Alves, 2004).

Em seguida, para a análise de MEV, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico para completar a secagem, fez-se a montagem dos *stubs* e levados ao Sputtering para o banho de ouro. O material foliar preparado foi observado e eletromicrografado em Microscópio Eletrônico de Varredura Leo Evo 40.

Para a análise em microscopia eletrônica de transmissão, após desidratação em acetona, foi realizada inclusão em resina inicialmente a 30% e 70%, por 8 h e 12 h respectivamente. Posteriormente, as amostras passaram duas vezes por resina 100% por 24 h cada vez, sendo o material colocado em molde adequado e conduzido para polimerização em estufa a 70°C por 48 h. Após a ultramicrotomia, as secções ultrafinas foram conduzidas para telas e procedeu-se a contrastação em acetato de uranila e citrato de chumbo. A observação e eletromicrografia dos espécimes foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 109.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelas fotomicrografias de MEV, observa-se que as células no dia da inoculação têm formato arredondado e elevada quantidade de cera (Figura 1). Segundo Appezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro (2003), o formato isodiamétrico é característico de células meristemáticas. Assim infere-se que o complexo de células neste cultivo inicial são embriogênicas, pois com respaldo de Tomes (1985) é conhecido que os calos embriogênicos são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas. Como essa massa calogênica advém de duas repicagens em meio MS contendo 1mg.L^{-1} de 2,4-D, tal evento se torna possível, pois o 2,4-D é a auxina mais comumente utilizada em trabalhos que visem calogênese ou embriogênese, ao lado, mais recentemente, do TDZ. Segundo Zuo et al. (2002), o 2,4-D exerce a função de indutor da embriogênese somática.

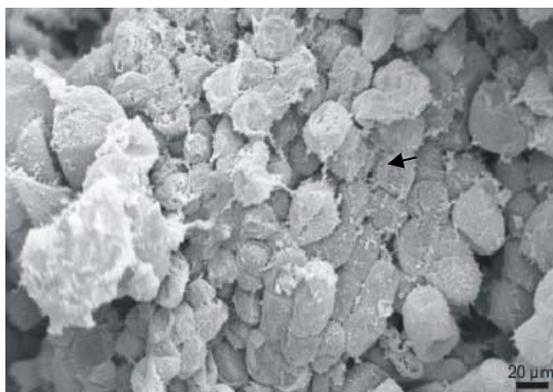


FIGURA 1 Células arredondadas, visualizadas via eletromicrografias de varredura, de calos de *J. curcas*, desenvolvidos com 1mg.L^{-1} de 2,4-D, evidenciando o aspecto isodiamétrico das células no tempo 0, ou seja, o dia da inoculação.

No entanto, tal característica esférica não se manteve nos períodos seguintes de cultivo (Figura 2A-D). Provavelmente, o estresse provocado à massa calogênica, advindo do processo de repicagem, fez com que a célula retomasse seu processo de divisão, renovando a massa celular, em vez de continuar a conversão dos agregados esféricos em futuros embriões. Também deve-se considerar o estímulo de 2,4-D a que os calos foram submetidos. Em muitas espécies, o processo de iniciação à embriogênese é verificado ao se cultivar o explante em meio com concentração relativamente elevada de 2,4-D, enquanto o subsequente desenvolvimento dos embriões somáticos ocorre, após transferência do calo para meio com baixa concentração de auxinas, ou mesmo desprovido delas (Halperin & Wetherell, 1964). Fato que não ocorre no presente trabalho devido à metodologia do experimento, que segue a curva de crescimento de calos.

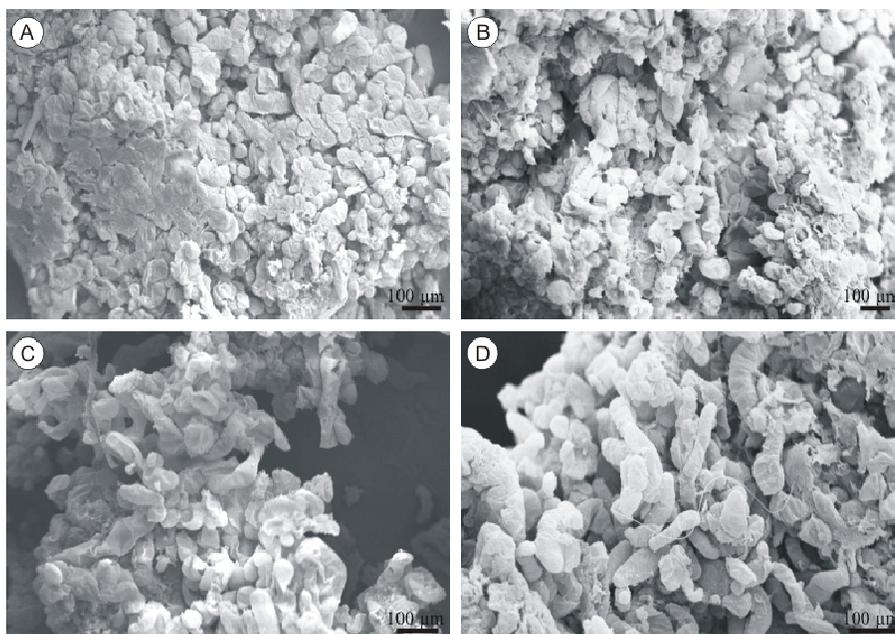


FIGURA 2 Células alongadas, visualizadas via eletromicrografias de varredura, de calos de *J. curcas*, desenvolvidos sob 1 mg.L^{-1} de 2,4-D. A - 7 dias de cultivo; B - 14 dias de cultivo; C - 21 dias de cultivo; D - 28 dias de cultivo.

A repicagem a que os calos foram submetidos antes da iniciação da curva envolviam um período de 30 dias. É justamente ao final de um período semelhante, mais exatamente 35 dias, que novamente foram observadas células com formato isodiamétrico semelhante àquelas do dia da inoculação, tal formato se mantém até o final do cultivo (Figura 3 A-M). Provavelmente 35 dias é o tempo que o 2,4-D leva para se esgotar ou atingir a concentração mínima, tal que permite ao complexo celular a expressão das características embriogênicas induzidas durante a fase de alta concentração deste regulador.

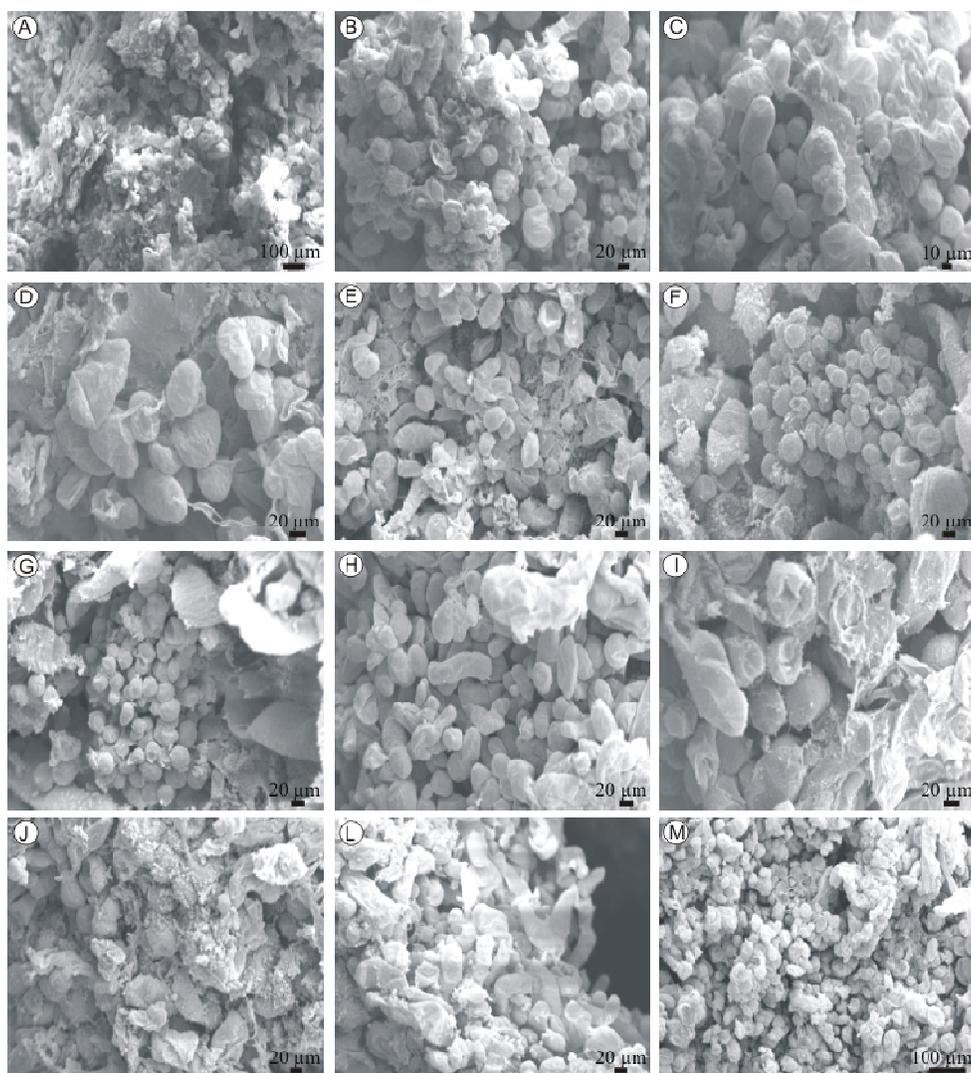


FIGURA 3 Células arredondadas, visualizadas via eletromicrografias de varredura, de calos de *J. curcas*, desenvolvidos sob 1 mg.L^{-1} de 2,4-D. A – 35 dias de cultivo; B – 42 dias de cultivo; C – 49 dias de cultivo; D – 56 dias de cultivo; E – 63 dias de cultivo; F – 70 dias de cultivo; G – 77 dias de cultivo; H – 84 dias de cultivo; I – 91 dias de cultivo; J – 98 dias de cultivo; L – 105 dias de cultivo; M – 112 dias de cultivo.

Nesse intervalo de tempo, dos 7 aos 28 dias, as células apresentaram conformação alongada (Figura 2A-D). Ela é justamente antagônica às células embriogênicas, as quais são arredondadas, pois possuem citoplasma denso devido ao ativo metabolismo de células meristemáticas.

Portanto, logo após os 35 dias de cultivo, as células retomam a característica esférica (Figura 3A-M). Esse período corresponde à fase estacionária da curva de calos e, segundo Pereira et al. (2007), é nesta fase em que há maior número de células com menor capacidade de divisão celular e a célula entra em estágio de diferenciação.

Foram observadas estruturas embriogênicas a partir dos 77 dias de cultivo. Ou seja, após aproximadamente um mês sob condições de baixa concentração ou ausência de 2,4-D, o processo de desenvolvimento atingiu a primeira fase da diferenciação de um embrião somático, o estágio de embrião globular (Figura 4A - B). Ferreira et al. (2005), também utilizando-se da MEV, observaram tal morfologia de embrião, trabalhando com embriogênese somática em cupuaçu sob efeito de TDZ.

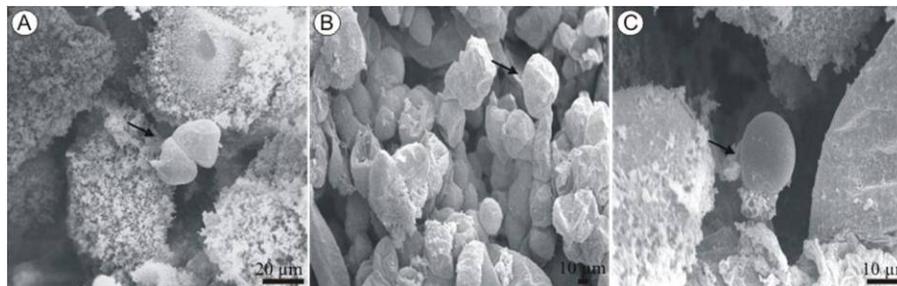


FIGURA 4 Eletromicrografias de calos de *J. curcas* desenvolvidos sob 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, mostrando detalhes de embriões somáticos em estágio globular. A - 77 dias de cultivo; B - 84 dias de cultivo; C - 98 dias de cultivo.

A análise visual dos calos pode ser realizada pela Figura 5A-C. Aos 45 dias observam-se pequenas protuberâncias translúcidas, as quais evoluíram para estruturas globulares aos 90 dias. Como nas fotomicrografias de varredura observaram-se estruturas globulares aos 77 dias, provavelmente estas continuaram a se desenvolver e tornaram-se perceptíveis a olho nu por volta dos 90 dias de cultivo. Simultaneamente a esse período, foram observadas estruturas em formato codiforme que é o segundo estágio de desenvolvimento do embrião somático (Figura 5C).

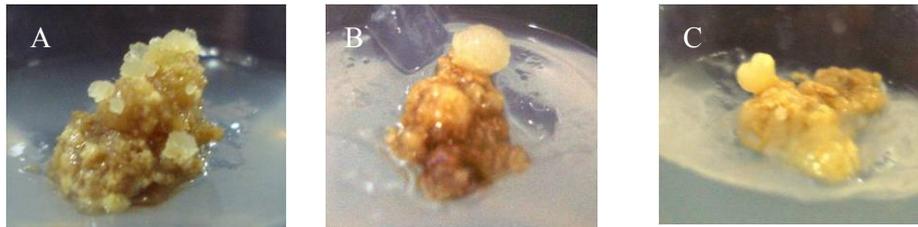


FIGURA 5 Calos de *J. curcas* cultivados com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D. A – 45 dias de cultivo; B e C – 90 dias de cultivo.

Visualmente detectou-se embrião em estágio codiforme, enquanto pela varredura, somente o embrião globular foi observado. Durante o processo de varredura da amostra nem todos os campos são averiguados, por isso a não visualização do embrião em estágio codiforme pela MEV não significa, necessariamente, sua ausência na massa calogênica

A despeito da MET, esta é uma ferramenta de análise subcelular, que propicia inferências mais precisas quanto ao desenvolvimento. Mediante a MET dos calos da curva de crescimento de *J. curcas*, observa-se que as células do tempo 0, ou seja, da massa calogênica no dia da inoculação, e do tempo 1, aos 7 dias da inoculação, possuem vacúolos grandes e parede celular estreita (Figura 6A). De modo geral, as células apresentam-se pouco preenchidas no que diz respeito às organelas, tendo aspecto degradado, com sistema celular

desorganizado e citoplasma estreito, o qual é comprimido contra a parede celular pelo vacúolo (Figura 6 B-D). Esta última observação também foi feita por Canhoto et al. (1996), que cita que células de pró-embriões podem ser tão vacuoladas, mostrando apenas um fino citoplasma entre o tonoplasto e a membrana plasmática.

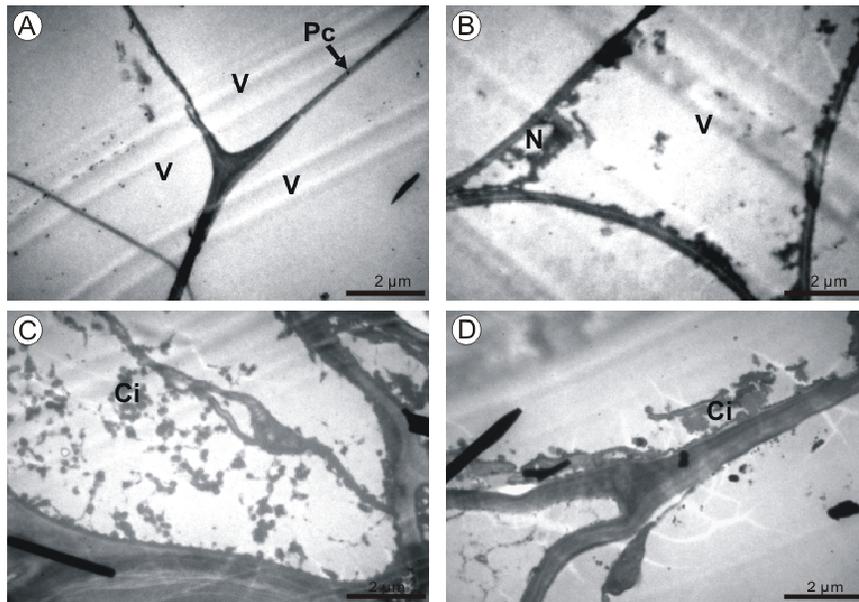


FIGURA 6 Eletromicrografias de calos de *Jatropha curcas*, ao 0 e aos 7 dias, desenvolvidos sob 1 mg.L^{-1} de 2,4-D. A- vacúolos grandes (v) e parede celular fina (Pc) ; B – célula com aspecto vazio; C – célula com sistema celular desorganizado; D – citoplasma estreito (Ci), comprimido pelo vacúolo contra a parede celular.

Segundo Filonova et al. (2000), a vacuolização é um dos primeiros sinais de morte celular e para Taiz & Zeiger (2004) em nível citológico, algumas organelas são destruídas e outras permanecem ativas. Fukuda (2000) tem pensamento semelhante relatando que o colapso do vacúolo permite a liberação de enzimas hidrolíticas que atacam as organelas, interferindo na organização celular. Segundo ainda este autor, uma célula senescente degrada primeiramente

o cloroplasto, de forma lenta, permitindo o fornecimento do digerido a células de novos órgãos em desenvolvimento, o rompimento do vacúolo ocorre mesmo somente no final da morte da célula.

No presente trabalho, a massa calogênica é advinda da fase final de um cultivo anterior, procedendo-se o aspecto degradado, a presença de grandes vacúolos ou ainda baixo índice de organelas. Para Junqueira & Carneiro (1997), a menor ocorrência de organelas é uma característica de células meristemáticas ou embrionárias. Essa baixa ocorrência de organelas também foi relatada por Nogueira et al. (2007), em calos embriogênicos de murici-pequeno, igualmente no início do cultivo.

Apesar das características subcelulares aos 0 e 7 dias mostrarem características de embriogênese ou senescência, os demais períodos avaliados mostram evolução celular positiva. Isso é devido à característica de regeneração das células vegetais quando submetidas a um novo estímulo, seja por dano físico (corte) e/ou submissão a um regulador de crescimento. Segundo Taiz & Zeiger (2004), os tecidos vegetais possuem capacidade de rejuvenescimento devido a características inerentes a estas células de totipotencialidade.

O aspecto subcelular, demonstrado pela MET nos calos de 0 aos 7 dias de cultivo, como escassez de organelas, vacúolos grandes, e outros, inferem à massa calogênica baixa divisão celular, condizendo com o período de 0 a 7 dias da curva de calos que corresponde à fase lag. Tal fase se estabelece justamente devido a baixos níveis de divisão das células, que culminam por não ocasionar ganho em massa, promovendo um pequeno platô na curva.

Vale ressaltar que no todo da massa calogênica há células em diversos estágios. Aquelas que estavam em senescência e que eram maioria continuaram tal processo. Já as células mais jovens, que são normalmente as da periferia do calo, apesar de poucas, foram o suficiente para renovar a massa calogênica nos demais períodos de cultivo, fato que pode ser observado na Figura 7.

Aos 14 dias de cultivo observam-se células menores, a princípio ainda são desorganizadas principalmente com relação ao núcleo, o qual vai tomando forma com o decorrer dos dias (Figura 7 A-C). Ao final deste período é possível a detecção de mitocôndrias ainda em formação, evidenciado pela presença de invaginações, demonstrando que o metabolismo respiratório da massa calogênica está se ativando (Figura 7 D).

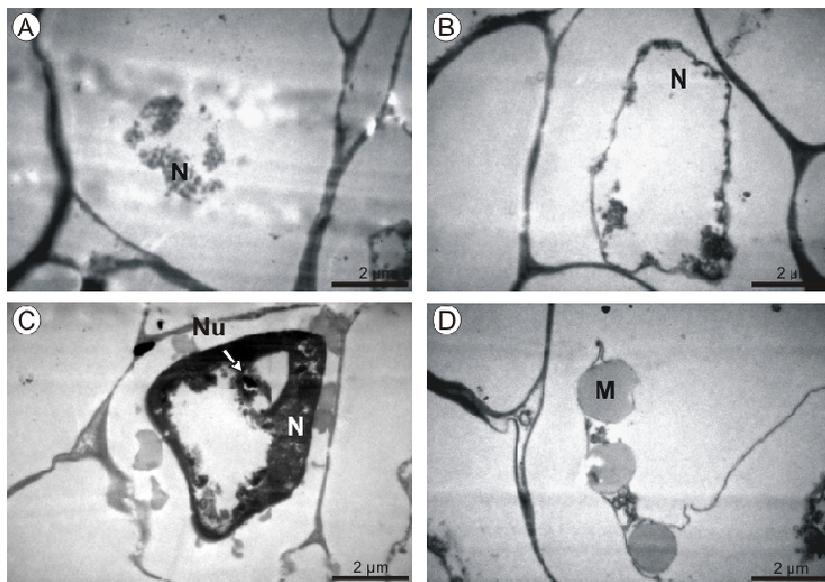


FIGURA 7 Eletromicrografias de transmissão de calos de *J. curcas*, aos 14 dias, desenvolvidos sob 1 mg.L^{-1} de 2,4-D. A e B- célula com núcleo (N) em organização; C – célula já com o nucléolo proeminente (Nu); C – Presença de mitocôndrias (M).

O metabolismo respiratório funcional é importante, pois é através da respiração que a sacarose, previamente adicionada ao meio de cultura, será incorporada à glicólise. O catabolismo da sacarose em açúcares menores formará ATPs necessários para suprir toda a demanda energética da célula em seus processos anabólicos.

Com o metabolismo respiratório do calo ativo, pode-se reiniciar o processo de divisão celular renovando o complexo celular da massa calogênica. Por isso, é possível observar uma fase de crescimento exponencial na curva dos calos de *J. curcas* a partir dos 14 dias.

Pela Figura 7 D observa-se, também, que as mitocôndrias possuem formato esférico e, segundo Canhoto et al. (1996), em células embriogênicas as mitocôndrias são arredondadas, enquanto em células não embriogênicas, elas são alongadas. Mitocôndrias com formato arredondado, oval ou isodiamétrico também foram observadas por Nogueira et al. (2007), em calos de murici-pequeno e em calos de ingazeiro cultivados sob TDZ, em trabalho conduzido por Stein (2006).

Aos 21 dias, novamente foi possível a detecção de mitocôndrias, mas com um ganho, a visualização das cristas mitocondriais (Figura 8 A). As cristas são pregas da membrana interna da mitocôndria, pois essa organela é formada por uma membrana externa e outra interna, constituindo um espaço intermembrana entre elas. Nas cristas ocorrem algumas das reações de transporte de elétrons e síntese de ATP, importantíssimas para a respiração aeróbia. No espaço delimitado pela membrana interna, encontra-se a matriz mitocondrial que possui várias enzimas e outros compostos envolvidos no ciclo de Krebs, também importantíssimo para a respiração aeróbia, gerando os precursores NADH e FADH₂ utilizados na cadeia de transporte de elétrons (Castro et al., 2009).

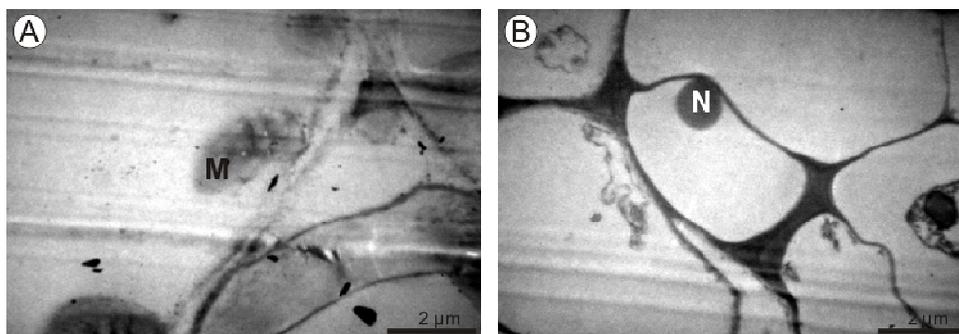


FIGURA 8 Eletromicrografias de transmissão de calos de *J. curcas*, aos 21 dias, desenvolvidos sob 1 mg.L^{-1} de 2,4-D. A – visualização de mitocôndria e suas cristas (M); B – Célula com núcleo bem definido (N).

Com 21 dias de cultivo foi possível perceber que o núcleo celular estava organizado em sua plenitude, impulsionando assim o crescimento linear observado na curva de crescimento dos calos de *J. curcas*. Segundo Castro et al. (2009), o núcleo possui papel central em todos os processos metabólicos, ele é uma organela típica das células eucarióticas, encerrando o genoma destas e estando relacionado à síntese de proteínas e divisão celular.

Com o passar do tempo, a célula vai ganhando em nível de organização. Aos 28 dias detecta-se núcleo com nucléolo proeminente, mitocôndrias, pequenos vacúolos, retículo endoplasmático e parede celular espessa (Figura 9 A).

O espessamento da parede é um indício de que a célula diminuiu suas divisões celulares. Para Castro et al. (2009) paredes espessas podem dificultar (retardar e até impedir) as divisões celulares. Isso explica o crescimento estacionário obtido na curva de calos de *J. curcas* a partir dos 28 dias de cultivo.

O observado está em acordo com o período de repicagem recomendado na curva de calos de *J. curcas*, pois esta técnica metodológica só deve ser realizada quando a célula apresenta nível organizacional o mais completo possível, o qual de acordo com a MET ocorre aos 28 dias.

Neste período também se observou a presença de corpos lipídicos (Figura 9 B). De acordo com Castro et al. (2009), lipídeos podem constituir-se em reserva e serem convertidos em glicose, como substrato na respiração, o que é muito comum em sementes.

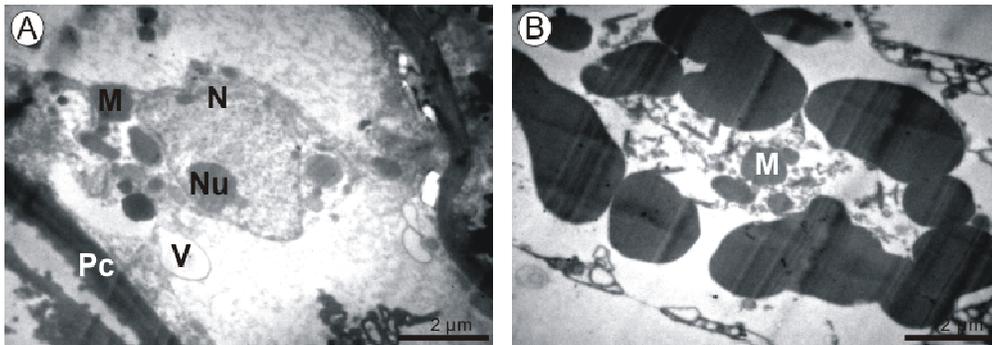


FIGURA 9 Eletromicrografias de transmissão de calos de *J. curcas*, aos 28 dias, desenvolvidos sob 1 mg.L^{-1} de 2,4-D. A – célula em completa organização (N- núcleo; Nu- nucléolo; M – mitocôndria; V- vacúolo; Re- retículo endoplasmático; e Pc- parede celular); B – corpos lipídicos (CL).

Sete dias após o término da fase estacionária, ou seja, entrando na fase de declínio da curva de calos de *J. curcas*, aos 84 dias de cultivo, observa-se novamente um desarranjo celular. Stein (2006) trata esse desarranjo celular como células inviáveis, apresentando núcleo irregular, poucas organelas e presença de amiloplastos (Figura 10 A). Isto pode ser decorrente do longo período de cultivo a que as culturas foram submetidas, devido à metodologia demandada no presente experimento, demonstrando que períodos tão longos não devem ser mantidos, pois prejudicam a cultura a nível subcelular.

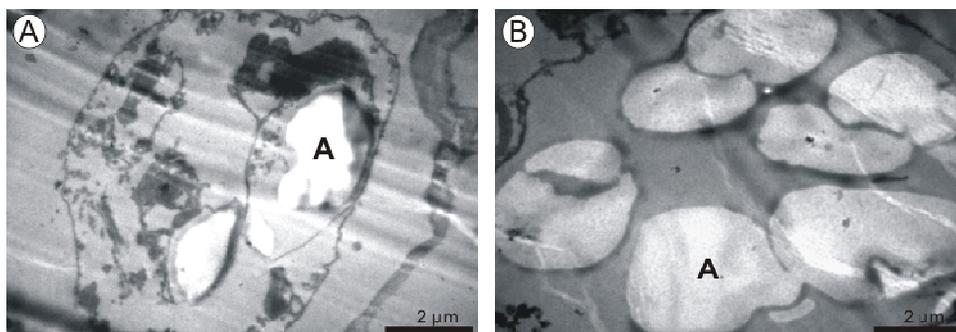


FIGURA 10 Eletromicrografias de transmissão de calos de *J. curcas*, aos 84 dias, desenvolvidos sob 1 mg.L^{-1} de 2,4-D. A – célula desorganizada e com amiloplasto (A); B – amiloplastos (A).

No intervalo de 77 e 90 dias de cultivo, pelo aspecto visual e pela MEV, observou-se a formação de estruturas globulares e codiformes, as quais não prosseguiram seu desenvolvimento. Provavelmente, como as células não estavam com organização a nível subcelular adequada, devido ao longo período de cultivo sem a troca de meio de cultura, estas não apresentavam mais condição de promover suas reações de síntese para diferenciação. Assim, as estruturas formadas foram catabolizadas em função da manutenção da célula.

A célula nessa fase passou somente a sobreviver, o que se estendeu ainda por um período, até 112 dias, pois como demonstrado na Figura (10 A-B) ela possui amiloplastos, reservas de amido que foram degradados para a sua vitalidade. Segundo Ho & Vasil (1983), a presença de grãos de amido podem ser utilizados como marcadores iniciais do potencial embriogênico. Stein (2006) aceita essa informação, ressaltando a necessidade de sucessivas repicagens para a seleção de células vivas. De forma contrária, Häsler et al. (2003) identificaram a presença de muitos amiloplastos contendo grãos de amido em células cultivadas por longos períodos *in vitro*, associando esse fato à perda da capacidade regenerativa da célula.

Portanto, pela análise de MET fica justificado o comportamento exibido na curva de crescimento e esclarecido o porquê do não desenvolvimento subsequente das estruturas embriogênicas dos calos de *J. curcas*.

Para se obter as demais fases de diferenciação dos embriões somáticos, é necessário o subcultivo para novo meio, que suprirá a demanda nutricional do embrião, pois deve-se considerar que o meio de cultura após 112 dias de cultivo está nutricionalmente deficiente. De acordo com representação esquemática para a indução e modulação da embriogênese somática (Figura 11), adaptado de Durzan (1988) e Guerra et al. (1999), este trabalho se localiza no ciclo A (condições básicas para a obtenção de ciclos repetitivos de divisão celular), para o desenvolvimento mais avançado dos embriões somáticos, devemos passar para o ciclo B (condições básicas para a progressão e maturação dos embriões somáticos e posterior regeneração de plantas).

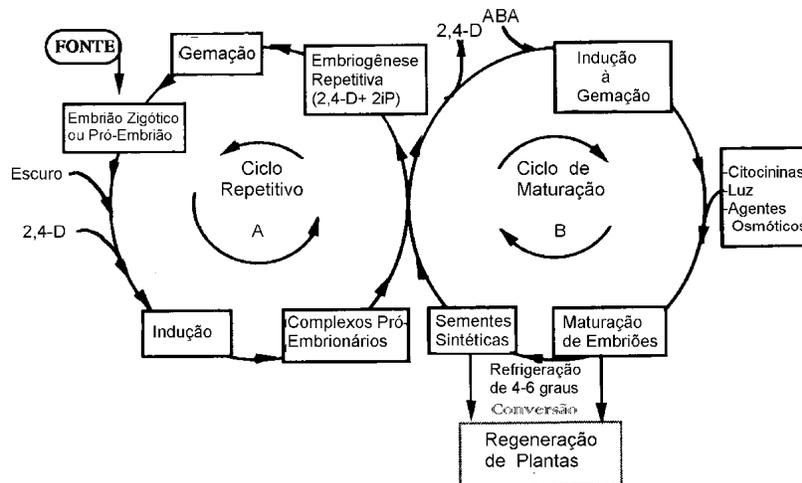


FIGURA 11 Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática. Adaptado de Durzan (1988).

Portanto, o recomendado seria a retirada total do 2,4-D ou adição de citocinina, pois algumas espécies têm essa demanda; a passagem e manutenção para ambiente iluminado e adição de ABA (ácido abscísico) para a maturação dos embriões somáticos. Com isso, sugere-se que novos trabalhos sejam conduzidos, partindo do protocolo até aqui estabelecido, visando o progresso dos embriões somáticos de *J. curcas* obtidos.

6 CONCLUSÕES

Pela MEV e análise visual, entre 77 e 90 dias de cultivo, embriões em estágio globular e codiforme estão em formação nas massas calogênicas de *J. curcas*, os quais não prosseguiram no desenvolvimento.

Pela MET estruturas globulares e codiformes são observadas no período que corresponde à organização inadequada a nível subcelular.

A MEV e MET dão respaldo à curva de crescimento de calos de *J. curcas*, indicando que o melhor período de repicagem deve ser aos 28 dias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2003. 438 p.
- CAIRNEY, J.; XU, N.; PULLMANN, G. S.; CIAVATTA, V. T.; JOHNS, B. Natural and somatic embryo development in loblolly pine. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 77, n. 1/3, p. 5-17, Mar. 1999.
- CANHOTO, J. M.; MESQUITA, J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, London, v. 78, n. 4, p. 513-521, Oct. 1996.
- CASTRO, E. M. de; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: Ed. UFLA, 2009. 234 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**, Japan, v. 2, n. 1, p. 7-11, Apr. 2008.
- DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, Newcastle Upon Tyne, v. 6, n. 11, p. 341-378, 1988.
- FERREIRA, M. das G. R.; CARVALHO, C. H. S. de; CARNEIRO, A. de A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 500-503, dez. 2005.
- FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; ARNOLD, S. V. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 343, p. 249-264, Feb. 2000.
- FUKUDA, H. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 44, n. 3, p. 245-253, Oct. 2000.

GAMA, M. I. C. S. **Produção de plantas transgênicas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) por transformação de calos embriogênicos através de *Agrobacterium tumefaciens***. 1993. 130 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1999. v. 2, p. 533-568.

HALPERIN, W.; WETHERELL, D. F. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot. *Daucus carota*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 51, n. 3, p. 274-283, Mar. 1964.

HÄSLER, J.; WÜEST, J.; GASPAR, T.; CRÈVECOEUR, M. Long term *in vitro*-cultured plant cells show typical neoplastic features at the cytological level. **Biology of the Cell**, Paris, v. 95, n. 6, p. 357-364, Sept. 2003.

HO, W.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L) I. The morphology na physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, New York, v. 118, n. 23, p. 169-180, Oct. 1983.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, 1997. 299 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultraestrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 48-50, jul. 2007.

PEREIRA, R. de C.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; BERTOLLUCI, S. K. V. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *uncaria guianensis* J. F. GMEL. (unha de gato). **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 69-77, dez. 2007.

SACHS, I. A revolução energética do século XXI. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 21 n. 59, p. 21-38, jan./abr. 2007.

SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Imprensa Nacional, 1990. p. 200-212.

STEIN, V. C. **Micropropagação, índice mitótico e análise ultraestrutural de calos de ingazeiro (*Inga Vera Wild. subsp. Affinis* (DC) T.D. Penn.)**. 2006. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 179 p.

TOMES, D. T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S. W.; JONES, M. G. K. (Ed.). **Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture**. Boston: Nijhoff/Junk, 1985. p. 175-203.

ZUO, J. R.; NIU, Q. W.; FRUGIS, G.; CGUA, N. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 349-359, May 2002.

CAPÍTULO 5

ANÁLISE CITOQUÍMICA E VIABILIDADE CELULAR EM CALOS DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)

1 RESUMO

Dentre as fontes de biomassa prontamente disponíveis, os óleos vegetais têm sido largamente investigados como candidatos promissores aos programas de energia renovável, pois proporcionam uma geração descentralizada de energia. O pinhão-manso, como oleaginosa, tem despertado interesse de produtores, governos e instituições de pesquisa. A pesquisa busca o desenvolvimento de tecnologia agronômica possibilitando sua ampla utilização como cultura agroenergética. A cultura de tecidos é uma dessas tecnologias e para contribuir com o melhor estabelecimento da cultura *in vitro*, técnicas citoquímicas, visando identificação do potencial morfogenético e a viabilidade celular, inferindo sobre vivacidade destas culturas, podem ser utilizadas. Nesta perspectiva, o trabalho objetivou analisar calos de pinhão-manso, em função de sua curva de crescimento, visando a identificação de massas pró-embriogênicas por meio de análises citoquímicas pela dupla coloração carmim acético (C.A.) / azul de evans (A.E.) e a mensuração da viabilidade celular destas culturas, via trifeniltetrazólio (CTT). O período de expressão do potencial embriogênico nas massas calogênicas de *J.curcas* ocorre de 21 aos 70 dias de cultivo e o maior índice de viabilidade ocorre no dia da inoculação e posteriormente aos 28 e 35 dias de cultivo. Os intervalos identificados como positivos pelas ferramentas acima envolveram o período de 28 dias, período recomendado pela curva de crescimento de calos como o mais aconselhável à repicagem, portanto as técnicas C.A., A.E. e CTT dão respaldo e confirmam tal período para repicagem dos calos de *J.curcas*.

Palavras Chave: carmim acético, azul de evans, Trifeniltetrazólio.

2 ABSTRACT

The sources of readily available biomass, vegetable oils have been widely investigated as promising candidates for renewable energy programs, because they provide a decentralized power generation. The physic nut as oleaginous has attracted the interest of producers, governments and research institutions. The research aims to develop the agronomic technology enabling their widespread use as agro-energy culture. Tissue culture is one such technology and to contribute to better crop establishment *in vitro*, cytochemical techniques, aiming at identification of morphogenetic potential and cell viability, implying alertness on these crops can be used. Accordingly, the study aimed to evaluate callus physic nut, according to their growth curve for the identification of pro-embryogenic masses by cytochemical analysis by double staining with acetic carmine (AC)/evans blue (EB) and measurement of cell viability of these cultures, through triphenyltetrazolium (TTC). The period of expression of embryogenic potential in the masses of callus of *J.curcas*, occurs in 21 to 70 days of cultivation and the higher rate of viability occurs on the day of inoculation and subsequently at 28 and 35 days of cultivation. The intervals identified as positive by the tools above involving the 28 days, period recommended by the curve of growth of callus as the most advisable to transplant, so the techniques AC, EB and TTC give support and confirm this period for transplanting the callus *J. curcas*.

Key-words: acetic carmine, evans blue, triphenyltetrazolium.

3 INTRODUÇÃO

O pinhão-manso, como oleaginosa, tem despertado interesse dos produtores, do governo e das instituições de pesquisa (Nery et al., 2009), abrindo amplas perspectivas para o aumento das áreas de plantio com esta cultura, no território nacional, principalmente no semi-árido nordestino (Arruda et al., 2004).

Mas, como o pinhão-manso ainda é uma planta em domesticação no território nacional, tecnologia agrônômica deve ser desenvolvida para possibilitar sua ampla utilização como cultura agroenergética.

A cultura de tecidos é uma dessas tecnologias, pois é uma técnica que tem incrementado as pesquisas, básica e aplicada, em plantas superiores (Costa, 1995). Para contribuir com o melhor estabelecimento da cultura *in vitro*, técnicas citoquímicas e de viabilidade celular podem ser utilizadas.

Massas calosas e pró-embriônicas desenvolvidas no cultivo *in vitro* podem ser distinguidas por características citoquímicas, através da dupla coloração carmim acético e azul de evans que, segundo Munhoz et al. (2008), tem a vantagem de ser uma técnica rápida e eficiente. Steiner et al. (2005) afirmam que o uso dos corantes carmim acético e azul de evans possibilitam a diferenciação de culturas embriônicas. Células que reagem fortemente ao carmim acético e fracamente ao azul de evans são embriônicas e células com reação fraca ao primeiro e intermediária ao segundo são células calosas. De acordo com Báez et al. (2002) e Pline et al. (2002), estes corantes refletem a integridade das estruturas celulares como o núcleo e a membrana plasmática.

A identificação do potencial embriônico é possível, pois as células embriônicas que apresentam citoplasma denso são isodiamétricas e reativas ao carmim acético, resultando em coloração avermelhada. Associa-se essa reação com a competência celular para o desenvolvimento embriônico e integridade

cromossômica (Steiner et al., 2005; Munhoz et al., 2008). Já o azul de Evans age penetrando através de rupturas da membrana, de células que estão em processo de morte celular. Segundo Silva & Yuffá (2006), o azul de Evans é reduzido transformando-se em incolor em células vivas, enquanto nas células mortas a redução não ocorre e elas ficam azuis. Morfologicamente, células com sinais de morte celular têm alto grau de vacuolização, e esta vacuolização configura à célula o formato alongado (Filonova et al., 2000; Bhargava et al., 2007). A relação morte celular e elevada vacuolização se dá segundo Fukuda (2000), porque o vacúolo se expande com o acúmulo de enzimas hidrolíticas, como proteases, que são liberadas para a degradação dos compostos celulares.

Com relação à viabilidade celular, esta é necessária para avaliar as condições da cultura (Silva & Yuffá, 2006). A viabilidade pode ser quantificada mediante o uso do cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (CTT), o tetrazólio. Este corante, ao ser inserido, pela respiração do tecido, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, é reduzido a um composto de coloração vermelha, o trifenilformazan ou simplesmente "formazan" (Amutha et al., 2007). Portanto, o CTT exercerá a função de último aceptor de elétrons, substituindo o oxigênio, dentro da cadeia transportadora de elétrons na membrana interna da mitocôndria (Amutha et al., 2007). O composto formado, o formazan, pode ser extraído por etanol e quantificado em espectrofotômetro (Zapata et al., 1991).

De acordo com Mikula et al. (2006), o teste de viabilidade celular mediante o uso do CTT, foi primeiramente utilizado em sementes. A descrição do uso deste no cultivo *in vitro* teve seu primeiro relato por Stein & Gerarde (1950) e posteriormente Towill & Mazur (1975). Tal teste é amplamente utilizado, inclusive para a avaliação da viabilidade celular em massas pró-embriogênicas.

Gracia-Medrano & Miranda-Ham (2003) têm recomendado enfaticamente o uso de um ensaio, com base na redução de sais de tetrazólio

para avaliar as alterações na viabilidade em culturas em suspensão de *Lycopersicon esculentum*, pois agem como indicador adequado de mudanças na atividade metabólica dos tecidos.

O CTT tem sido útil na avaliação de viabilidade em calos de *Arabidopsis thaliana* (O’Kane et al., 1996), em suspensões celulares criopreservadas de *Medicago sativa* (Shibli et al., 2001), de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) (Moges et al., 2004), células embriogênicas de *Vitis* spp. (Wang et al., 2004), massas pro-embriogênicas de murici-pequeno (Silva, 2009) e suspensões celulares de bananeira cv. prata anã (Lima, 2009).

A identificação do potencial morfogenético de culturas *in vitro*, para a conversão de embriões somáticos e a vivacidade destas culturas, pode fornecer informações importantes para a continuidade de trabalhos que visem a embriogênese somática. Nesta perspectiva, o trabalho teve como objetivo analisar calos de pinhão-manso, em função de sua curva de crescimento, visando a identificação de massas pró-embriogênicas por meio de análises citoquímicas via carmim acético (C.A)/azul de evans (A.E) e a mensuração da viabilidade celular destas culturas, com trifeniltetrazólio (CTT).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Utilizou-se, como material vegetal, sementes colhidas na safra de 2008, provenientes da matriz Oracília, do banco de germoplasma do campo comercial no município de Janaúba (MG), cedidas pela empresa NNE Minas Agroflorestal. Para manutenção da qualidade das sementes, estas foram armazenadas 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.

Plântulas obtidas por meio de germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes foliares, as quais tiveram suas folhas cotiledonares seccionadas em média com 1cm² por meio de bisturi, em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar. Tais seções foram inoculadas em tubo de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Capítulo 3). O meio foi preparado com adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 5,5 g.L⁻¹ de ágar, antecipadamente à autoclavagem que ocorreu a 121°C por 20 min. Posteriormente, as culturas foram acondicionadas em armário de metal, propiciando a ausência de luz, em sala de crescimento a 25±2°C.

Para elucidação do potencial morfogenético dos calos obtidos, foi realizada a análise citoquímica de uma fração do material. A coleta de amostras para as análises citoquímicas foi realizada ao acaso, em intervalos de 7 dias, seguindo a curva de crescimento de calos, até 112 dias de cultivo. Coletaram-se frações de 100mg de calos a cada período, as quais foram maceradas sobre vidro de relógio com auxílio de bastão, a este macerado adicionou-se três gotas do

corante azul de evans (A.E.) 0,1% por três minutos, seu excesso foi retirado e adicionadas três gotas do corante carmim acético (C. A.) 2% pelo mesmo tempo (Valente, 2007). Ao término foram montadas lâminas e destas foram feitas fotomicrografias via microscopia de luz Olympus BX 60 em objetiva de 10x, utilizando-se máquina fotográfica digital acoplada ao microscópio, localizado no Laboratório de Anatomia do Departamento de Biologia da UFLA. A análise das imagens foi realizada pela técnica RGB (Red, Green, Blue) e por meio da ferramenta histograma do Software *Adobe® Photoshop® CS3* versão 10.0.

A análise computacional RGB aplicada à citoquímica permite a identificação de diversas cores através das cores básicas iniciais: vermelho (Red), verde (Green) e azul (Blue). Computacionalmente cada cor é representada por números, ou seja, bits. Cada 8 bits constitui um byte, o byte é usado em sistema binário (2^8), permitindo 256 combinações. É intuitivo perceber que 0 é a ausência de uma cor, enquanto 256 é utilizar a cor na sua plenitude. Então, em RGB, amarelo é (256, 256, 0), preto é ausência de cor ou (0, 0, 0) enquanto branco é o conjunto de todas as cores ou (256, 256, 256).

Apesar deste Software analisar três intensidades de cores (vermelho, verde e azul), a análise estatística foi realizada somente com vermelho e azul, pois estes são os matizes resultantes dos corantes utilizados. Esta estatística também foi analisada por intermédio do teste Scott-Knott t, via Software *Sisvar®* (Ferreira, 2000).

A coleta de amostras para a análise de viabilidade celular também ocorreu em função da curva de crescimento de calos, ou seja, em intervalos de 7 dias durante 112 dias de cultivo.

Tubos foram coletados ao acaso, dos quais foi retirada uma amostra de 500 mg de calo, que foi subdividida em cinco amostras de 100 mg. Tais amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio, envolto por papel alumínio, o qual continha 3 mL do reagente cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (CTT) 0,6%,

preparado em solução tampão-fostato pH 7,4. A cultura foi incubada em tubos de ensaio por 24 horas, em ambiente escuro, a 28°C. Ao término da incubação, adicionou-se aos tubos de ensaio 7 mL de etanol 95% (v/v) e estes permaneceram por 4 minutos em banho-maria, para a extração do composto colorido, o formazan (Figura 1). Em seguida, o material foi centrifugado por duas vezes a 6000 rpm durante 20 minutos para separação dos sólidos, reservando o sobrenadante para as leituras de absorvância em espectrofotômetro tipo Beckman modelo DU[®] 640B, com comprimento de onda regulado para 490 nm. A viabilidade celular foi expressa como absorvância/g matéria fresca, de acordo com Benson (1994).

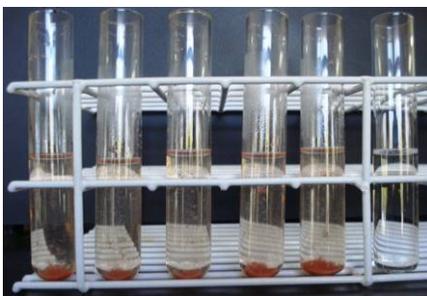


FIGURA 1 Extração de Formazan em calos de *J. curcas* desenvolvidos sob 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D. O último tubo de ensaio é o controle (sem calo) e os anteriores são as repetições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise estatística dos dados obtidos da avaliação das lâminas de calos de *J. curcas*, coradas com C.A. e A.E., observou-se que o corante C.A. reagiu de forma positiva aos 0, 28 e 35 dias (Figura 2).

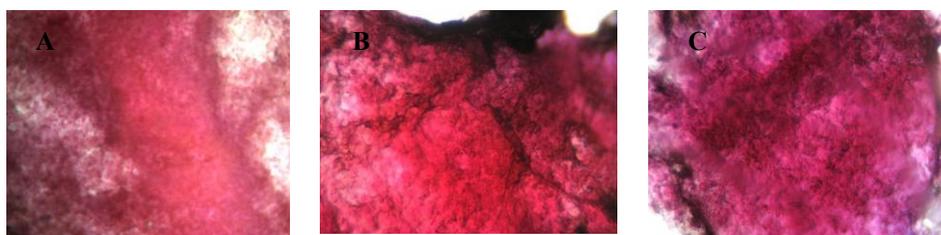


FIGURA 2 Massas calogênicas de *J. curcas* desenvolvidos sob 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, corados com carmim acético. A- 0 dias de cultivo; B- 28 dias de cultivo; C- 35 dias de cultivo.

De forma geral, observou-se que o corante C.A. reagiu de forma decrescente do dia da inoculação até aos 14 dias (Figura 3). Portanto, no início do cultivo a massa de calos apresenta baixo potencial embriogênico. Provavelmente esse comportamento deve-se ao fato da célula estar em processo de organização, fato observado pela MET no capítulo 4.

Pela MEV, as células até aos 14 dias apresentam formato alongado, exceto no dia da inoculação. Teoricamente, o comportamento de células alongadas é uma reação mais favorável ao A.E., pois estas células alongadas são muito vacuoladas e permeáveis a este corante (Filonova et al., 2000; Suarez et al., 2004; Steiner et al., 2005). Esta alta vacuolização procede e pode ser comprovada pela MET.

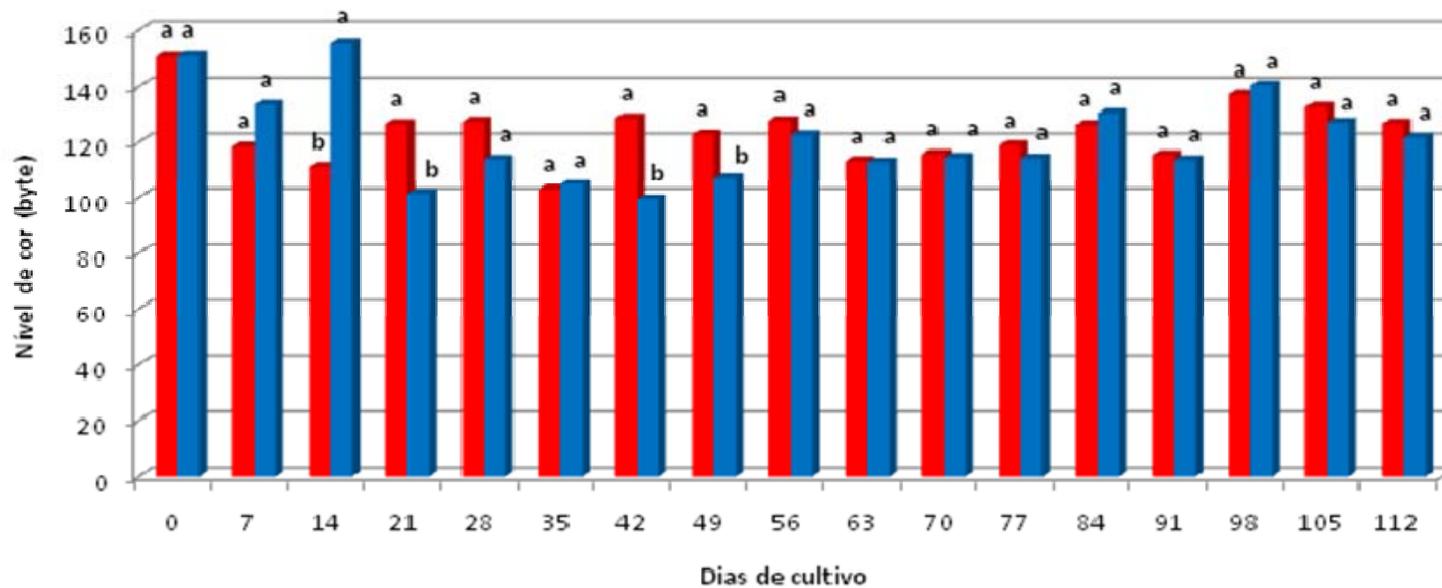


FIGURA 3 Imagem de lâminas de massas calogênicas de *J. curcas*, coradas com carmim acético (vermelho) e azul de Evans (azul), cultivadas em meio MS com 1mg.L^{-1} de 2,4-D. * Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Aos 21 dias, a intensidade de vermelho é estatisticamente superior à coloração azul, significando que o C.A. reagiu fortemente na massa de calos neste período de cultivo. A porcentagem de vermelho em função do C.A. é de 55,52%, enquanto para A. E. têm-se 44,48% de azul. Ressalta-se que o período de 21 dias precede a repicagem, que é recomendada com base na curva de crescimento de calos e aconselhada pela microscopia eletrônica, que ocorra aos 28 dias. Neste período de 28 dias têm-se 52,78% de vermelho em detrimento de 47,22% de azul, portanto o período de repicagem aos 28 dias procede, apesar de estatisticamente não existir diferença entre vermelho e azul neste período. Afinal, períodos superiores podem ocasionar danos no desenvolvimento embriogênico.

Aos 21 dias, de acordo com a MEV, as células exibem o aspecto alongado, portanto esperava-se que estas fossem mais reativas ao A.E., fato que não ocorre. A maior reatividade neste período é para o C.A., o qual de acordo com diversos autores cora células com formato isodiamétrico (Murashige & Skoog, 1962; Filonova et al., 2000; Fehér et al., 2003; George et al., 2008). Apesar dos resultados obtidos para este período de cultivo contradizerem a literatura, estes estão coerentes com os obtidos na presente pesquisa e em concordância com Silva (2009), que trabalhando com murici-pequeno, também identificou um período de cultivo, no caso o terceiro, o qual apesar de possuir células isodiamétricas, estas foram mais responsivas ao A.E. que ao C.A.; (Lima, 2009) também se utilizou desta ferramenta para caracterizar aglomerados celulares de bananeira cv. prata anã, e cita que as células do 2º subcultivo, apesar de não alongadas, foram mais reativas A.E.

Aos 28 dias, as células continuam com formato alongado, não sendo superiormente susceptíveis ao A.E. como esperado, na verdade há uma equivalência estatística na reação da massa de calos, tanto para o A.E. quanto para o C. A.

Novamente médias superiores para o corante C.A. ocorreram aos 42, 49 e 70 dias. Correlacionando esta resposta com o formato celular, novamente verifica-se resultado compatível com a literatura. As células neste período de cultivo apresentam-se arredondadas reagindo positivamente ao C.A., concordando com vários autores (Murashige & Skoog, 1962; Filonova et al., 2000; Fehér et al., 2003; George et al., 2008). De tal modo, fica pressuposto que assim como as células desenvolvidas aos 21 dias, as daqueles cultivos também exibem potencial embriogênico.

Nos períodos superiores aos 77 dias, a reação ao C.A. e ao A.E. nas massas calogênicas permanecem equivalentes. Apesar das células nesse período serem arredondas, elas não respondem de forma superior ao C.A. como esperado. Ou seja, nos períodos de cultivo finais, não é mais expressado o potencial embriogênico nas massas calosas de *J. curcas* o que é esperado, uma vez que este período equivale à fase de declínio da curva de calo.

Cangahuala-Inocente et al. (2007) propuseram-se a medir a competência embriogênica em tecidos florais de *Acca sellowiana*, utilizando-se da dupla coloração carmim acético/azul de evans, concluindo que as células destas culturas apresentavam-se redondas, pequenas e agrupadas, com reação positiva ao C.A. Já Gatica-Arias et al. (2008) se utilizaram do corante A.E. para determinar a viabilidade de células de *Coffea arabica* em suspensão; células inviáveis apresentavam coloração azul intensa, enquanto que células viáveis apresentavam ausência de coloração. Pádua (2009), também trabalhando com *Coffea arabica* cv. Catiguá, utilizou-se da mesma ferramenta na identificação do potencial embriogênico em função da coloração dos calos, identificando que os amarelos e friáveis se caracterizaram embriogênicos por terem sido mais reativos ao C.A.

Fica ilustrado que a dupla coloração carmim acético/azul de evans é uma ferramenta viável para a identificação de estágios com potencial embriogênico

em massas calosas de *J. curcas* e infere-se que o período de cultivo de 21 a 70 dias, por exibir médias superiores de vermelho associado a quatro períodos intercalares de equivalência entre vermelho e azul, é um período de potenciais massas pró-embriogênicas. Portanto, a embriogênese somática em explantes foliares de *J. curcas*, sob esta condição de cultivo, deve ser explorada nesse intervalo de tempo.

A viabilidade celular de calos com potencial embriogênico pode ser determinada por meio do uso do CTT. Com os resultados obtidos por este teste, observou-se que houve diferença significativa entre os períodos de cultivo dos calos, ressaltando então a influência do tempo de cultivo na viabilidade celular (Figura 4).

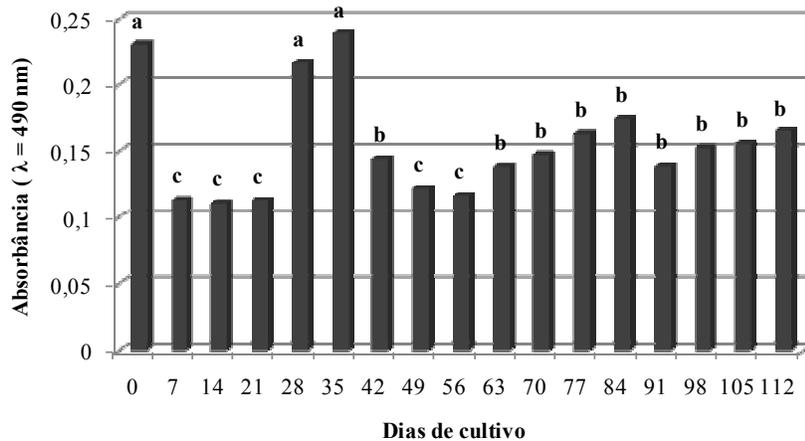


FIGURA 4 Viabilidade celular via CTT, de calos de *J. curcas* cultivados em meio MS com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, por 112 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O índice mais alto de absorvância coincide com a coloração vermelho mais intenso que ocorreu no dia da inoculação e em seguida reduziu drasticamente (Figura 4). Essa queda na viabilidade se deve provavelmente à lesão ocasionada aos calos mediante o corte a que foram submetidos na repicagem. Tal dano pode ter se expressado no período seguinte de cultivo, 7 dias. No entanto, a viabilidade ainda se mantém baixa até aos 21 dias, o que pode representar a adequação da massa calogênica ao novo ambiente de cultivo a que está sendo acondicionada.

A recuperação da viabilidade procedeu-se aos 28 dias e se manteve-se até aos 35 dias (Figura 4). Tal comportamento demonstra que o período de repicagem aconselhado pela curva de calo e pela microscopia eletrônica é uma data viável, pois em períodos anteriores e posteriores a viabilidade celular é baixa.

A viabilidade testada por CTT será maior proporcionalmente à respiração celular. Isso devido à característica inerente a este corante, que está ligado à atividade de enzimas desidrogenases, as quais estão envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos (Munhoz et al., 2008). Portanto, via CTT pode-se mensurar a respiração do tecido em cultivo. De acordo com a MET no capítulo 4, observa-se que mitocôndrias em estruturação aparecem a partir dos 21 dias e a atividade respiratória avaliada pelo CTT é intensa a partir dos 28 dias. Relacionando-se as informações desta organela com o nível respiratório do tecido, pode-se inferir que apesar destas mitocôndrias apresentarem-se estruturadas aos 21 dias, somente a partir dos 28 dias sua atividade respiratória é potencializada.

Após 35 dias de cultivo, a viabilidade celular decresce, e se mantém baixa dos 42 dias até o final do cultivo, que se conduziu até aos 112 dias. Como aos 42 dias a massa calogênica já está na fase estacionária da curva de calo, a redução nos níveis de viabilidade é uma resposta conivente. Na fase de declínio

da curva de calo, que ocorre a partir dos 77 dias, a viabilidade não decresce mais, ela mantém níveis estatisticamente semelhantes ao obtido na fase anterior.

A baixa viabilidade ao final do cultivo é sinônimo de metabolismo respiratório lento. A elevada presença de grãos de amido, observados aos 84 dias pela MET, é um comprovante do baixo índice respiratório, pois de acordo com Taiz & Zeiger (2004) o amido é o polissacarídeo primário de reserva energética dos vegetais. Em caso de metabolismo ativo, os grãos de amido não seriam detectados, pois teriam sido degradados para suprir energeticamente os processos de síntese da célula.

De forma semelhante, Silva (2009) também utilizou o CTT para identificar em qual período do subcultivo de murici-pequeno há maior viabilidade celular, identificando o 27º, 28º e 21º dias dos subcultivos 1, 2 e 3 como os mais adequados. Também tentando identificar o período de maior viabilidade, Lima (2009) testou o CTT em suspensões celulares de bananeira cv. prata anã, percebendo que aos 7 meses o cultivo tem a máxima viabilidade. Já Pádua (2009), trabalhando com *Coffea arabica* cv. Catiguá, utilizou-se do CTT para identificar em qual coloração de calo se associava maior viabilidade, observando que esta se expressava melhor nos calos amarelos e friáveis.

Mediante a utilização do CTT, constata-se que o cultivo de calos de *J. curcas* exibe maior viabilidade no final da fase de desaceleração (28 dias) e início da fase estacionária (35 dias) da curva de calo, no decorrer da fase estacionária e por toda a fase de declínio a viabilidade celular é baixa. Pela curva de calo, a repicagem deve ocorrer aos 28 dias e se levarmos em consideração a viabilidade neste período, esta é uma ótima época para tal prática.

6 CONCLUSÕES

Tanto a dupla coloração carmim acético/azul de evans quanto o CTT são ferramentas viáveis para a identificação de estágios com potencial embriogênico e mensuração da viabilidade celular de massas calosas de *J. curcas*, respectivamente.

A expressão do potencial embriogênico nas massas calogênicas de *J. curcas* ocorre entre 21 e 70 dias de cultivo.

O maior índice de viabilidade celular ocorre no dia da inoculação e posteriormente aos 28 e 35 dias de cultivo dos calos de *J. curcas*.

Com respaldo das ferramentas C.A., A.E. e CTT, 28 dias é o período de repicagem mais adequado para as massas calogênicas de *J. curcas*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMUTHA, R.; MUTHULAKSMI, S.; RANI, W. B.; INDIRA, K.; MAREESWARI, P. Physiological studies on evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for high temperature stress. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Egypt, v. 3, n. 4, p. 245-251, July/Aug. 2007.

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, jan./abr. 2004.

BÁEZ, P.; RIVEROS, M.; LEHNEBACH, C. Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 40, n. 4, p. 671-678, Nov. 2002.

BENSON, E. E. Cryopreservation. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. 2. ed. Oxford: Oxford University, 1994. 194 p.

BHARGAVA, A.; OSUKY, M.; FORWARD, B. S.; HANCOCK, R. E.; KAY, W. W.; MISRA, S. Expression of a polyphenol variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and virus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 88, n. 3, p. 301-312, Mar. 2007.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 87-89, jul. 2007.

COSTA, M. P. da. **Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação**. 1995. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, Sept. 2003.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - sistema de análise estatística, version 4.3. Lavras: UFLA/DEX, 2000.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; ARNOLD, S. V. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 343, p. 249-264, Feb. 2000.

FUKUDA, H. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 44, n. 3, p. 245-253, Oct. 2000.

GATICA-ARIAS, A. M.; ARRIETA-ESPINOZA, G.; ESQUIVEL, A. M. E. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs Caturra an Catuaí. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 11, n. 1, p. 1-12, Jan. 2008.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. Plant propagation by tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, n. 3, p. 353-355, June 2008.

GRACIA-MEDRANO, E.; MIRANDA-HAM, L. Analysis of elicitor-induced cell viability changes in *Lycopersicon esculentum* mill. suspension culture by different methods. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 236-239, Mar. 2003.

LIMA, C. D. F. **Obtenção de suspensão celular e regeneração de embriões de bananeira cv. prata-anã**. 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MIKULA, A.; NEIDZIELSKI, M.; RYBCZNSKI, I. J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana spp.* Cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 28, n. 4, p. 331-324, Aug. 2006.

MOGES, A. D.; SHIBLI, R. A.; KARAM, N. S. Cryopreservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Berlin, v. 40, n. 4, p. 389-395, July/Aug. 2004.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; MEISSNER FILHI, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, jun. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NERY, A. R.; RODRIGUES, L. N.; SILVA, M. B. R.; FERNANDES, P. D.; CHAVES, L. H. G.; DANTAS NETO, J.; GHEYI, H. R. Crescimento do pinhão-mansão irrigado com águas salinas em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 5, p. 551-558, out. 2009.

O'KANE, D.; GILL, V.; BOYD, P. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. **Planta**, Berlin, v. 198, n. 3, p. 371-377, Sept. 1996.

PÁDUA, M. S. **Caracterização morfológica e análise do potencial embriogênico de calos de *Coffea arabica* cv. Catiguá**. 2009. 52 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PLINE, W. A.; EDMISTEIN, K. L.; OLIVER, T.; WILCUT, J. W.; WELLS, R.; ALLEN, N. S. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 2193-2200, Nov./Dec. 2002.

SHIBLI, R.; HAAGENSON, D.; CUNNINGHAM, S.; BERG, W.; VOLENEC, J. Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 5, p. 445-450, July 2001.

SILVA, L. C. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de murici-pequeno**. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, R. F. da; YUFFÁ, A. M. Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 9, n. 5, p. 593-597, Oct. 2006.

STEIN, R. J.; GERARDE, H. W. Triphenyltetrazolium chloride in tissue culture. **Science**, Washington, v. 111, n. 2895, p. 691, June 1950.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba v. 48, n. 6, p. 895-903, nov. 2005.

SUAREZ, M.; FILONOVA, L.; SMERTENKO, A.; SAVENKOV, E.; CLAPHAM, D.; ARNOLD, S. von; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKO, P. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. **Current Biology**, London, v. 14, n. 9, p. 339-340, May 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 179 p.

TOWILL, L. E.; MAZUR, P. Studies on reduction of 2,3,5 – triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 53, n. 11, p. 1097-1102, June 1975.

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

WANG, Z.-Y. Y. G.; SCOTT, M.; SPANGENBERG, G. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 9, n. 4, p. 23-530, Apr. 2004.

ZAPATA, M. J.; SALINAS, C.; CALDERÓN, A. A.; MUÑOZ, R.; BARCELÓ, A. R. Reduction of 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride by the KCN – insensitive salicylhydroxamic acid-sensitive alternative respiratory pathway of mitochondria from cultured grapevine cells. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, n. 11, p. 579-582, Dec. 1991.