

**CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS, SEMENTES  
E PLÂNTULAS E CULTIVO DE EMBRIÕES DE  
PINHÃO-MANSO  
(*Jatropha curcas* L.)**

**CLAUDINÉIA FERREIRA NUNES**

**2007**

**CLAUDINÉIA FERREIRA NUNES**

**CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS, SEMENTES E PLÂNTULAS E  
CULTIVO DE EMBRIÕES DE 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 Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Moacir Pasqual

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

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

Claudinéia Ferreira Nunes

Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de  
pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) / Claudinéia Ferreira Nunes. -- Lavras :  
UFLA, 2007.

78 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Morfologia. 2. Cultura de embriões 3. Cultura de tecidos. 4. Estádio  
fisiológico 5. Carboidrato 6. *Jatropha curcas*. I. Universidade Federal de Lavras.  
II. Título.

CDD-634.5

**CLAUDINÉIA FERREIRA NUNES**

**CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS, SEMENTES E PLÂNTULAS E  
CULTIVO DE EMBRIÕES DE 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 Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2007

Pesquisador Dr. Leonardo Ferreira Dutra

EMBRAPA/CNPQ

Prof. Dr. José Darlan Ramos

UFLA

Prof. Dr. Moacir Pasqual  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

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

## **OFEREÇO**

*As minhas irmãs Rena, Vânia, Si e Ni.*

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

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

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

*Ao meu orientador, Prof. Moacir Pasqual.*

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos cuidados divinos e pelas graças derramadas em minha vida.

Aos meus pais, pelo amor e confiança. Vocês são os maiores responsáveis por mais essa conquista.

As minhas irmãs, por fazerem parte da minha platéia e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus sobrinhos, por cada sorriso e por encher a minha vida de alegria.

Aos meus cunhados: Camilo, Mura, Hudson e Telo, pelo apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Agricultura, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pela oportunidade e pelo apoio durante o período de realização dos trabalhos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Moacir Pasqual, toda a minha gratidão. Obrigada pela orientação, atenção, amizade e conhecimentos, que contribuíram em grande parte para minha formação profissional e por ter acreditado no meu trabalho.

À querida Prof. Tida da UNIMONTES, a pesquisadora Heloisa da EPAMIG e ao Sr. Nagashi Tominaga, pelo fornecimento das sementes de pinhão-mansão.

Aos membros da banca examinadora: Leonardo Ferreira Dutra e José Darlan Ramos, pela disponibilidade para a avaliação deste trabalho.

Ao professor Telde (UFLA), pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos amigos laboratoristas Vantuil, Antônio Clarete e Antônio Carlos, pelo apoio na instalação dos experimentos.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos: doutorandos, mestrandos e estagiários, em especial, a estagiária Dalíhia, pela ajuda na realização dos trabalhos.

À minha família de Lavras, minhas “irmãzinhas” de república: Neiva, Déia, Lilica e Letícia.

Ao querido casal Elka e Franklin, pela convivência e carinho.

Aos colegas de mestrado, que se tornaram grandes amigos: Denise, Carol e Fred.

As minhas amigas irmãs, àquelas que o tempo e a distância não separam: Flavinha, Lize e Mel.

À amiga Fabíola pela ajuda incondicional.

Aos professores do campus de Agronomia de Janaúba e aos eternos amigos Riachenses e Gorutubanos.

Aos meus padrinhos Preto e Darlene, pelo carinho e atenção.

Aos profissionais Evanguedes, Luciano e a mestranda Sara, pelo incentivo e compreensão.

A todos que, de forma direta ou indireta colaboraram para a conclusão de mais uma etapa de minha vida e, que, embora não citados aqui, não deixam de merecer o meu agradecimento.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
<b>CAPÍTULO I: Introdução Geral.....</b>	<b>01</b>
1 Introdução Geral.....	01
2 Referencial Teórico.....	04
2.1 Considerações Gerais do Pinhão-Manso.....	04
2.1.1 Propriedades da Planta e Importância Econômica.....	05
2.1.2 Ecofisiologia .....	07
2.1.3 Morfologia .....	08
2.1.4 Sistema Reprodutivo.....	12
2.1.5. Propagação.....	13
2.1.6 Cultura de Tecidos.....	14
2.1.7 Cultura de Embriões.....	18
3 Referências Bibliográficas.....	20
<b>CAPÍTULO II: Caracterização Morfológica de Frutos, Sementes e Plântulas obtidas a partir de Germinação <i>in vitro</i> da Espécie <i>Jatropha curcas</i> L .....</b>	<b>27</b>
1 Resumo .....	27
2 Abstract.....	28
3 Introdução.....	29
4 Material e Métodos.....	32
5 Resultados e Discussão.....	34
6 Conclusões.....	42
7 Referências Bibliográficas.....	43

<b>CAPÍTULO III: Cultura de Embriões de Pinhão-Manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)</b> .....	46
1 Resumo .....	46
2 Abstract.....	47
3 Introdução.....	48
4 Material e Métodos.....	51
5 Resultados e Discussão.....	54
6 Conclusões.....	72
7 Referências Bibliográficas.....	73

## RESUMO

NUNES, Claudinéia Ferreira. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2007 78p. (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O pinhão-manso apresenta importância medicinal pelos efeitos farmacológicos e econômicos, devido ao seu grande interesse no setor de combustíveis com a produção de óleo. Mediante a necessidade de produção de grande quantidade de mudas e da ampliação do conhecimento da espécie, o objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia do fruto, da semente e do desenvolvimento de plântulas e avaliar o desenvolvimento *in vitro* de embriões de *Jatropha curcas* L. Para a descrição da morfologia dos frutos e das sementes foram utilizados 50 frutos e 50 sementes, considerando suas características externas e internas. Para a caracterização das etapas da germinação *in vitro* foram utilizadas 60 sementes, inoculadas em meio de cultura MS suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Os embriões foram submetidos a duas condições experimentais: (1) quatro concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 60 g.L<sup>-1</sup>) e três estádios de desenvolvimento do fruto (imaturo, maduro e seco) e (2) quatro concentrações de carvão ativado (0; 1,0; 2,0 e 3,0 g.L<sup>-1</sup>) e seis de água de coco (0, 50, 100, 150, 200 e 250 mL). Para todos os experimentos os meios de cultura tiveram seus pHs ajustados para 5,8 e foram solidificados com 6,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Os experimentos foram instalados em câmara de fluxo laminar e mantidos em sala de crescimento com temperatura a 27± 1°C, com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de 35 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Na caracterização da espécie conclui-se que: o fruto é seco, tricoca, endocarpo lenhoso e de deiscência explosiva. A semente é ovalada, endospermica, de envoltório liso com suaves estrias, com carúncula presa na parte ventral; a rafe é marcada longitudinalmente e pouco evidente, e presença de embrião munido com um par de cotilédones foliáceos e eixo hipocótilo radícula, cilíndrico e reto. A germinação é epígea e fanerocotiledonar. Para o cultivo de embriões, o meio MS suplementado com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose proporciona bom desenvolvimento de embriões. Embriões oriundos de frutos secos apresentam maior crescimento *in vitro* e embriões provenientes de frutos imaturos necessitam da suplementação de sacarose no meio de cultura, para sustentar sua germinação. A associação de carvão ativado e água de coco não influenciam na germinação dos embriões. No entanto, a presença de carvão ativado ao meio favorece o enraizamento dos embriões.

---

\* Orientador: Moacir Pasqual – UFLA

## ABSTRACT

NUNES, Claudinéia Ferreira. **Fruit, seed and seedling characterization and embryo culture of physic nut (*Jatropha curcas* L.)**.2007 78p. (Master in Phytotechny)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Physic nut has a medical and economical importance due to its pharmaceutical properties and increasing interest in fuel industry for biodiesel production, respectively. To be able to attend an increasing demand for *Jatropha curcas* L. seedlings and to better understand the species, this work aimed to describe its fruit and seed morphologies, its seedling development and to evaluate its *in vitro* embryo development. To describe fruit and seed morphologies, 50 fruits and 50 seeds were used and their inner and outer peculiarities were considered. To characterize its *in vitro* germination stages, 60 seeds were used, inoculated in MS culture medium amended with sucrose (30 g.L<sup>-1</sup>). Embryos were submitted to two experimental conditions: (1) four sucrose concentrations (0, 15, 30 and 60 g.L<sup>-1</sup>) and three fruit development stages (immature, mature and dry) and (2) four concentrations of activated carbon (0, 1.0, 2.0 and 3.0 g.L<sup>-1</sup>) and six concentrations of coconut water (0, 50, 100, 150, 200 e 250 mL). For the culture media used in all experiments, pH was adjusted to 5.8, and agar (6.0 g.L<sup>-1</sup>) was used as solidifying agent. Experiments were carried out in flow cabinet and kept in growth chamber with 27± 1°C temperature, 16 hours photoperiod and 35 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> irradiance. For the species characterization results are: fruit is dry, with three cocas, hard endocarp and explosive dehiscence. Seed is oval, endospermic, smooth surface with light streaks, possesses caruncle in the ventral part; the rafe is marked longitudinally and slightly evident, embryo encompasses a pair of foliaceous cotyledons and the hypocotyls-radicle axis is cylindrical and straight. Germination is epigeous and phanerocotyledonal. For embryo cultivation, MS medium amended with sucrose (60 g.L<sup>-1</sup>) resulted in better embryo development. Embryo obtained from dry fruits showed higher *in vitro* growth and, embryos from immature fruits needed sucrose amendment to the culture medium to accomplish germination. The use of activated carbon or coconut water did not influence embryo germination. However, in the presence of activated carbon, the culture medium improved embryo rooting.

---

\* Advidor: Moacir Pasqual – UFLA

## **CAPÍTULO 1**

### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

Depois de provocar uma verdadeira revolução energética, ao construir uma cadeia em torno da conversão de cana-de-açúcar em etanol, o Brasil está diante da chance de repetir o mesmo com o biodiesel. Este novo combustível renovável partilha qualidades com o álcool, a começar pelos méritos ambientais. Produtos alternativos ao petróleo, tanto o etanol quanto o biodiesel se convertem em instrumentos capazes de reprimir o aquecimento global, diminuindo os bilhões de toneladas de gás carbônico lançados na atmosfera todos os dias a cada ano.

Na corrida pela substituição dos derivados de petróleo, a Alemanha tornou-se a maior produtora e consumidora de biodiesel do planeta, alcançando dois bilhões de litros por ano (4% de seu consumo de diesel). A ascensão do combustível nesse e em outros países da união Européia, como França e Itália, fez com que o bloco passasse de exportador a importador de grãos como colza e soja (Globo Rural, 2006).

Devido à dimensão continental do Brasil e da sua diversidade de clima e solo, estima-se que existam aqui mais de 200 espécies de oleaginosas com potencial para produzir óleo como fonte de matéria-prima, para a produção de biodiesel (energia), porém, um dos destaques do setor, contudo, é uma planta que, até então, passava quase despercebida, o pinhão-manso (Beltrão & Cartaxo, 2006).

No Brasil, o pinhão-manso vem sendo cultivado por produtores do Nordeste, Centro Oeste e Sudeste, com produção anual de 1.100 a 1700 litros de biodiesel/óleo/ha (Globo Rural, 2006). Em Minas Gerais, a produção está

concentrada nas regiões do Mucuri, Norte do Estado, Triângulo mineiro e Vale Jequitinhonha, objetivando a produção de mudas, sementes e desenvolvimento de pesquisas. O norte de Minas tem apresentado elevado potencial para o cultivo do pinhão-mansão, com a distribuição de plantações nos municípios de Matias Cardoso e Nova Porteirinha, destacando-se o município de Janaúba, com 31 ha de área plantada (Saturnino et al. 2005).

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) pertence à família Euphorbiaceae e é proveniente de um grande arbusto, ou árvoreta decídua. Antigamente, era usado na fabricação caseira de sabão e, mais recentemente, como cerca viva. Seu maior atributo, entretanto, é o alto teor de óleo produzido pelas sementes, superando 30%, podendo a planta frutificar por mais de 40 anos (Globo Rural, 2006). É perene, rústica e adaptada às condições edafoclimáticas diversas, inclusive às semi-áridas. Agências internacionais de desenvolvimento e governos têm pesquisado e divulgado essa cultura em países da África, Ásia, América do Sul e Central, como produtora de óleo para a fabricação do biodiesel, o que despertou interesse de empresários brasileiros. Desde 2004, alguns empreendedores vêm plantando pinhão-mansão no Brasil e, produzindo sementes em suas lavouras (Saturnino et al., 2006).

Os efeitos farmacológicos das partes da planta do pinhão-mansão têm sido estudados na medicina tradicional chinesa (Staubmann et al., 1999). A atividade biológica e química dos constituintes da *Jatropha curcas* tem sido investigada, principalmente, seu princípio ativo: toxialbumina jatrofina (curcina) (Barbieri et al., 1993; Huang et al., 1991; Lin et al., 2002). Folhas, sementes e cascas, frescas ou como decocção (cozimento) são usadas na medicina tradicional e em empregos veterinários.

Pesquisas a respeito de multiplicação *in vitro* de espécies de interesse econômico são cada vez mais promissoras. Características como plantios desuniformes, associados à falta de material genético melhorado, têm sido

apontados como os principais fatores, que limitam à expansão de muitas culturas. Mediante à importância medicinal e econômica da espécie, devido ao seu grande interesse no mercado interno com a produção de óleo e, para gerar excedente exportável, há necessidade de produção de grande quantidade de mudas e da ampliação do conhecimento da espécie.

Alguns dos problemas observados no cultivo convencional, como incidência de doenças, desuniformidade do material, longo período para obtenção da muda, entre outros, são quase inexistentes no cultivo *in vitro*, pois, esse permite a multiplicação rápida de plantas, seleção precoce de material, produção em larga escala e pequeno espaço físico, por isso, é uma tecnologia adequada para a cultura de ciclo longo, assim como, o pinhão-manso.

O uso do óleo de pinhão-manso, como fonte produtora de biodiesel, depende da domesticação da espécie, a fim de se obter maior produtividade e homogeneização na produção (Saturnino et al., 2005). Uma das formas de contribuir para a sua domesticação é o desenvolvimento de novas tecnologias, que visem aperfeiçoar sua produção, como na obtenção de mudas selecionadas de matrizes superiores. Sendo assim, a micropropagação é uma alternativa para se obterem tais plantas. O estabelecimento de protocolos, visando o cultivo de embriões *in vitro*, associado à caracterização morfológica dos frutos e sementes é de fundamental importância para o entendimento de processos fisiológicos e exigências da *J. curcas*. O interesse no conhecimento agrônomo da cultura é crescente, visando seleção e aprimoramento de variedades mais produtivas, além de explorar seu potencial genético.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Considerações gerais do pinhão-manso

A família Euphorbiaceae compreende aproximadamente 8000 espécies, com cerca de 320 gêneros. O gênero *Jatropha* contém aproximadamente 160 espécies de plantas herbáceas e arbustivas, das quais várias apresentam valor medicinal, ornamental e outras produzem óleo. A *Jatropha curcas*, além de ser medicinal, também é produtora de óleo (Munch & Kiefer, 1989; Ojewole & Odebiyi, 1980; Sujatha & Dhingra, 1993). O nome *Jatropha* deriva do grego *iatrós* (doutor) e *trophé* (comida), implicando as suas propriedades medicinais.

Existe uma extensa lista de sinónimas para essa espécie, tendo sido reconhecidas por Dehgan & Webster (1979) e Schultze-Motel (1986), são as seguintes: *Curcas purgans* Medik., *Ricinus americanus* Miller, *Castiglioni lobata* Ruiz & Pavon, *Jatropha edulis* Cerv. Gaz. Lit. Mex., *J. acerifolia* salisb., *Ricinus jarak* thunb., *Curcas adansoni* Endl., *Curcas indica* A. Rich e *Curcas curcas* (L.) Britton & Millsp. A espécie *J. curcas* é uma espécie diplóide com  $2n = 22$  cromossomos.

Popularmente, a *Jatropha curcas* L. é conhecida como: physic nut, purging nut (Inglês), pinhão-manso, pinhão-paraguaio, pinhão-de-purga e pinhão-de-cerca (Brasil), tempate (Honduras e El Salvador), médicinier, pignon d'Inde, purghere (França), Kadam (Nepal), yu-lu-tzu (China), mupuluka (Angola), butuje (Nigéria) e piñoncillo (México).

A origem do pinhão-manso é bastante controversa. Existem relatos afirmando ser oriundo da América do Sul (Peixoto, 1973), outros afirmam que é proveniente do Estado de Ceará, no Brasil, outros, o julgam da América Latina (Fernandez, 1993). O consenso, é que o pinhão-manso seja originário da América tropical (Árvores exóticas, 2003).

Por volta de 1783, esta espécie foi, provavelmente, distribuída por embarcações portuguesas provenientes das ilhas de Cabo Verde a outros países como a África e a Índia. De acordo com Brasil (1985), sua introdução nas Ilhas de Cabo Verde é atribuída ao interesse dos portugueses em aproveitar as terras inaptas daquele Arquipélago, cujos solos de pouca fertilidade, dificilmente poderiam ser utilizados para culturas menos rústicas.

Dados estatísticos que mencionam a situação real do cultivo do pinhão-manso no Brasil e no mundo são desconhecidos. No Brasil, existem apenas registros de plantas isoladas ou, formando cercas vivas, todavia, só recentemente, esta espécie começou a ser cultivada comercialmente no País.

#### **2.1.1. Propriedades da planta e importância econômica.**

A espécie de *Jatropha* mais estudada, atualmente, tem sido a *J. curcas* (pinhão-manso). Deste modo, buscou-se estabelecer diferentes introduções para tornar possível a análise de variabilidade genética na espécie. Encontram-se introduções disponíveis nos Estados de São Paulo, Mato Grosso e região Nordeste. O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) dispõe de mais de seis espécies: *J. elliptica*, *J. gossypifolia*, *J. mollissima*, *J. multifida*, *J. podagrica* e *J. weddelliana*. Investigações sobre cada uma dessas espécies estão sendo acumuladas, o que proporcionará, caso seja necessário, a elaboração de um programa para transferência de caracteres agrônômicos desejáveis de algumas delas para *J. curcas* (Forni-Martins & Cruz, 1985).

A planta do pinhão-manso é utilizada desde tempos antigos no emprego medicinal, na iluminação de casas e produção de sabão. Atualmente, o produto extraído da semente tem sido sugerido para fins energéticos. A planta tem sido considerada uma boa opção de cultivo agrícola, em áreas com solos pobres, pedregosos e quase inagricultáveis.

Das sementes processadas extrai-se o óleo ou a torta (subproduto). Porém, as sementes podem ser também produto de comercialização para implantação de futuros plantios (Project Zâmbia, 2000). A torta da *Jatropha* é tóxica, sendo inadequada para a alimentação animal. Entretanto, tem potencial como adubo orgânico, pois o farelo residual apresenta teores elevados de nitrogênio, fósforo e potássio.

A seiva (látex) tem propriedades anti-microbianas contra *Staphylococcus* e *Echerichia coli.*, além de, também, ser usado como cicatrizante. As raízes são consideradas diuréticas e antileucêmicas e as folhas utilizadas para combater doenças de pele. O óleo pode ser aplicado no tratamento de eczema, doenças de pele e reumatismo (Heller, 1996). Conferem-se às propriedades tóxicas do pinhão, a uma globulina, a curcasina e, também, ao ácido jatrópico de toxicidade igual ou superior a ricinina, proteína presente nas sementes de mamona (*Ricinus communis*). A ingestão de uma única semente fresca pode causar tanto vômito quanto diarreia (Peixoto, 1973).

Freqüentemente, o pinhão-manso é empregado para demarcar limites, como cerca viva, pois não é consumida pelos animais e devido à sua longevidade. Sua tolerância à seca e a presença de raízes laterais perto da superfície faz do pinhão-manso uma atraente planta a ser usada para combater erosão, ou em projetos de reflorestamento (Project Zâmbia, 2000).

Além disso, o óleo das sementes do pinhão-manso é empregado na produção de sabão. Sua coloração é branca e proporciona efeitos positivos na pele, em parte, devido ao conteúdo de glicerina presente no sabão. O óleo é, indubitavelmente, a fonte principal de produto dessa planta.

Historicamente, até antes da segunda Guerra Mundial, em 1939, o principal emprego do óleo de pinhão-manso era na saboaria, mas devido, às necessidades militares, outras possíveis utilizações começaram a ser estudadas. Não pode, entretanto, ser utilizado como lubrificante, devido à sua baixa

viscosidade e grande porcentagem de ácidos graxos impróprios, que podem provocar rápida resinificação. No entanto, pesquisas levaram à conclusão de que esse óleo pode também ser utilizado como combustível nos motores diesel (Cortesão, 1956).

O futuro do biodiesel depende de grandes produções de oleaginosas e, estas, precisam de alta produção de óleo por hectare com baixos custos de produção. Desse modo, o pinhão-manso seria uma opção, uma planta com teor de óleo que varia entre 30% e 40% , com produção anual de 1100 a 1700 litros de biodiesel/ha, podendo frutificar por mais de 40 anos (Globo Rural, 2006). Além das características já mencionadas, acrescenta-se o fato do pinhão-manso ser perene e nativo das Américas, ser tolerante a seca e bastante rústico. Essas particularidades a tornam uma excelente oleaginosa para ser adotada como alternativa na produção de biodiesel.

### **2.1.2. Ecofisiologia**

O pinhão-manso é uma planta bem adaptada às condições áridas e semi-áridas. A maioria das espécies de *Jatropha* ocorre em áreas secas do cerrado e vegetação da caatinga (Dehgan & Schutzman, 1994). Brasil (1985), Cortesão (1956) e Peixoto (1973) relataram a ocorrência de pinhão-manso em quase todas as regiões intertropicais, sendo em maior escala nas regiões tropicais e temperadas e, em menor extensão nas regiões frias.

A distribuição geográfica do pinhão-manso, segundo Cortesão (1956) e Peixoto (1973) era bastante ampla devido à sua rusticidade, resistência às longas estiagens, bem como às pragas e doenças, sendo adaptável às condições edafoclimáticas distintas, desde o Nordeste até São Paulo e Paraná. De acordo com estes autores, o pinhão-manso se desenvolve bem, tanto nas regiões tropicais secas, nas zonas equatoriais úmidas, bem como nos terrenos áridos e pedregosos, podendo tolerar longos períodos de seca. Encontra-se, também, na

orla marítima, ao nível do mar, até 1.000m de altitude, sendo o seu cultivo mais adequado em regiões que apresentem entre 500 e 800m de altitude.

### **2.1.3. Morfologia**

O pinhão-mansão pertence à família Euforbiaceae, a mesma da mamona e da mandioca, ao género *Jatropha* e à espécie *J. curcas*. De acordo com Cortesão (1956), os portugueses distinguem duas variedades, catártica medicinal, a mais dispersa no mundo, com amêndoas muito amargas e purgativas e a variedade árvore de coral, medicinal-de-espanha, árvores de nozes purgativas, com folhas eriçadas de pêlos glandulares, que segregam látex, límpido, amargo, viscoso e muito cáustico.

O pinhão-mansão é uma arvoreta ou arbusto grande (Figura 1) o qual pode alcançar até 5m de altura. O diâmetro do tronco é de aproximadamente 20 cm. A planta apresenta crescimento articulado, com descontinuidade morfológica desde a base. Normalmente, cinco raízes são formadas, sendo uma central e quatro periféricas (Kobilke, 1989).



**FIGURA 1.** Aspecto visual de uma planta de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) em Janaúba/MG, 2006.

Segundo Peixoto (1973), o caule é liso, macio, esverdeado, cinzento-castanho, seu xilema ou lenho é pouco resistente e sua medula desenvolvida. O floema encerra canais compridos, que se prolongam até as raízes, nos quais circula o látex e depois de seco torna-se uma substância acastanhada com aspecto de resina. Os ramos são espalhados e longos, apresentando cicatrizes deixadas pela queda das folhas. O tronco e ramos são recobertos por uma camada cerosa, que após sua secagem se desprende em lâminas finas.

As folhas são decíduas, alternadas a sub-opostas, filotaxia em espiral, cordatas na base, 3-5 lobadas. A coloração vermelho-vinho é exibida pelas folhas jovens e à medida que se expandem tornam-se verdes, pálidas, brilhantes

e glabras, com nervuras esbranquiçadas e salientes em sua face inferior. O pecíolo é longo e esverdeado, do qual partem as nervuras divergentes.

A inflorescência é uma cimeira definida (Figura 2), que surge junto com as folhas novas. As flores masculinas e femininas se encontram dispostas na mesma inflorescência.



**FIGURA 2.** Inflorescência do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), Madagascar, África, 2006.

O fruto (Figura 3) é tipo cápsula trilocular, com uma semente por lóculo, constituída por um pericarpo ou casca dura e lenhosa, deiscente. No início, o fruto é verde, passando de amarelo a castanho e chegando à cor preta, quando atinge o estágio de maturação. Os frutos têm em média de 2,5 a 4,0 cm de comprimento por 1,5 a 3,0 cm de diâmetro.

A semente é ovalada, endospermica, tegumento rijo, quebradiço, de fratura resinosa. Possui na parte superior, uma proeminência carnuda, a carúncula, que se encontra próxima à micrópila. As sementes, quando secas, apresentam cerca de  $1,5 \pm 2,0$  cm de comprimento e  $1,0 \pm 1,5$  cm de largura. Na parte inferior do invólucro da semente existe uma película branca cobrindo a amêndoa; albúmen abundante, branco, oleaginoso, contendo um embrião com

formato reto, cotilédones planos, foliáceos e arredondados (Saturnino et al., 2005).



**FIGURA 3.** Ilustração demonstrativa dos frutos e sementes do pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.), Oeste da África, 2006.

A semente possui 45% de casca e 55% de amêndoa, podendo ter também uma proporção de 33,7% de casca e 66,3% de amêndoa, dependendo da variedade, condições ecológicas e tratos culturais (Peixoto, 1973). Para Braga (1976), as sementes de pinhão-mansó contém de 25 a 40% de óleo inodoro e de fácil extração por pressão. Contribuições feitas por Brasil (1985) mostram que o óleo é incolor, inodoro, muito fluído, porém precipita a frio e congela a alguns graus acima de zero.

#### **2.1.4. Sistema reprodutivo**

Planta caracterizada como monóica, com flores unissexuais e produzidas na mesma inflorescência, ocasionalmente, ocorrem flores hermafroditas. As flores femininas apresentam ovário com três carpelos, cada um com um lóculo, que produz um óvulo com três estigmas bifurcados separados, as quais se

localizam nas ramificações. As flores masculinas apresentam-se em maior número e estão dispostas nas pontas das ramificações (Dehgan & Webster, 1979).

Notam-se que as flores femininas, cujo número geralmente varia de cinco a vinte, na mesma inflorescência, abrem-se em dias diferentes. Em cada inflorescência, a partir do momento em que a primeira flor desabrocha, as outras vão se abrindo, diariamente, numa seqüência de 11 dias. A deiscência da antera ocorre uma hora após a abertura da flor (Solomon & Ezradanam, 2002).

A polinização do pinhão-manso é entomófila e seus polinizadores, são: formigas, abelhas, moscas e tripes (Solomon & Ezradanam, 2002). A abertura antecipada das flores pistiladas, em relação às estaminadas favorece à polinização cruzada do pinhão-manso (Heller, 1992).

#### **2.1.5. Propagação**

Além das características genéticas e procedência das sementes, a formação, o vigor e a sanidade das mudas são imprescindíveis para a obtenção de plantas mais produtivas. É conveniente ressaltar que uma boa multiplicação das plantas pode ser obtida por meio de sementes ou por estacas. Em ambos os casos, a seleção das matrizes deverá ser rigorosa, dando preferência às melhores plantas. O ciclo produtivo da *Jatropha curcas* é variável, conforme plantio realizado por estacas ou por sementes.

A propagação por via seminal é mais tardia, porém, apresenta a vantagem de gerar indivíduos mais vigorosos e de maior longevidade, atingindo idade produtiva após quatro anos. A desvantagem da utilização de sementes é o fato da espécie apresentar altos índices de polinização cruzada, o que determina elevada variabilidade genética nos cultivos seminais. Quando em boas condições de produção, sua longevidade alcança cerca de 30 a 50 anos de vida (Cortesão, 1956; Peixoto, 1973). Recentemente, a utilização de técnicas como o cultivo de

embriões, têm adquirido importância significativa, em meio à necessidade de material para trabalhos de propagação clonal *in vitro* dessa espécie.

Na propagação por via vegetativa, as estacas utilizadas devem ser extraídas de matrizes de origem idônea, isentas de pragas e doenças, cortadas de galhos lenhosos com até dois anos de idade. Para o sucesso do plantio, os ramos escolhidos devem estar mais próximos da base, sendo selecionados os de casca lisa e brilhante, de 40 a 50 cm de comprimento. O início do ciclo produtivo, segundo informações levantadas nas áreas de ocorrência, depende das dimensões da estaca plantada e das condições do trato, variando de 10 meses a 2 anos (SBRT, 2005). Trabalhos relacionados ao enraizamento e brotação de estacas de pinhão-mansão foram realizados por Gerald et al.(2006), visando a antecipação do desenvolvimento das estacas.

As mudas oriundas de sementes devem permanecer na sementeira até atingirem cerca de 8 a 12 cm de comprimento, quando passam pela fase de transição de herbácea para lenhosa, para, posteriormente, serem transplantadas para o viveiro ou diretamente para o campo de cultivo.

#### **2.1.6. Cultura de tecidos**

O crescimento e desenvolvimento *in vitro* de uma planta é determinado por um número de fatores complexos, como: constituição genética da planta, nutrientes - água, macro e micro elementos e açúcar, (2) - fatores de crescimento físico: luz, temperatura, pH, concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, (3) - presença de algumas substâncias orgânicas (Pan & Staden, 1998) e misturas complexas.

A propagação do pinhão-mansão é viável por sementes e por estacas, entretanto, a irregular produção de mudas no campo, aliada à predação por pragas, pode limitar a produção de mudas para plantio e comercialização. O desenvolvimento de técnicas de reprodução, a exemplo da cultura de tecidos, constitui-se numa alternativa de reprodução de genótipos superiores. O cultivo

*in vitro* de células e tecidos pode representar uma excelente alternativa a ser empregada para a propagação do pinhão-manso, apesar de demandar mão-de-obra especializada.

O desenvolvimento de pesquisas relacionadas à multiplicação *in vitro*, de espécies de interesse econômico tem sido cada vez mais promissor. Por intermédio da micropropagação, as dificuldades de reprodução podem ser reduzidas, pois, esta, permite a multiplicação acelerada, seleção precoce de material superior, produção em larga escala e em pequeno espaço físico. Por isso, é uma tecnologia adequada à cultura de ciclo longo, assim como *J. curcas*, visando à formação de plantios clonais. Nesse aspecto, diversos trabalhos foram realizados, utilizando-se cultura de tecidos para propagação da espécie *curcas*, como: regeneração de plantas via embriões somáticos, epicótilo, proliferação de brotos em nódulos axilares e segmentos foliares (Qin et al., 2004; Sardana et al., 2000; Sujatha et al., 2005).

Considerada como uma ferramenta de trabalho de grande importância, a cultura de tecidos vegetais pode ser utilizada como técnica auxiliar ao melhoramento genético convencional, capaz de ampliar a variabilidade genética, reduzir o tempo para lançamento de novas cultivares, introduzir genes de interesse agrônomo entre outras. A cultura de tecidos é uma técnica que faz parte da Biotecnologia e, juntas trabalham, desenvolvendo estudos relacionados ao metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como: resistência à pragas, doenças e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial.

Os meios de cultura utilizados fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento *in vitro* (Torres et al., 1998). Esses podem ser ainda modificados de acordo com a necessidade específica *in vitro* e a espécie na qual

se está trabalhando, sendo interessante deter o conhecimento da importância de cada elemento contido em um meio de cultivo.

Existe uma variedade de meios usados na cultura de tecidos, uns com formulações mais ricas do que outros, dentre os quais encontra-se o meio de White (1942), um dos primeiros meios de cultura desenvolvidos. O meio MS (Murashige & Skoog, 1962) foi uma das primeiras formulações melhoradas usadas em cultura de tecidos de várias espécies vegetais. Emprega-se ainda o meio básico WPM (Wood Plant Medium) de Loyd & McCown (1980), o qual foi desenvolvido, em especial, para plantas lenhosas e o meio nutritivo Knudson (modificado por Arditti, 1967).

A composição dos meios nutritivos é bastante variável, em função da espécie vegetal e da origem do explante, sendo constituído de componentes essenciais e opcionais. Para definir qual o meio mais completo para cada caso, deve-se lançar mão de alguns ensaios, dando ressalva aos melhores resultados e, proporcionando melhor uso do meio nutritivo na cultura de tecidos.

Torres et al. (2001) descrevem que o meio de cultura é constituído de componentes essenciais: água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento e, opcionais: aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas. A composição do meio de cultura desempenha importante papel nas respostas de crescimento de células e tecidos *in vitro* (Borgatto et al., 2002).

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais, como celulose, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células. A sacarose é um dos carboidratos mais usados nos meios nutritivos, suportando as mais altas taxas de crescimento na maioria das culturas, seguido da glicose e frutose nos níveis de 2% a 5% (p/p) (George, 1996). Para cada

espécie, o crescimento do explante dependerá da concentração de sacarose no meio.

Os meios nutritivos atendem, como princípio, as exigências de uma planta completa (Caldas et al., 1998). A adição dos fitorreguladores ao meio tem por finalidade prover possíveis carências endógenas, pois o explante encontra-se isolado das regiões produtoras e hormônios na planta matriz (Grattapaglia & Machado, 1990). Na cultura de tecidos, as citocininas mais comumente usadas são a cinetina (CIN), 6-benzilaminopurina (BAP), zeatina (ZEA), isopenteniladenina (2ip) e thidiazuron (TDZ), e as auxinas são o ácido 3-indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Caldas et al., 1998).

O carvão ativado adsorve substâncias tóxicas produzidas pelo explante (Fridborg et al., 1978). Em meios nutritivos, o carvão ativado estimula o enraizamento (Tilquin, 1979), reduzindo a quantidade de luz que chega à região de formação de raízes, promovendo o seu alongamento (Rajore & Batra, 2005).

As misturas complexas apresentam um papel importante, no desenvolvimento de meios nutritivos, para a cultura de tecidos de plantas. Alguns dos aditivos usados na categoria de misturas complexas incluem a água de coco (Caplin & Steward, 1948; Steward & Caplin, 1951; Van Overbeek et al., 1942), que é considerada o aditivo mais utilizado para grande número de espécies *in vitro*, não somente para estimular o crescimento de calo (Lingappa, 1957; Steward & Caplin, 1951), mas também na indução do desenvolvimento de embriões imaturos de *Datura* (Van Overbeek et al., 1942). O leite ou água de coco é o endosperma do coco (*Cocos nucifera*) na fase líquida ou gelatinosa e é um suplemento bastante usado e rico em sais minerais, mio-inositol e citocininas, bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos (Neumann et al., 1968).

### **2.1.7. Cultura de embriões**

A terminologia ‘cultura de embriões’ pode ser definida como o isolamento estéril e crescimento de um embrião imaturo ou maturo *in vitro*, com o objetivo de se obter uma planta viável. A cultura de embriões já era empregada por Rappaport (1954), para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião *in vitro*, independentemente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado.

O cultivo de embriões *in vitro* constitui uma técnica promissora para avançar nos conhecimentos de determinadas espécies uma vez que, a partir dela é possível reproduzir e estudar o desenvolvimento embrionário, a quebra da dormência e a produção de plântulas (Collins & Grosser, 1984; Hu & Ferreira, 1998). Além disso, acrescenta-se o fato de que tecidos embrionários são excelentes explantes, para serem usados em estudos, visando a propagação clonal *in vitro*, em virtude de sua natureza juvenil e alto potencial regenerativo (Pierik, 1990).

Um importante aspecto da cultura de embriões é definir um meio de cultura, que possa sustentar o seu crescimento e desenvolvimento (Hu & Ferreira, 1998). Com isso, tem-se buscado alternativas quanto à composição dos meios nutritivos, que se aproximem da composição do endosperma ou do saco embrionário e possibilitem o desenvolvimento dos embriões, independentemente do estágio em que se encontram (Andreoli, 1985). O meio de cultura adequado tanto para propagação quanto para a cultura de embriões deve ser adaptado para cada espécie. Embora diferentes meios sejam capazes de manter os microcultivos de embriões, o mais frequentemente utilizado é o MS (Andrade et al., 2001).

Um dos problemas da cultura de embriões é a germinação precoce dos embriões zigóticos, pois, as plântulas resultantes serão anormais ou fracas, podendo faltar estruturas ou só apresentar aquelas presentes no momento de

excisão (Larue & Avery, 1938). Várias são as formas utilizadas para evitar a germinação precoce, tais como: alta pressão osmótica, baixa tensão de nitrogênio, elevado nível de potássio e de nitrogênio, inclusão de ácido abscísico (ABA) ao meio, além de polietilenoglicol (Andreoli, 1985).

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de macro, micronutrientes e açúcares, que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese, por meio de propriedades osmóticas (George, 1996). Os carboidratos desempenham um importante papel na manutenção de uma osmolaridade adequada do meio de cultura. Em geral, quanto mais jovem for o embrião excisado, mais alta será a osmolaridade requerida do meio. Rietsema et al. (1953) mostraram que diferentes estádios de desenvolvimento do embrião de *Datura*, quando cultivados *in vitro*, requerem distintas concentrações de sacarose para seu crescimento.

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura de embriões só se faz necessária, quando o embrião se encontra no estágio imaturo. Os reguladores de crescimento são muitas vezes usados para evitar a germinação precoce ou para estimular o crescimento embrionário. O regulador efetivo para evitar a germinação precoce é o ácido abscísico (ABA), que está normalmente presente no saco embrionário (King, 1976; Hsu, 1979).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. M. da. C. O.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de. R.; PEREIRA, A. B.; ALVES, J. M. C. Cultura in vitro de embriões de *coffea arábica*: influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1063-1070, set./out. 2001.

ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, 1985. p. 25-28.

ARDITTI, J. Niacin biosynthesis in germinating x *Laeliocattlya* orchid embryos and young seedlings. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 54, n. 3, p. 291-298, 1967.

ÁRVORES exóticas no Brasil madeireiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 385 p.

BARBIERI, L.; BATTELLI, M. G.; STIRPE, F. Ribosome inactivating proteins from plants. **Biochimica biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1154, n. 3/4, p. 237-282, Dec. 1993.

BELTRÃO, N. E. M. de; CARTAXO, W. V. Considerações gerais sobre o pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras. 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Anais...** Varginha, 2006.

BORGATTO, F.; DIAS, C. T. dos S.; AMARAL, A. F. C.; MELO, M. Calcium, potassium and magnesium treatment of *chrysanthemum morifolium* cv. 'Bi Time' and Callogenesis *in vitro*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 4, p. 669-693, Oct./Dec. 2002

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORESTAS TROPICAIS, 2., 1976, Mossoró. **Anais...** Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976. p. 412-413. (Coleção Mossoroense, v. XLII).

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais.** Brasília, 1985. 364 p. (Brasil. Ministério da Indústria e do Comércio. Documentos, 16).

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

CAPLIN, S. M.; STEWARD, F. C. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. **Science**, Washington, v. 108, n. 2815, p. 655-657, 1948.

COLLINS, G. B.; GROSSER, J. W. Culture of embryos. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York: Academic Press, v. 1, p. 241-257, 1984.

CORTESÃO, M. **Culturas tropicais:** plantas oleaginosas. Lisboa: Clássica, 1956. 231 p.

DEHGAN, B.; WEBSTER, G. L. Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Botany**, Chicago, v. 74, p. 76, 1979.

DEHGAN, B.; SCHUTZMAN, B. Contributions toward a monograph of neotropical *Jatropha*: phenetic and phylogenetic analyses. **Annals Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 81, n. 2, p. 349-367, 1994.

FERNANDEZ, R. nicarágua biodiesel: el milagro Del tempate. **Envio digital**, Manágua, Nicarágua, n. 143, p. 23-26, nov. 1993. Disponível em: <<http://www.envio.org.ni/articulo.php>>. Acesso em: 29 nov. 2006.

FORNI-MARTINS, E. R.; CRUZ, N. D. da. Pesquisa em Desenvolvimento com pinhão paraguaio no Instituto Agrônômico. **O Agrônômico**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 109-113, 1985.

FRIDBORG, G.; PEDERSEN, M.; LANDSTROM, L. E.; ERIKSSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 43, n. 2, p. 104-106, 1978.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: part 1: the technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GERALD, L. T. S.; BRESSAN, E. A. de; JÚNIOR, J. P. Q. P.; ARAÚJO, D. R. F. de; MIRANDA, D.; FIOR, R. C.; SCHMIDT, V. A. Efeito da auxina na brotação e enraizamento de estacas de pinhão-manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Anais...** Varginha, 2006.

**Globo Rural**. Biodiesel o petróleo verde, novembro 2006. 45 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 99-169.

HELLER, J. Untersuchungen über genotypische Eigenschaften und Vermehrungs- und Anbauverfahren bei der Purgiernuß (*Jatropha curcas* L.) [**Studies on genotypic characteristics and propagation and cultivation methods for physic nuts (*Jatropha curcas* L.)**]. Hamburg: Dr. Kovac, 1992. p. 37-40.

HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas***: promotion and use of underutilized and neglected crops. Rome: IPGRI, 1996. 66 p.

HSU, F. C. Abscisic acid accumulation in developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 63, n. 3, p. 552-556, Mar. 1979.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., ED. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 371-393.

HUANG, D. R.; HUANG, D. H.; GUO, S. X.; PAN, K. Z.; HUANG, Z. Q.; LIN, J. Z. Purification and partial characterization of toxin from *Jatropha curcas*. **Progress in Biochemical Biophysics**, London, v. 18, n. 2, p. 149-151, 1991.

KING, R. W. Abscisic acid in developing wheat and its relationship to grain growth and maturation. **Planta**, Berlin, v. 132, n. 1, p. 43-51, 1976.

KOBILKE, H. **Untersuchungen zur Bestandesbegründung Purgiernub (*Jatropha curcas* L.)**. Stuttgart: University Hohenheim, 1989. p. 37-40.

LARUE, C. D.; AVERY, G. S. The development of the embryos of *Zizamia aquatica* in seed and in artificial culture. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 65, n. 1, p. 11-21, 1938.

LIN, J.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Isolation, purification and functional investigation on the N-glycosidase activity of curcin from the seeds of *Jatropha curcas*. **High Technology Letters**, Beijing, v. 11, n. 1, p. 36-40, 2002.

LINGAPPA, Y. Tissue cultures of *Solanum tuberosum* and *Ipomoea pandurata*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 44, n. 5, p. 419-423, 1957.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagation Society**, Ohio, n. 30, p. 421-427, 1980.

MUNCH, E.; KIEFER, J. F. Purging nut (*Jatropha curcas* L.) multiple use plant as a source of fuel in the future? **Schriftenreihe der Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit**, Stuttgart, v. 209, n. 1, p. 32, 1989.

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

NEUMANN, K. H.; RAO, K. V. N.; STEWARD, F. C. Investigations on the growth and metabolism of cultured explants of *Daucus carota*. II. Effects of iron, molybdenum and manganese on metabolism. **Planta**, Berlin, v. 81, n. 4, p. 351-371, 1968.

OJEWOLE, J. A. O.; ODEBIYI, O. O. Neuromuscular and cardiovascular action of tetramethylpyrazine from the stem of *Jatropha podagrica*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 38, n. 4, p. 8, 1980.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in vitro culture - A review. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 155-163, Nov. 1998.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 197. 284 p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. [S.l.]: Martins Nijhoff Publishers, 1990. 326 p.

Project zâmbia GTZ–ASSP. **The *Jatropha* Booklet**. A Guide to *Jatropha* Promotion in Zambia. 2000. 34 p.

QIN, W.; WEI-DA, L.; YI, L.; SHU-LIN, P.; YING, X.; LIN, T.; FANG, C. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas* L. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, Beijing, v. 30, n. 4, p. 475-478, 2004. Short Communication.

RAJORE, S.; BATRA, A. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. **Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology**, New York, v. 14, n. 4, p. 73-75, Jan. 2005.

RAPPAPORT, J. *In vitro* cultures of plant embryos and factors controlling their growth. **Botanical review**, New York, v. 20, n. 4, p. 201-225, 1954.

RIETSEMA, J.; SATINAS, S.; BLAKESLEE, A. F. The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos *in vitro*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 40, n. 7. p. 538-545, July 1953.

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.; FONSECA, K. S.; MARQUES, D. S.; SANTOS, M. G. P. dos; LEITE, A. R. .; GONÇALVES, N. P.; FARIA, R. S. de. Avaliação de clones de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L. ) coletados no Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Anais....** Varginha, 2006.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Produção de oleaginosas para o biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-74, 2005.

SCHULTZE-MOTEL, J. Rudolf Mansfelds Verzeichnis landwirtschaftlicher and gärtnerischer Kulturpflanzen. **Ohne Zierpflanzen**, Berli, v. 2, p. 272-296, 1986.

SISTEMA BRASILEIRO DE RESPOSTA TÉCNICA - SBRT. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais: relatório final**. Belo horizonte, 2005.

SOLOMON, R. A. J.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science**, Bangalore, v. 83, n. 11, p. 1395-1398, Dec. 2002.

STAUBMANN, R.; NCUBE, I.; GUBITZ, G. M.; STEINER, W.; READ, J. S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, n. 2/3, p. 117-126, 1999.

STEWART, F. C.; CAPLIN, S. M. A tissue culture from potato tuber: the synergistic action of 2, 4-D and of coconut milk. **Science**, Washington, v. 113, n. 2940, p. 518-520, 1951

SUJATHA, M.; DHINGRA, M. Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima* – Hypocotyl culture, shoot culture, leaf culture and peduncle culture medium optimization for oilseed ornamental plant propagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 35, n. 3, p. 293-296, Dec. 1993.

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

TILQUIN, J. P. Plant regeneration from stem callus of *Cassava*. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 57, n. 16, p. 1761-1763, Aug. 1979.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 21-24.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília – DF, 2001. 19 p. (Circular Técnica, n. 24).

VAN OVERBEEK, J.; CONKLIN, M. E.; BLAKESLEE, A. F. Cultivation *in vitro* of small *Datura* embryos. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 29, p. 472-477, 1942.

WHITE, P. R. Plant tissue cultures. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 11, p. 615-628, 1942.

## CAPÍTULO II

### 1 RESUMO

NUNES, Claudinéia Ferreira. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas obtidas a partir de germinação *in vitro* da espécie *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). In:\_\_\_\_\_. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-mansão ( *Jatropha curcas* L.)**. 2007. Cap. 2, p. 27-45 Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O óleo do pinhão-mansão é considerado eficiente para a produção de biodiesel. Porém, um grande número de informações referentes à espécie precisam ser geradas, envolvendo caracterização morfológica e genotípica, técnicas de propagação e criação e manutenção de banco de germoplasma. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi descrever a morfologia do fruto, da semente e do desenvolvimento de plântulas de *Jatropha curcas* L. Os frutos foram coletados em julho de 2006, no município de Bom Sucesso, região sul do Estado de Minas Gerais. Na descrição da morfologia dos frutos e das sementes foram utilizados 50 frutos e 50 sementes, considerando suas características: externas e internas. Para a caracterização das etapas da germinação foram utilizadas 60 sementes, inoculadas em meio de cultura MS suplementado com 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar. Após a inoculação as sementes foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de 27± 1°C, irradiância de 35 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, com fotoperíodo de 16 horas. Foram feitas avaliações diárias durante 30 dias, para a ilustração dos processos de germinação. O fruto de *J. curcas* é seco, tricoca, endocarpo lenhoso e de deiscência explosiva. A semente é ovalada, endospermica, de envoltório liso com suaves estrias, com carúncula presa na parte ventral; a rafe é marcada longitudinalmente e pouco evidente, e presença de embrião munido com um par de cotilédones foliáceos e eixo hipocótilo radícula, cilíndrico e reto. A germinação é epígea e fanerocotiledonar. Foi possível descrever e ilustrar a morfologia do fruto, da semente e da plântula de *J. curcas*.

---

\*Orientador: Moacir Pasqual – UFLA

## 2 ABSTRACT

NUNES, Claudinéia Ferreira. Morphological characterization of fruits, seeds and seedlings obtained from *in vitro* germination of the species *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). In: \_\_\_\_\_. **Fruit, seed and seedling characterization and embryo culture of physic nut (*Jatropha curcas* L.)** 2007. Cap. 2, p. 27-45 Dissertação (Master in Phytotechny)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Physic nut oil is considered efficient to produce biodiesel. However, little information has been generated on this crop, such as morphologic and genetic characterization, techniques on propagation, cultivation and germplasm maintenance. Therefore, the objective of this work was to describe *Jatropha curcas* L fruit and seed morphologies and its seedling development. Fruits were harvested in July 2006, in Bom Sucesso city, south region of Minas Gerais state. To describe fruit and seed morphologies, 50 fruits and 50 seeds were used and their inner and outer peculiarities were considered. To characterize its *in vitro* germination stages, 60 seeds were used, inoculated in MS culture medium amended with sucrose (30 g.L<sup>-1</sup>) and solidified using agar (6.0 g.L<sup>-1</sup>). After inoculation, seeds were transferred to growth chamber with 27± 1°C temperature, 16 hours photoperiod and 35 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> irradiance. Daily evaluations were performed for 30 days, to illustrate the germination process. Seed is oval, endospermic, smooth testa with light streaks, possesses caruncle in the ventral part; the rafe is marked longitudinally and slightly evident, embryo encompasses a pair of foliaceous cotyledons and the hypocotyls-radicle axis is cylindrical and straight. Germination is epigeous and phanerocotyledonal. It was possible to describe and illustrate the fruit, seed and seedling morphologies of *J. curcas*.

---

\* Advisor: Moacir Pasqual – UFLA

### 3 INTRODUÇÃO

Estudos do desenvolvimento pós-seminal fornecem importantes informações sob o ponto de vista taxonômico, auxiliando na identificação das estruturas essenciais da plântula.

Para a identificação de uma espécie vegetal, diversos caminhos podem ser adotados, entre eles as características morfológicas, a anatomia da madeira e a dendrologia (Roderjan, 1983). Os estudos sobre morfologia de plântulas têm merecido atenção há algum tempo, quer seja como parte de estudos morfo-anatômicos, objetivando ampliar o conhecimento sobre determinada espécie ou grupamento sistemático vegetal, quer visando o reconhecimento e identificação de plântulas de certa região, dentro de um enfoque ecológico (Oliveira, 1993). Além disso, fornecem informações sobre a germinação, armazenamento, viabilidade e métodos de semeadura, auxiliando, também, em trabalhos de análise do ciclo vegetativo das espécies. Com base nas ilustrações obtidas, pode-se facilitar e padronizar a identificação (Silva et al., 1995).

A importância do conhecimento sobre o comportamento germinativo e o desenvolvimento das plântulas foi demonstrada por Labouriau et al. (1963), quando utilizaram as características morfológicas de plântulas, para estudar a regeneração natural do cerrado, identificando as espécies, que regeneravam a partir de sementes, pela observação das plântulas, que apresentavam evidências de germinação.

Pinheiro (1986) relata que a identificação da plântula no estágio juvenil é tarefa árdua, que dificilmente é completada. Isso, porque os caracteres morfológicos externos de uma planta, nos estágios iniciais de desenvolvimento, podem ser diferentes daqueles observados no indivíduo adulto, além de plântulas

de espécies e gêneros afins, que, normalmente, apresentam semelhanças morfológicas externas, o que torna a identificação das espécies imprecisa e, às vezes, até impossível. De acordo com Damião Filho (1993), a interpretação das estruturas da planta jovem é de fundamental importância, quando se faz necessária à mensuração dos diferentes estádios de crescimento da planta.

A *Jatropha curcas* L., conhecida popularmente como pinhão-mansão, pertence à família botânica *Euphorbiaceae*, originária da América tropical. No Brasil é encontrada nos Estados da região Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Globo Rural, 2006). A planta pode atingir de 3m-5m de altura, de aspecto suculento, tronco com casca parda escura, escamando em lâminas diminutas e finas, ramagem longa, herbácea, com folhas simples, alternas e membranáceas, presença de inflorescências terminais ou axilares (Árvores exóticas 2003).

Essa espécie tem sido estudada fitoquimicamente, devido à sua importância medicinal. Todas as partes da planta, incluindo as sementes, folhas e cascas, frescas ou como decocção são usadas na medicina tradicional e em empregos veterinários. O óleo possui ação purgativa e é amplamente usado na medicina chinesa (Isawuimi, 1978). O látex apresenta propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cândida albicans*, entre outros (Thomas, 1989). Outros usos na medicina tradicional são descritos pelos autores Elisabetsky & Gely (1987), Lentz (1993) e Manandhar (1995), Oliver-Bever (1986).

Os estudos sobre *J. curcas*, em sua maioria, estão relacionados a aspectos químicos e empregos farmacológicos e biocidas, o que deixa lacunas, principalmente, no que se refere à ecologia, cultivo e conservação. Peixoto (1973), citado por Saturnino et al.(2005) relata sobre a morfologia da *J.curcas*. Porém, são restritos os trabalhos que apresentam ilustrações referentes aos aspectos morfológicos da espécie.

Mediante a importância medicinal e econômica da espécie, e da necessidade de produção de mudas, torna-se necessário um maior conhecimento fisiológico da referida espécie.

Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever e ilustrar os caracteres morfológicos do fruto, da semente e do desenvolvimento de plântulas de *Jatropha curcas* L.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

A caracterização do fruto, da semente e da plântula foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os frutos foram coletados manualmente, de forma aleatória, no mês de julho de 2006, em três plantas no município de Bom Sucesso, região sul do Estado de Minas Gerais, com coordenadas entre 21° 00' a 21°19' S e 44°00' a 45°07' W e altitude média de 806m. A exsicata do material vegetal utilizado neste trabalho está depositada no Herbário Central da Universidade Federal de Lavras sob nº 6203.

Para a descrição da morfologia dos frutos e das sementes foram utilizados 50 frutos e 50 sementes retiradas dos frutos, coletados em árvores nativas da região de Bom Sucesso e acondicionados em sacos de papel. Os frutos foram descritos, considerando-se os seguintes aspectos: dimensões, tipo, cor, textura, deiscência e número de sementes por fruto. No estudo da semente, as características externas observadas foram: dimensões, cor e textura do envoltório e presença de carúncula. As características internas foram: forma do embrião e presença do endosperma. Para isso, as sementes foram seccionadas, longitudinalmente, com auxílio de bisturi e examinadas sob lupa de mesa com aumento de seis vezes. O comprimento, a largura e o diâmetro dos frutos e sementes foram medidos, utilizando-se paquímetro com precisão de  $\pm 0,2$  mm. Foi calculado o erro padrão da média para as dimensões: comprimento, diâmetro e largura.

Após a retirada da casca, as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos, sob agitação constante. Após três lavagens sucessivas em água destilada e autoclavada, foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado

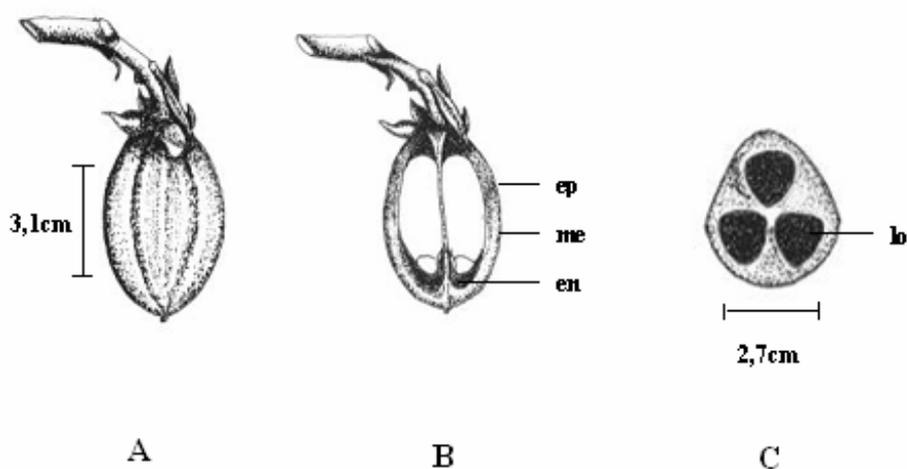
com  $30\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar (Merck®). O pH do meio foi ajustado em 5,8 e o meio de cultura foi autoclavado a  $121^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Logo após a inoculação, as sementes foram transferidas para sala de crescimento a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , irradiância de  $35\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas de 20W (Osram®), com fotoperíodo de 16 horas. Foram utilizadas 60 sementes, para a caracterização do desenvolvimento da plântula.

A germinação e o desenvolvimento das plântulas foram observados diariamente, desde o entumescimento da semente até a formação completa da plântula, aproximadamente, 30 dias. As descrições e ilustrações foram efetuadas de forma manual, utilizando-se as técnicas de desenho a nanquim. Consideraram-se como germinada a semente que apresentava emissão de radícula e como plântulas normais, as que apresentavam folhas cotiledonares abertas. A terminologia utilizada foi baseada nos trabalhos de Damião Filho (1993) e Ferri (1983). As ilustrações foram feitas por Dalíhia Nazaré dos santos, graduanda do curso de Agronomia pela Universidade Federal de Lavras.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Aspectos morfológicos do fruto

O fruto de *Jatropha curcas* é seco, com três cocas globosas, amarelo, liso, coriáceo, capsular, ligeiramente roliço, com ápice e base agudos e entre os cárpides observa-se a presença de suaves sulcos. O endocarpo é lenhoso (rijo e duro), com pequenos orifícios nos pontos de união dos carpelos, através dos quais passam cordões fibrosos, que contornam os pontos de junção e se distribuem pelas partes dorsal e ventral das cocas. O fruto seco apresenta deiscência explosiva, fazendo com que as cocas se fendam longitudinalmente, liberando as sementes (Figura 1).



**FIGURA 1.** Aspecto morfológico do fruto de *Jatropha curcas* L.: **A)** fruto; **B)** seção longitudinal do fruto; **C)** seção transversal do fruto. (**en**-endocarpo; **ep**-epicarpo; **lo**-lóculos; **me**-mesocarpo). Ilustração: Dalíhia Nazaré dos Santos. UFLA, Lavras-MG, 2006.

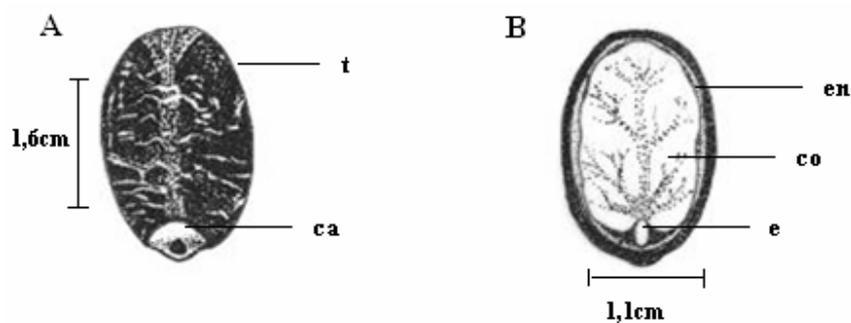
Quando maduro, o fruto apresenta coloração marrom-escura, a superfície é lisa e o pericarpo apresenta duas zonas distintas: o exocarpo, película mais fina, e o endocarpo, mais grosso. Próximo à deiscência, o exocarpo desprende-se do fruto, dando-lhe um aspecto mais áspero. No interior do fruto encontram-se geralmente três sementes. O fruto tem, em média, 3,1 cm de comprimento e 2,7 cm de diâmetro, com os respectivos desvios padrão, 0,12 a 0,16 respectivamente. Dependendo da região e das condições edafoclimáticas, é possível encontrar frutos com dimensões maiores.

O fruto da *J. curcas* apresenta três cocas, equivalente à espécie *J. elliptica* e aos gêneros *Cnidoscolus polyanthus* I.M. Johnst, *Euphorbia* L., e *Euphorbia heterophylla* L., sendo diferentes aos do gênero *Aleurites*, *Anagallis* L., e *Apium* L. Nas Euphorbiáceas, as cocas apresentam deiscência explosiva, mas, freqüentemente, são tardiamente deiscentes e, ainda, apresentam a semente no seu interior após a maturação (Groth, 1983). Nota-se que muitas das características observadas nos frutos de *J. curcas* foram detectados em frutos de outros gêneros de Euphorbiaceae, como o mecanismo de propulsão que é explosivo. Barroso et al. (1999) esclarecem que todos se relacionam entre si e, possivelmente, devem ter se originado de um ancestral comum. Conforme Peixoto (1973), o fruto compõe-se de 53 a 62% de sementes e de 38 a 47% de cascas, conforme o tamanho do fruto.

#### **Aspectos morfológicos da semente**

A semente da *Jatropha curcas* apresenta forma ovalada, de dorso convexo, endospermica, de envoltório liso, coloração preta, marcada por suaves estrias. Apresenta rafe pouco evidente e presença de carúncula, uma excrescência da testa, situada próxima à micrópila, presa na parte ventral. A carúncula tem a extremidade cônica, com dois lóculos, pouco visíveis, quando a semente está seca.

Dentro da semente encontra-se o albúmem ou endosperma, de coloração branca, tenro e rico em óleo. O embrião é munido de dois cotilédones foliáceos, muito largos, porém, pouco espessos. O contorno dos cotilédones é ovalada, com nervação marcada e eixo hipocótilo-radícula, cilíndrico e reto (Figura 2). As sementes coletadas na região de Bom Sucesso apresentaram, em média, 1,6 cm de comprimento por 1,1 cm da menor largura, com desvio padrão de respectivamente 0,07 e 0,05.



**FIGURA 2.** Aspecto morfológico da semente de *Jatropha curcas* L.: **A)** semente (**ca**-carúncula,**t**-tegumento); **B)** seção longitudinal da semente (**en**-endosperma; **co**-cotilédone;**e**-eixo embrionário). Ilustração: Dalíhia Nazaré dos Santos. UFLA, Lavras-MG, 2006.

As sementes de *J. curcas* e de todas as Euphorbiaceas têm endospermas fartos, carnosos, ricos em reservas oleaginosas (Barroso et al., 1999). De acordo com Peixoto (1973), a semente tem 45% de casca e 55% de amêndoa, podendo ter 33,7% de casca e 66,3% de amêndoa, dependendo da variedade. Segundo Oliveira & Pereira (1987), estudos sobre morfologia de sementes são necessários devido à importância dessas estruturas na identificação botânica.

Para Damiano Filho (1993), a forma dos cotilédones também auxilia na identificação da plântula, apesar de ser muito variada, mas, constante para a espécie e, até mesmo, para gêneros de plantas. Segundo Ferri (1983), cotilédones foliáceos funcionam temporariamente como órgãos de reserva, sendo esta particularidade encontrada no albúmen ou endosperma, ao redor do embrião.

### **Germinação e morfologia da plântula**

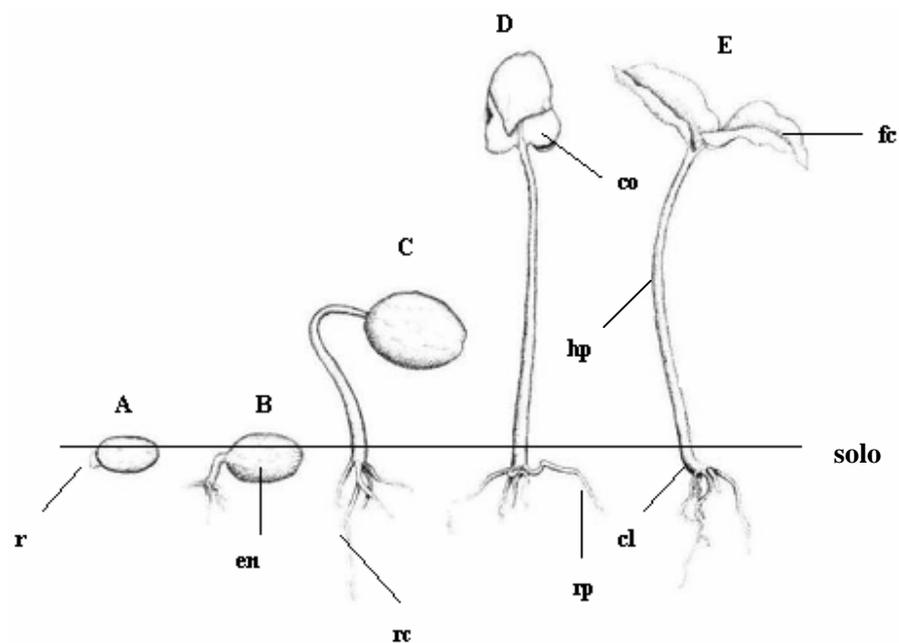
O meio MS utilizado como substrato para as condições deste trabalho, proporcionou a observação de todas as etapas do processo de germinação, desde a emissão da radícula, formação do sistema radicular até a completa formação da plântula.

O processo da germinação inicia-se com o entumescimento da semente, que aumenta de volume três dias após a inoculação, com posterior ruptura do tegumento e surgimento da radícula próximo à região micropilar (Figura 3 A e B) e conseqüente desenvolvimento da raiz. Normalmente, cinco raízes são formadas, uma central e quatro periféricas. Essas raízes periféricas desenvolvem-se a partir do colo.

A raiz central (Figura 3 C) é curta, espessa, glabra e de coloração verde-clara e demonstra rápido desenvolvimento, apresenta-se cilíndrica, tenra, esbranquiçada e, à medida que ocorre seu alongamento, a base torna-se mais espessa, afunilando-se em direção à coifa de coloração amarelada. As raízes

periféricas (Figura 3 D) apresentam características semelhantemente à raiz central. O coleto é bem definido pela diferença de cor e a dilatação que ocorre entre hipocótilo e as raízes.

Simultaneamente à formação do sistema radicular, ocorre o desenvolvimento do hipocótilo, de coloração branca-esverdeada (Figura 3 E), tenro, glabro, sendo espesso na inserção com as raízes, tendendo a afinar-se, à medida em que se aproxima da inserção com os cotilédones. Os cotilédones são envolvidos inteiramente pelo endosperma (Figura 3 D). Por volta de sete dias após a emissão da radícula, as folhas cotiledonares estão completamente expandidas (Figura 3 E). A germinação é do tipo epígea, com duração do processo germinativo e desenvolvimento da plântula, variando entre 15 a 30 dias. Essas observações corroboram Anez et al. (2005), os quais, trabalhando com *J. elliptica*, verificaram que para essa espécie, o tempo até o desenvolvimento da plântula varia de 20 a 32 dias. Em *J. molissima*, esse período foi 7 a 16 dias (Oliveira & Pereira, 1987).



**FIGURA 3.** Aspecto morfológico da germinação e plântula de *Jatropa curcas*.L.: **A-E.**Germinação e plântula (**co**-cotilédono; **cl**-coleto; **en**-endosperma; **hp**-hipocótilo;**rp**-raiz periférica; **rc**-raiz central; **r**-radícula e **fc**-folha cotiledonar). Ilustração: Dalilhia Nazaré dos Santos. UFLA, Lavras-MG, 2006.

Considerou-se normal a plântula caracterizada pela presença de raízes periféricas e uma principal, cônica e esverdeada; hipocótilo cilíndrico com base mais espessa, presença de folhas cotiledonares verdes, margens lisas, ápice e base obtusas e penínérveas.

Houve 40% de plântulas normais. Resultados semelhantes foram obtidos por Anez et al. (2005), em estudos sobre caracterização morfológica de frutos,

sementes e plântulas de *J. elliptica*, que verificaram maior porcentagem de plântulas normais, porém, não superiores a 50%. Oliveira & Pereira (1987) observaram baixa porcentagem de plântulas normais em: *Aleurites fordii* Hemsl. (cerca de 3%), *Aleurites. moluccana* (9%), *Cnidoscolus. polyanthus* I.M. Johnst. (4%), *Hura. crepitans* (40%) e *J. molissima* Baill. (20-30%).

A presença de látex transparente e pouco viscoso no hipocótilo da plântula é percebido na espécie *J. curcas* e nos demais gêneros, *Cnidoscolus polyanthus* I.M. Johnst, *Aleurites* e *Hevea brasiliensis* Muell (Suda, 2001).

É conveniente ressaltar que em algumas sementes durante o processo de germinação, ocorre, primeiramente, a emissão e expansão das folhas cotiledonares; dando origem a uma plântula com o hipocótilo atrofiado e desenvolvimento tardio da raiz. Essas plântulas foram consideradas anormais. A identificação morfológica de plântulas também permite caracterizar famílias, gêneros e até espécies, tendo sido bastante aplicada nos estudos de inventário florestal, em regiões de clima temperado e tropical (Oliveira, 1993).

Assim como na maioria das espécies da família Euphorbiaceae, as sementes de *J. curcas* apresentam germinação do tipo fanerocotiledonar, com algumas exceções como *Hevea* sp., *Hura crepitans* L. e *Omphalea diandra* Vell. que têm germinação criptocotiledonar (Oliveira & Pereira 1987).

O processo de desenvolvimento radicular de *J. curcas* L., ou seja, o alongamento da raiz primária, seguida de raízes adventícias no colo, é semelhante ao observado em: *Aleurites fordii* Hemsl., *Cnidoscolus polyanthus* I.M. Johnst., *J. molissima* Baill. (Oliveira & Pereira, 1987) e *J. elliptica* (Anez et al., 2005).

O hipocótilo da plântula da *J. curcas* apresenta leve espessamento na base, sendo notado em outras espécies da família Euphorbiaceae, tais como: *A. fordii*, *A. moluccana* (L.) Wild., *H. crepitans*, *J. molissima*, *Omphalea. diandra* e *Cnidoscolus. phyllacanthus* Pax & K. Hoffm. (Oliveira & Pereira 1987). A

presença dessa característica em plântulas de outras espécies as classificaria como anormais nos testes de germinação, mas não em *J. curcas*. Brasil (1992) considera como plântulas anormais aquelas que não mostram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais, mesmo crescendo em solo de boa qualidade e sob condições favoráveis de umidade, temperatura e luz.

## 6 CONCLUSÕES

O fruto de *Jatropha curcas* é seco, deiscente, tipo capsula trilocular e endocarpo lenhoso.

A semente é ovalada, endospérmica, de envoltório liso com suaves estrias, com carúncula presa na parte ventral. A rafe é marcada longitudinalmente e pouco evidente.

O embrião é composto por um par de cotilédones foliáceos e eixo hipocótilo radícula, cilíndrico e reto.

A germinação é do tipo epígea e fanerocotiledonar.

A plântula apresenta cinco raízes, uma central e quatro periféricas; hipocótilo espesso na base, afinando-se próximo às folhas cotiledonares; as quais são penínérveas, de margens lisas, com base e ápice obtusos.

Os aspectos morfológicos descritos e ilustrados nas distintas fases observadas podem ser empregados em futuros estudos com a referida espécie.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEZ, L. M. M.; COELHO, M. F. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; DOMBROSKI, J. L. D. Caracterização morfológica dos frutos, das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Jatropha elliptica* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 563-568, jul./set. 2005.

ÁRVORES exóticas no Brasil madeireiras, ornamentais e aromáticas . Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. p. 385.

BARROSO, M. B.; MORIN, N. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. Frutos e sementes. In: \_\_\_\_\_. **Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Editora da UFV, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD-CLAV, 1992.

DAMIÃO FILHO, C. F. **Morfologia vegetal**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993.

ELISABETSKY, E.; GELY, A. Plantes médicinales utilisées en Amazonie comme fond potentiel de nouveaux agents thérapeutiques dans les cas d'allergie, thrombose et inflammation. **Journal D'Agriculture Traditionnelle et de Botanique**, Paris, v. 34, n. 1, p. 143-151, 1987.

FERRI, M G. **Botânica: morfologia externa das plantas (organografia)**. 15. ed. São Paulo, 1983.

Biodiesel o petróleo verde. **Globo Rural**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 253, p. 38-45, nov. 2006.

GROTH, D. Caracterização morfológica das unidades de dispersão de cinco espécies invasoras em algumas culturas brasileiras. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 5, n. 2, p. 81-110, 1983.

ISAWUMI, M. A. Nigerian chewing sticks. **The Nigerian Field**, v. 43, n. 3, p. 111-121, 1978.

LABOURIAU, L. G.; MARQUES, I. F. M.; LABOURIAU, M. L. S.; HANDRO, W. Nota sobre a germinação de sementes de plantas de cerrados em condições naturais. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 227-237, out. 1963.

LENTZ, D. L. Medicinal and other economic plants of the Paya of Honduras. **Economic Botany**, Bronx, v. 47, n. 4, p. 358-370, Oct./Dec. 1993.

MANANDHAR, N. P. Na inventory of some herbal drugs of Myadi district, Nepal. **Economic Botany**, Bronx, v. 49, n. 4, p. 371-379, Oct./Dec. 1995.

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

OLIVEIRA, E. C.; PEREIRA, T. S. Euphorbiaceae - Morfologia da germinação de algumas espécies. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 9, n. 1, p. 9-51, 1987.

OLIVEIRA, E. C. **Morfologia de plântulas**. In: AGUIAR, I. B. ; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Ed.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 175-214.

OLIVER-BEVER, B. E. P. **Medicinal Plants in Tropical West Africa**. Cambridge University Press, Cambridge, 1986.

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

PINHEIRO, A. L. **Estudos de características dendrológicas, anatômicas e taxonômicas de Meliaceae na microrregião de Viçosa, M. G.** 1986. 192 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, viçosa, MG.

RODERJAN, C. V. **Morfologia do estágio juvenil de 24 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. 1983. 148 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Produção de oleaginosas para o biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-74, 2005.

SILVA, L. M. M.; MATOS, V. P.; PEREIRA, D. D.; LIMA, A. A. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Luetzelburgia auriculata* Duke (pau-serrote) e *Pterogyne nitens* Tul. (madeira-nova-do-brejo) – Leguminosae. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 154-159, 1995.

SUDA, C. N. K. **Hidrolases da parede celular em sementes de *Euphorbia heterophylla* L. Durante a germinação e desenvolvimento inicial da plântula.** 2001. 147 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

THOMAS, O. O. Re-examination of the antimicrobial activities of *Xylopiya aethiopica*, *Carica papaya*, *Ocimum gratissimum* and *Jatropha curcas*. **Fitoterapia**, Milano, v. 60, n. 2, p. 147-155, 1989.

## CAPÍTULO III

### 1 RESUMO

NUNES, Claudinéia Ferreira. Cultura de embriões de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L). In:\_\_\_\_\_. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-manso ( *Jatropha curcas* L.)**. 2007. Cap. 3, p. 46-78 Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

No Brasil, culturas que armazenam substâncias oleaginosas nos frutos e sementes têm sido pesquisadas como fontes alternativas para o setor energético, visando a substituição total ou parcial do diesel mineral pelo vegetal. Dentre essas culturas o pinhão-manso tem despertado o interesse de vários pesquisadores. Com este trabalho objetivou-se estabelecer uma metodologia para a propagação desta espécie, por meio do cultivo *in vitro* de embriões. Os frutos foram coletados, desinfestados e seus embriões obtidos removendo-se o endosperma. A seguir foram submetidos a duas condições experimentais: (1), embriões oriundos de frutos em três estádios de desenvolvimento (imaturo, maduro e seco) foram inoculados em meio de cultivo MS, acrescido de sacarose (0, 15, 30 e 60 g.L<sup>-1</sup>); (2), embriões submetidos a quatro concentrações de carvão ativado (0; 1,0; 2,0 e 3,0g.L<sup>-1</sup>) e seis de água de coco (0, 50, 100, 150, 200 e 250mL), suplementado com 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Em sala de crescimento, o material foi mantido por 30 dias à temperatura de 27± 1°C, irradiância de 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, com fotoperíodo de 16 horas diárias. Empregou-se delineamento inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 3x4 para o primeiro experimento e 6x4 para o segundo, com quatro repetições. Verificou-se que embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos necessitam de suplementação de sacarose em meio de cultura para sustentar sua germinação. O meio MS suplementado com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose proporciona melhor desenvolvimento de embriões. Embriões oriundos de frutos secos apresentam maior crescimento *in vitro*. A associação de carvão ativado e água de coco não influencia na germinação dos embriões. No entanto, a presença de carvão ativado ao meio favorece o enraizamento dos embriões zigóticos de *Jatropha curcas*.

---

\*Orientador: Moacir Pasqual – UFLA

## 2 ABSTRACT

NUNES, Claudinéia Ferreira. Physic nut (*Jatropha curcas* L) embryo culture. In: \_\_\_\_\_. **Fruit, seed and seedling characterization and embryo culture of physic nut (*Jatropha curcas* L.)**. 2007. Cap. 3, p. 46-78 Dissertação (Master in Phytotechny)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

In Brazil, oilseed crops which store oily substances in fruits or seeds have been studied as alternative sources to the fuel industry aiming partial or total substitution of mineral diesel. Among those crops, physic nut has received attention of many searchers. The objective of this work was to establish a methodology to propagate this species by *in vitro* embryo culture. Fruits were collected, sanitized and its embryos were obtained by removing the endosperm. Then, they were submitted to two experimental conditions: (1) embryo from three fruit development stages (immature, mature and dry) were inoculated in MS medium, amended with sucrose (0, 15, 30 and 60 g.L<sup>-1</sup>); (2) embryo were submitted to four concentrations of activated carbon (0, 1.0, 2.0 and 3.0 g.L<sup>-1</sup>) and six of coconut water volumes (0, 50, 100, 150, 200 e 250 mL) both supplemented with 30g.L<sup>-1</sup> of sucrose. In growth chamber, the material was kept for 30 days at 27± 1°C temperature, 16 hours photoperiod and 35 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> irradiance. A complete randomized design in factorial scheme (3x4 for the first experiment and 6x4 for the second one) was used with four replicates. The MS medium amended with sucrose (60 g.L<sup>-1</sup>) resulted in the best embryo development. Embryo obtained from dry fruits showed higher *in vitro* growth and those from immature fruits needed sucrose amendment to the culture medium to accomplish germination. The use of activated carbon or coconut water did not influence embryo germination. However, in the presence of activated carbon, the culture medium improved zygotic embryo rooting of *Jatropha curcas*.

---

\* Advisor: Moacir Pasqual – UFLA

### 3 INTRODUÇÃO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), uma das espécies cultivadas do gênero *Jatropha*, é uma planta que apresenta grande potencial econômico para o mercado de biocombustíveis, podendo diversificar o sistema de produção e a renda dos agricultores brasileiros.

Na natureza, assim como, em pequenos viveiros onde é cultivada, essa planta também pode ser propagada por meio de sementes ou estacas. Dados referentes a enraizamento e produtividade de estacas de pinhão-manso são apresentadas por Gerald et al. (2006), Rtree (2004) e Saturnino et al. (2005). A multiplicação pela via seminífera apresenta algumas características indesejáveis como, plantios desuniformes, associados à falta de material genético melhorado. No entanto, a inconveniência da multiplicação por estacas está no grande volume de material necessário à propagação em larga escala comercial, razão pela qual, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas, visando novas alternativas de propagação.

A cultura de embriões pode ser utilizada para avançar nos conhecimentos da espécie *J. curcas*, uma vez que essa técnica permite estudos nas áreas de fisiologia e melhoramento vegetal. Outra vantagem é a de possibilitar a produção de explantes juvenis, provenientes de sementes, considerados excelentes à propagação clonal *in vitro*, em virtude de sua natureza juvenil e alto potencial regenerativo (Pierik, 1990). A utilização de plântulas como fonte de explante tem sido utilizada por Bertoni (1999), para o desenvolvimento do protocolo de micropropagação da mandioquinha-do-campo (*Zeyheria montana* Mart.), uma planta medicinal do cerrado.

Para várias espécies perenes, incluindo alguns membros da família Euphorbiaceae, como para *Jatropha podagrica* (Jesus et al., 2003) foi possível estabelecer protocolos de germinação *in vitro* de embriões zigóticos.

Porém, a germinação *in vitro* exige cuidados fundamentais para o seu sucesso, tais como: assepsia do explante, excisão do embrião, meio de cultivo que atenda às exigências dos diferentes estádios de desenvolvimento embrionário dentre outros cuidados. Definir o meio de cultura e/ou sua composição, com possibilidade de sustentar o crescimento e desenvolvimento de embriões imaturos, constitui-se no aspecto mais importante da cultura de embriões *in vitro* (Pasqual et al., 2001).

É importante ressaltar que o estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos utilizados como fonte de explante é fundamental para a expressão de seu potencial morfogenético (Chalupa, 1999). De acordo com George (1996), em geral, o desenvolvimento de embriões maduros *in vitro* ocorre em meios nutritivos simples, compostos de sais minerais, vitaminas e açúcares.

As exigências nutricionais requeridas por um tecido vegetal submetido às condições *in vitro* variam de acordo com o genótipo (Hazarika, 2003; Pospíšilová et al., 1999). Assim, o crescimento das culturas *in vitro* depende, em parte, da otimização da concentração de nutrientes minerais e de substâncias orgânicas presentes no meio nutritivo (Leifert et al., 1995). A sacarose é um dos componentes utilizados em maior quantidade nos meio de cultura (Murashige & Skoog, 1962). Devido à baixa capacidade fotossintética das plantas cultivadas *in vitro* (Hazarika, 2003; Pospíšilová et al., 1999), é necessária a adição de carboidratos aos meios de cultura, para suprir às necessidades metabólicas, quer participando na geração de energia, quer como fonte de esqueletos carbônicos para vários processos biossintéticos implicados na diferenciação e no crescimento celular (Leifert et al., 1995).

A água de coco pode ser usada como suplementação do meio de cultura, fornecendo açúcares e outros glicídios, aminoácidos e suas amidas, fitormônios e outros metabólitos, como forma de suprir às exigências nutricionais dos embriões, em especial, os imaturos (Henao, 1991; Hu & Ferreira, 1998; Roca & Mroginski, 1991).

Vários são os trabalhos que citam à utilização de água de coco, no cultivo *in vitro*, de diversas espécies perenes, por exemplo: Kononowicz et al. (1984) e Pence et al. (1980) com cacaueiro (*Theobroma cacao*); Ferreira et al. (2004) com cupuaçu; Latado et al. (1999) com citros dentre outros.

Muitas substâncias são utilizadas em meio nutritivo, com o objetivo de estimular e melhorar o crescimento do explante. O carvão ativado, por adsorver substâncias inibitórias do meio de cultura ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, promove o crescimento de embriões (Pasqual et al., 2001) e, normalmente, é adicionado ao meio de cultura, em concentrações que variam de 0,2% a 3% (Beyl, 2000). Segundo Pan & Staden (1998), a adição de carvão ativado no meio de cultura pode apresentar efeito benéfico ou adverso sobre o crescimento e desenvolvimento, dependendo do meio, explante usado e/ou dos objetivos da pesquisa.

Considerando os aspectos mencionados e o restrito conhecimento técnico-científico sobre a espécie *Jatropha curcas* L, com este trabalho objetivou-se estudar a germinação *in vitro* de embriões, em diferentes estádios fisiológicos de desenvolvimento e concentrações de sacarose. Também foram estudadas as possíveis interações do carvão ativado com água de coco, a fim de melhorar as condições de cultivo dos embriões *in vitro*.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos nos estádios imaturo, maduro e seco, coletados de plantas adultas de pinhão-manso, cultivadas em propriedade particular de plantio comercial, no município de Janaúba, norte de Minas Gerais, com localização geográfica de 15°47'50'' S e 43°18'31'' W, foram utilizados como fonte de embriões. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, Lavras - MG.

Após retiradas dos frutos, as sementes tiveram o invólucro exterior (casca) removido. Em seguida, realizou-se o procedimento de assepsia por imersão das sementes em água destilada e duas gotas do detergente comercial Ypê® por 1 minuto, seguido de álcool 70% v/v por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1% v/v do produto comercial Qboa® por 20 minutos (sob agitação constante). Os agentes desinfestantes foram retirados com triplice lavagem em água destilada estéril.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram transferidas para placas de Petri esterilizadas, contendo papel de filtro e com o auxílio de bisturi e pinça, os tegumentos das sementes foram separados longitudinalmente pela região oposta à micrópila, tomando-se o cuidado de não provocar danos aos embriões. Esses foram excisados e inoculados, individualmente, em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 15 mL do meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), modificado de acordo com cada experimento.

Embriões excisados foram submetidos a dois experimentos distintos: no primeiro, embriões entre as fases inicial e final de torpedo foram inoculados em meio MS, acrescido de diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 60 g L<sup>-1</sup>), com diferentes idades fisiológicas de frutos (imaturo, maduro e seco). Frutos imaturos caracterizavam-se pela coloração externa verde cana do epicarpo,

mesocarpo verde-claro, semente esbranquiçada, pouco resistente, endosperma pouco consistente e não completamente desenvolvido. Os frutos maduros apresentavam o epicarpo com coloração externa marrom-escura, mesocarpo esverdeado, semente de coloração marrom-intensa, bastante resistente e endosperma bem desenvolvido. Já os frutos secos apresentavam o epicarpo com coloração preta e em fase de deiscência, mesocarpo seco e sementes de coloração preta, com presença de estrias; no segundo experimento, embriões na fase final da maturação, provenientes de frutos secos foram inoculados em meio MS, acrescido de diferentes concentrações de carvão ativado (0; 1,0; 2,0 e 3,0g.L<sup>-1</sup>) combinados com 0, 50, 100, 150, 200 e 250 mL de água de coco comercial Kero coco<sup>®</sup> suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

Nos dois experimentos os meios foram solidificados com 6 g.L<sup>-1</sup> de agar (Merck<sup>®</sup>), com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Logo após à inoculação, os embriões foram transferidos para sala de crescimento a 27± 1°C, irradiância de 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas de 20W (Osram<sup>®</sup>) com fotoperíodo de 16 horas.

Após 30 dias do estabelecimento *in vitro*, as plântulas foram avaliadas com base nas seguintes variáveis:

- a) comprimento da parte aérea - medido a partir do colo da planta até o ápice, com auxílio de uma régua milimétrica, expresso em centímetros;
- b) número de folhas - obtido por contagem do número de folhas emitidas por explante;
- c) número de raízes - obtido por contagem do número de raízes emitidas por explante;
- d) porcentagem de embriões germinados - obtido por contagem dos embriões, que apresentavam crescimento inicial da radícula e presença de cotilédones;
- e) comprimento do sistema radicular - medido a partir do colo da planta até a ponta da maior raiz, expresso em centímetros.

Para ambos os experimentos empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 3x4 para o primeiro experimento e 6x4 para o segundo. Cada experimento foi constituído de 4 repetições, empregando-se para cada parcela experimental, 12 tubos de ensaio, sendo inoculado um embrião por tubo.

Para a análise estatística utilizou-se o software Sisvar (Ferreira, 2000), sendo os dados submetidos à análise estatística, com a aplicação do teste F a 5% de probabilidade. As médias quantitativas foram analisadas por regressão polinomial e, na comparação entre médias, utilizou-se o teste Tukey. Utilizou-se também, o ajustamento a modelos de superfície de resposta (Box & Draper, 1987), quando as diferenças entre os tratamentos mostraram-se significativas pelo teste F.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições de assepsia e a remoção dos endocarpos e tegumentos foram satisfatórias para a obtenção de embriões, como fonte de explantes para o cultivo *in vitro*. O explante não apresentou qualquer vestígio de escurecimento, caracterizado por processos oxidativos, processo comum no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Esses resultados têm sido constatados em outros estudos, como o de Castro et al. (2005), com murici (*Byrsonima verbascifolia*).

De fato, a remoção do endosperma da semente otimizou a propagação *in vitro* dessa espécie. Em ensaios preliminares notaram-se que embriões desprovidos de tecidos do endosperma germinaram, a partir do 3º dia de inoculação, apresentando no 12º dia o par de folhas cotiledonares em completa expansão. Já embriões com a presença do endosperma, apresentaram germinação tardia, somente após 10 dias da inoculação e deram origem às plântulas menores e mal formadas (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram descritos por Maliro & Kwapata (2000), com *Uapaca kirkiana* Mull. Arg., uma espécie frutífera tropical da África do Sul.

A remoção do endosperma antes da inoculação do embrião propiciou melhor germinação e formação de plântulas normais, com desenvolvimento de raízes, hipocótilo e formação do par de folhas cotiledonares.

### **Sacarose x estágio fisiológico do fruto**

O resumo da análise de variância para as variáveis analisadas está apresentada na Tabela 1. Verifica-se que houve diferença significativa para as variáveis comprimento da parte aérea, número de raízes e número de folhas em relação ao estágio fisiológico do fruto e concentração de sacarose isoladamente. Observou-se que a associação de sacarose à idade fisiológica dos frutos

proporcionou diferenças significativas nas taxas de germinação do material cultivado *in vitro*.

**TABELA 1.** Resumo da análise de variância, para comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), número de folhas (NF) e porcentagem de germinação (GERM) de embriões de *Jatropha curcas* L., em relação à concentração de sacarose e estágio fisiológico do fruto. UFLA, Lavras-MG, 2006.

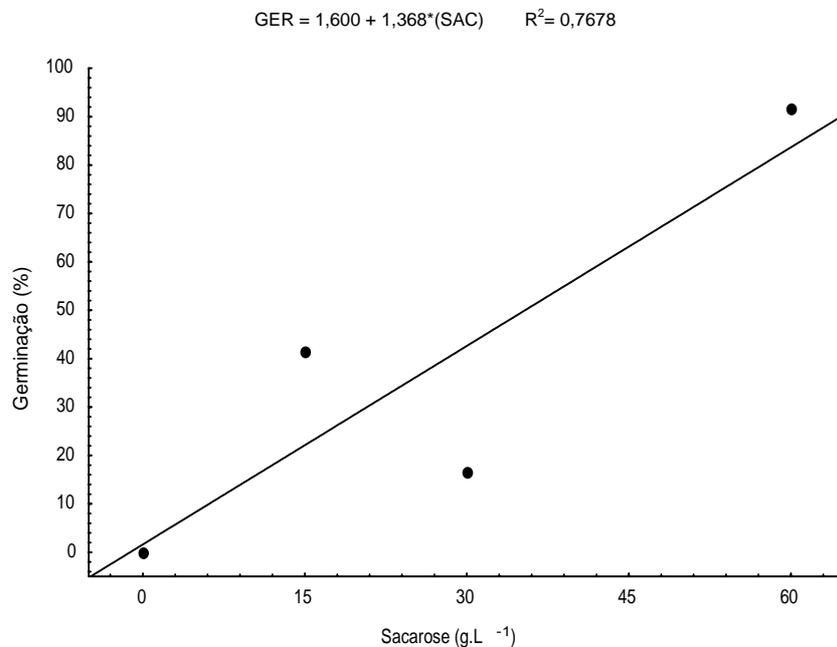
F V	G.L	Quadrado médio			
		CPA (cm)	NR (un)	NF (un)	GERM (%)
<b>Estádios (E)</b>	2	18,5815*	20,8546*	4,0159*	12981,0625*
<b>Sacarose (S)</b>	3	5,0973*	14,4533*	1,9822*	4485,6875*
<b>ExS</b>	6	1,4455 <sup>ns</sup>	4,2102 <sup>ns</sup>	0,6677 <sup>ns</sup>	1728,3125*
<b>Resíduo</b>	36	0,7767	2,1050	0,5656	659,9236
<b>CV %</b>		53,56	68,17	76,01	50,68

\* significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup> não significativo.

A maximização da porcentagem de germinação dos embriões foi obtida com a maior concentração de sacarose, para embriões oriundos de fruto imaturo (figura 1), sendo a concentração de sacarose indiferente, ou seja, não significativa para os estádios maduro e seco do fruto. A porcentagem de germinação cresceu linearmente com as concentrações de sacarose. A maior

porcentagem correspondeu à concentração de  $60 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose , contribuindo para uma porcentagem de 83,68% de embriões germinados. A ausência de sacarose no meio de cultura impediu a germinação dos embriões oriundos de frutos imaturos, confirmando a necessidade de se adicionar sacarose para o desenvolvimento do embrião.



**FIGURA 1.** Porcentagem de germinação de embriões de *Jatropha. curcas* L., oriundos de frutos imaturos, em função da concentração de sacarose no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2006.

Com esse resultado, verificou-se que no pinhão-manso, provavelmente, o processo de germinação para embriões oriundos de frutos maduros e secos, ocorre devido às reservas nutricionais dos cotilédones, independentemente, do fornecimento de sacarose, fato esse concordante com relatos de Mello (2000) para guaribeira. Estes resultados confirmam a hipótese de que, dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento dos embriões, a presença de carboidratos, no meio de cultura, pode ser em concentrações mínimas ou até dispensável (Garcia et al., 2002). De fato, embriões mais jovens necessitam de

concentrações mais elevadas de carboidratos no meio de cultura, para sustentar sua germinação (Bridgen, 1994).

Em relação ao estágio fisiológico do fruto, os melhores resultados para comprimento da parte aérea (2,65) e número de raízes (3,33) foram observados, quando utilizou-se embriões provenientes de frutos no estágio seco. Também, para a característica número de folhas, embriões nesse estágio apresentaram média de 1,53, superior ao estágio de fruto imaturo com 0,54, porém não houve distinção de resposta entre as médias dessa variável, para embriões oriundos de frutos nos estádios maduro e seco (Tabela 2).

Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados por Pereira et al. (2006), em que, embriões de murmuru (*Astrocaryum ulei*), oriundos de frutos maduros apresentaram maior crescimento *in vitro*, quando comparado aos embriões oriundos de frutos imaturos.

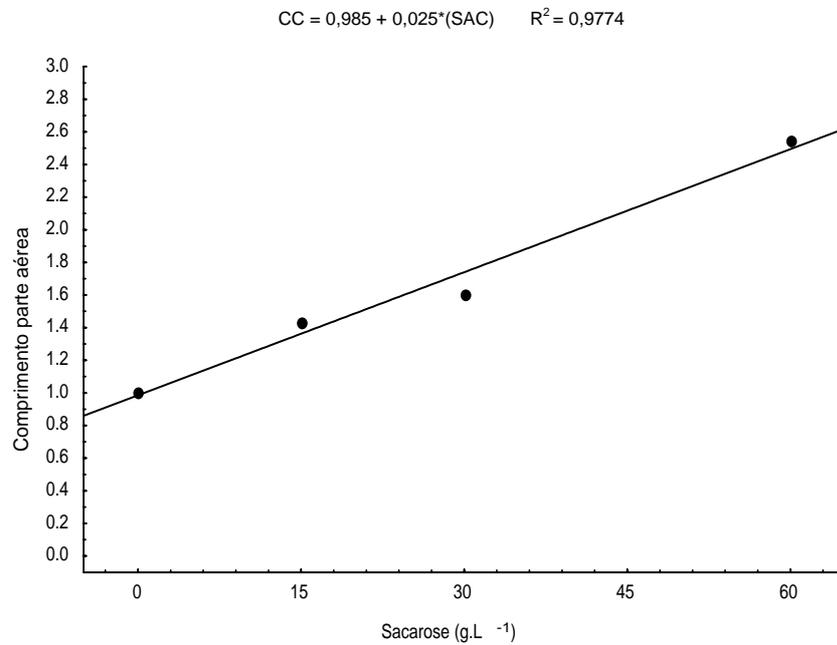
**TABELA 2.** Influência do estágio de desenvolvimento do fruto no comprimento da parte aérea (**CPA**), número de raízes (**NR**) e folhas (**NF**) de plântulas *in vitro* de *Jatropha curcas* L.. UFLA, Lavras-MG, 2006.

<b>Estádio do fruto</b>	<b>CPA (cm)</b>	<b>NR (un)</b>	<b>NF (un)</b>
<b>imaturo</b>	0,51 <b>c</b>	1,06 <b>b</b>	0,54 <b>b</b>
<b>maduro</b>	1,77 <b>b</b>	1,98 <b>b</b>	0,89 <b>a b</b>
<b>seco</b>	2,65 <b>a</b>	3,33 <b>a</b>	1,53 <b>a</b>

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem, significativamente, entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Esses resultados levam a deduzir que o estágio fisiológico dos frutos influenciou o comprimento da parte aérea, número de raízes e folhas de embriões zigóticos de *J. curcas*, sob estas condições de cultivo, independentemente, das concentrações de sacarose testadas.

O aumento das concentrações de sacarose, no meio de cultura, beneficiaram o comprimento da parte aérea das plântulas (Figura 2), segundo um crescimento linear, independentemente do estágio em que os embriões foram excisados. Esse resultado discorda do obtido por Spera (1995), em que a maior altura de plântulas de *Jatropha podagrica*, para as diferentes concentrações de sacarose foi obtida, quando utilizou-se 30 g.L<sup>-1</sup>, com diminuição em concentrações maiores.

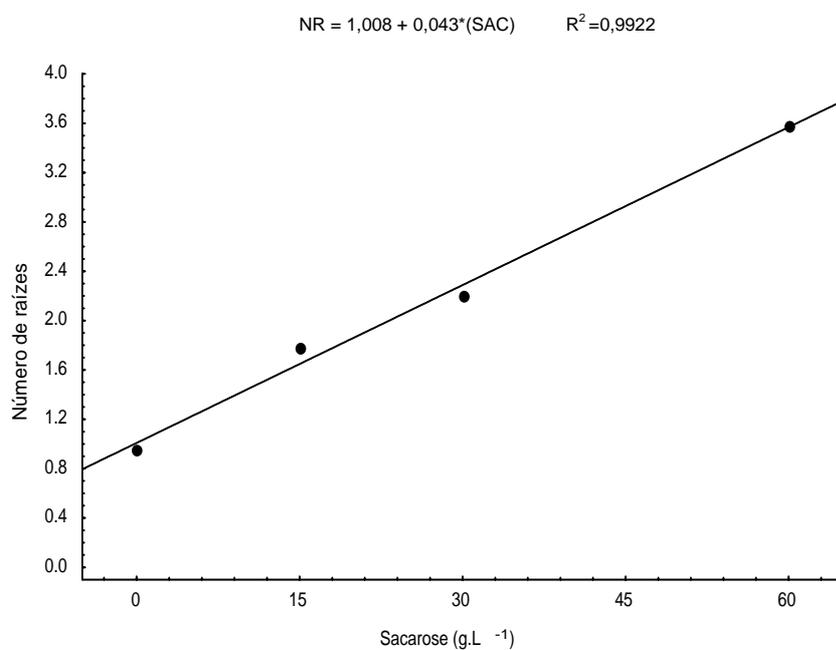


**FIGURA 2.** Comprimento da parte aérea de plântulas de *Jatropha. curcas* L., em função da concentração de sacarose no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2006.

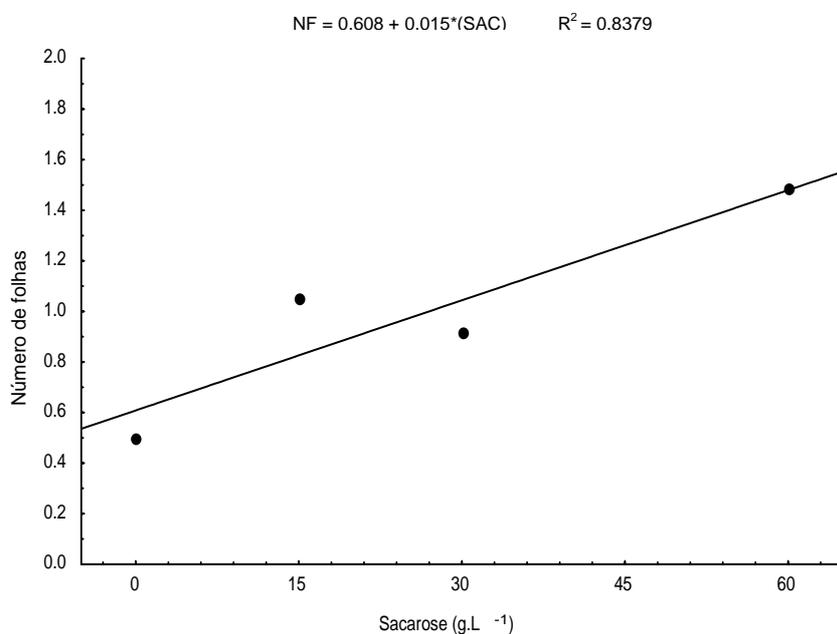
Nota-se, que a cada um grama na concentração de sacarose, ocorre uma contribuição de 0,025 cm, no comprimento da parte aérea das plântulas, evidenciando ser a sacarose indispensável para o crescimento das plântulas. Entretanto, a eficiência desse procedimento nem sempre é a desejável, podendo a concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> responder bem ao objetivo do trabalho. Além do que, o acréscimo de sacarose poderá ser oneroso, quando se trata de um simples ajuste de cultura não resultando em multiplicação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Rodrigues et al. (2006), em que as melhores respostas para micropropagação de macieira (*Malus domestica*) foram obtidas com concentrações de sacarose entre 30 g.L<sup>-1</sup> e 60g.L<sup>-1</sup>.

Os maiores números de raízes e de folhas foram verificados, também, com a concentração de 60 g.L<sup>-1</sup> (Figuras 3 e 4). De acordo com a equação, a cada um grama na concentração de sacarose, há um acréscimo de 0,043 unidade de raiz e 0,015 unidade de folha.



**FIGURA 3.** Número de raízes de plântulas de *Jatropha. curcas* L., em função da concentração de sacarose no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2006.



**FIGURA 4.** Número de folhas de plântulas de *Jatropha. curcas* L., em função da concentração de sacarose no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2006.

Esses dados corroboram àqueles relatados por Skrebsky et al. (2004), onde verificaram que o maior número de raízes de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) foi obtido entre as concentrações de 45 g.L<sup>-1</sup> e 60g.L<sup>-1</sup> de sacarose. E, em parte, com Chagas (2003), trabalhando com embriões imaturos provenientes de hibridação controlada entre diversas cultivares de citrus, que obteve maior número de folhas na concentração de 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

A alta concentração de sacarose no meio de cultura contribui para a obtenção de um crescimento ótimo, suportando as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. Entretanto, teores elevados podem inibir à

síntese de clorofila nas espécies cultivadas. É sabido, que a sacarose no meio de cultivo *in vitro* influencia vários processos metabólicos nas culturas, apresentando efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos. George (1996) verificou que o aumento na concentração de sacarose, de modo geral, estimula o crescimento e à formação de raízes de algumas espécies. Já em outros trabalhos, na fase de enraizamento, a redução da concentração de sacarose no meio de cultura, vem sendo citada como benéfica na melhoria da qualidade do sistema radicular, bem como na sobrevivência das plântulas transplantadas (Andrade, 1998).

De modo geral, os melhores resultados para todas as variáveis analisadas foram obtidos com o aumento das concentrações de sacarose no meio de cultura até a concentração de  $60 \text{ g.L}^{-1}$ . A necessidade de adição de sacarose, no meio para cultura de embriões, tem sido observada por vários autores, em distintas espécies de plantas (Hu & Ferreira, 1998; Raghavan & Torrey, 1963; Torres et al., 2005), principalmente, em cultura de embriões, em estádios iniciais de desenvolvimento (pró-embriões). Nas células, carboidratos são necessários como fonte de energia e de carbono nos processos biossintéticos (Gösslová et al., 2001), servindo, também, como agentes osmóticos (Tremblay & Tremblay, 1991).

Resumidamente, as melhores médias para as variáveis, comprimento da parte aérea, número de raízes e folhas, foram observados, quando utilizaram-se embriões provenientes de frutos secos, indicando que os embriões mais desenvolvidos suportam melhor o crescimento *in vitro*, possivelmente, em razão do estágio mais avançado de diferenciação dos tecidos. Carimi et al. (1998) verificaram que embriões de citros, no estágio globular, tiveram desenvolvimento lento. Em contrapartida, os que se encontravam no estágio cotiledonar, tiveram melhor desempenho. Quando os embriões estão em fases

mais desenvolvidas adquirem capacidade autotrófica e, por vezes, podem responder melhor às condições do meio de cultura (Rhagavan, 1976).

Os resultados obtidos neste trabalho diferem dos obtidos por Spera (1995), que no cultivo de embriões de *Jatropha podagrica* constatou melhor desenvolvimento, em meio suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. No entanto, mesmo tendo ambos os trabalhos sido realizados com o gênero *Jatropha*, as espécies são diferentes, de sorte que o fator genético pode ter influenciado na diferença entre os resultados.

#### **Água de coco x carvão ativado**

Não houve influência dos tratamentos no percentual de germinação dos embriões, observando-se, em média 81%, de germinação. Esse resultado é divergente com o obtido por Spera (1995), que, estudando a propagação *in vitro* de *Jatropha podagrica*, obteve maior índice de velocidade de germinação (IVG), com a adição de carvão ativado no meio de cultura. Em parte, é comparável com Pinheiro et al. (2001), em que, a utilização de água de coco limitou a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancomia speciosa*).

A elevada taxa de germinação pode ser justificada pelo fato de existir no meio MS maior disponibilidade em macro e micronutrientes, vitaminas e aminoácidos necessários ao processo de germinação.

A interação entre água de coco (AC) com carvão ativado (CA) foi significativa, em relação ao comprimento da parte aérea (CPA). O efeito dos fatores testados para número de folhas (NF) e comprimento médio da raiz (CMR) ocorreu de forma isolada (Tabela 3).

**TABELA 3.** Resumo da análise de variância, para número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento médio da raiz (CMR) de plântulas de *Jatropha curcas* L., sob diferentes concentrações de água de coco e carvão ativado. UFLA, Lavras-MG, 2006.

F V	GL	Quadrados médios		
		NF (un)	CPA (cm)	CMR (cm)
Água de coco (AC)	5	0,9223*	3,9737*	1,2434 <sup>ns</sup>
Carvão ativado (CA)	3	0,8694 <sup>ns</sup>	7,5816*	15,5972*
AC x CA	15	0,5517 <sup>ns</sup>	2,0160*	1,5400 <sup>ns</sup>
Resíduo	72	0,3609	0,9960	1,0697
CV (%)		24,35	25,79	26,21

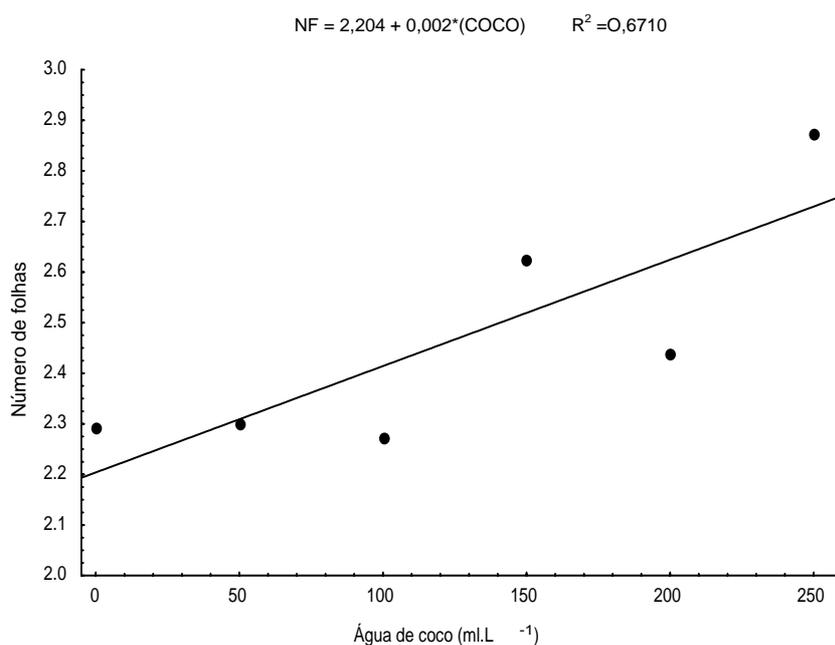
\* significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup> não significativo.

Verificou-se aumento linear do número de folhas por plântula formada, relacionadas à presença de maiores concentrações de água de coco, independentemente, das concentrações de carvão ativado. O número máximo de folhas (2,8) correspondeu à concentração de 250 mL de água de coco. Porém, a diferença do número de folhas da concentração de 200 para 250 mL é mínima, pois equivale a menos de uma folha/explante (Figura 5).

De acordo com a equação do gráfico, a cada 100 mL de água de coco adicionada ao meio de cultura, ocorre aumento de 0,2 un no número de folhas. De certa forma, o efeito estimulatório da água de coco pode ser explicado pelo fato deste aditivo ser rico em glicose e frutose, sais minerais, inositol,

citocininas, bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos (Ferreira et al.,1998).



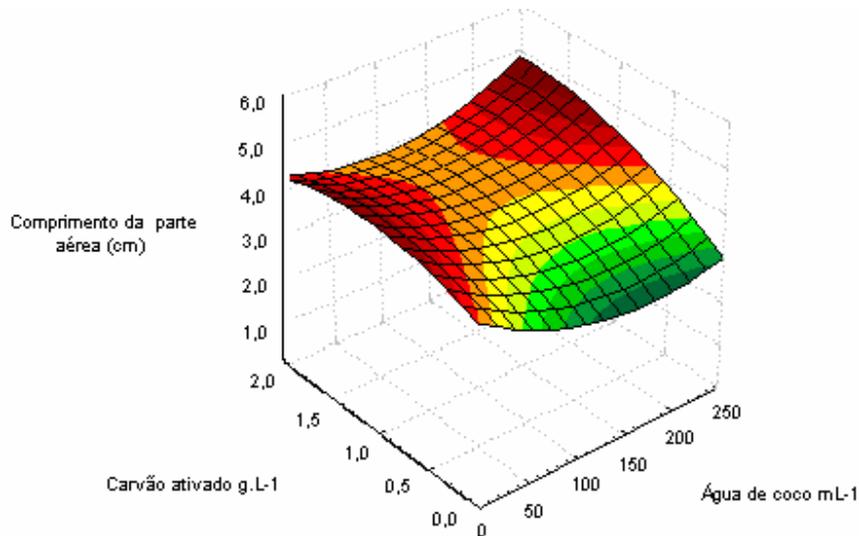
**FIGURA 5.** Número de folhas por plântulas de *Jatropha. curcas* L., em função da concentração de água de coco no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2006.

Esses resultados diferem dos encontrados por Carvalho et al. (2003), em que o sucesso da regeneração de embriões imaturos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) foi obtido, em meio suplementado com 10% de água de coco. Alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade de indução de embriogênese somática,

a partir de diversos explantes de cacauero (*Theobroma grandiflorum*) e (*T. cacao*) em meio suplementado com água de coco (Janick, 1988; Ledo et al., 2002; Li et al., 1998).

Os efeitos da interação AC x CA sobre o comprimento da parte aérea podem ser observados na Figura 6, em que são apresentadas a equação de regressão desta variável e a superfície de resposta resultante. Nota-se que as respostas foram de natureza quadrática, em que a maximização do comprimento da parte aérea foi obtida com a concentração intermediária de água de coco, suplementada com carvão ativado. O comprimento máximo da parte aérea correspondeu às combinações entre 100 e 150 mL de água de coco com as concentrações mais elevadas de carvão ativado, entre 1,5 e 2,0 g.L<sup>-1</sup>.

Segundo o modelo de superfície de resposta ajustado, a resposta máxima seria obtida com uma concentração de 125,84 mL de água de coco e 1,54 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, obtendo, em média, um comprimento de 4,03 cm/plântula. Evidencia-se, assim, que são necessárias concentrações entre 100 e 150 mL de água de coco, quando na presença de carvão ativado, para ter efeito sobre o explante.



$$CPA=4,10930,0152*(COCO)+1,1087*(CARVÃO)+0,00004*(COCO)^2-0,4892*(CARVÃO)^2+0,0031*(COCO)*(CARVÃO)$$

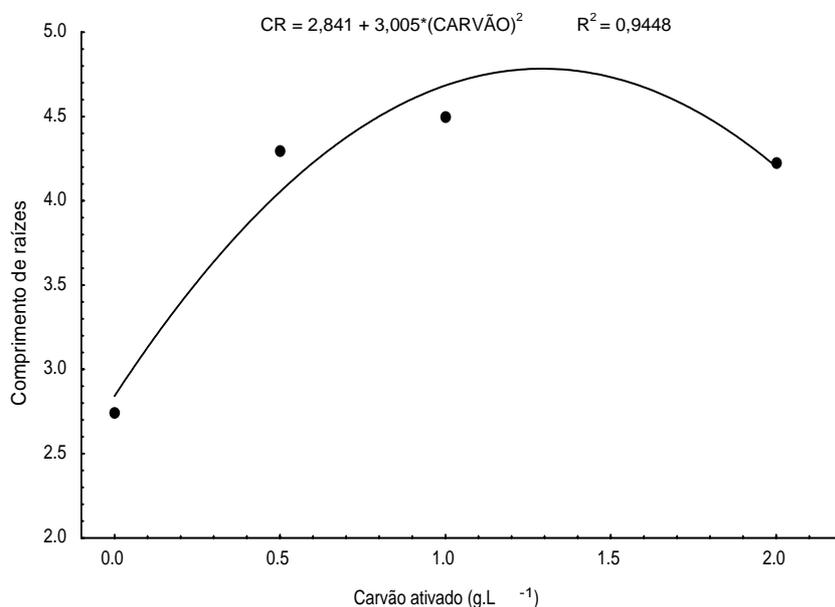
$$R^2 = 0,4074$$

**FIGURA 6.** Comprimento médio de raízes por plântulas de *Jatropha. curcas* L., submetidos a diferentes concentrações de água de coco e carvão ativado no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2006.

A resposta dos efeitos do carvão ativado, em cultivo *in vitro* parece ser dependente não somente do tipo de carvão utilizado e seu grau de ativação, mas também das substâncias adicionadas ao meio de cultura, como por exemplo, a água de coco x carvão ativado. Efeito benéfico do carvão foi constatado em trabalhos realizados por Boulay (1984), Ricci et al. (2002), com a utilização de concentrações entre 0,1% e 2%. Em contrapartida, o carvão pode também apresentar respostas adversas sobre o crescimento e desenvolvimento do explante *in vitro*.

Ribeiro et al. (2000), trabalhando com citros (*Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raj) constataram boa eficiência do carvão ativado no comprimento da parte aérea, quando utilizaram 0,5 e 2,0 g.L<sup>-1</sup>. Conforme Chagas et al. (2005), a adição de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado proporcionou maior comprimento da parte aérea de plântulas oriundas de embriões globulares, provenientes de hibridação controlada entre *Citrus sinensis* (L) Osbeck ‘Pêra Rio’ x *Citrus reticulata* Blanco ‘Poncã’.

As concentrações de carvão ativado, adicionadas ao meio de cultura, influenciaram o comprimento das raízes das plântulas formadas (Figura 7). Observou-se aumento dessa variável até a concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de carvão no meio de cultura. A partir desse valor verificou-se decréscimo dessa variável, quando as concentrações aumentaram de 1,0 g.L<sup>-1</sup> para 1,5 g.L<sup>-1</sup> e de 1,5 g.L<sup>-1</sup> para 2,0 g.L<sup>-1</sup>. A concentração ótima de carvão ativado foi obtida com 1,29 g.L<sup>-1</sup>, correspondendo a um crescimento máximo de 4,78cm, no comprimento médio de raízes de plântulas de *J. curcas*.



**FIGURA 7.** Comprimento médio de raízes por plântulas de *Jatropha curcas* L., em função da concentração de carvão ativado no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2006.

Esses resultados corroboram afirmações de Fráguas (2003), de que a adição de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado aumentou o número de raízes em plântulas de figueira (*Ficus carica* L.) multiplicadas em meio WPM. Entretanto, divergem de Villa et al. (2006), em que o maior comprimento e número de raízes de plântulas micropropagadas de amoreira-preta (*Rubus spp*) foram obtidos na presença de 3 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Também, Erig et al. (2004) e Nicoloso et al. (2001), trabalhando com enraizamento de pereira (*Pyrus communis* L.) e gengeng brasileiro (*Pfaffia glomerata*), respectivamente, não observaram formação de raízes em meio suplementado com carvão ativado.

De fato, o carvão ativado favoreceu o enraizamento e o alongamento das raízes das plântulas oriundas de embriões zigóticos de *J. curcas*, provavelmente, pela redução da incidência de luz, na zona de crescimento ativo do sistema radicular (Bonga, 1985).

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a hipótese de que a adição de carvão ativado no meio de cultura, pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do tecido utilizado (Pan & Standen, 1998).

## 6 CONCLUSÕES

Embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos de pinhão-manso necessitam da suplementação de sacarose, no meio de cultura, para sustentar sua germinação.

Embriões oriundos de frutos secos apresentam melhor desempenho *in vitro*.

O meio MS suplementado com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose proporciona bom desenvolvimento dos embriões.

A associação de carvão ativado e água de coco não influenciam na germinação dos embriões.

Sob condições *in vitro*, embriões zigóticos de pinhão-manso desenvolvem bem em meio suplementado com carvão ativado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. B. **Efeito do meio de cultura, tipos de explante e períodos de escuro sobre a micropropagação da batata (*Solanum tuberosum* L.), cv. Cristal.** 1998. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

BERTONI, B. W. **Propagação clonal e gâmica de *Calendula officinalis* L.** 1999. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 1999.

BEYL, C. A. Getting started with tissue culture - media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.). **Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises.** London: CRC Press, 2000. p. 21-38.

BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M. , DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry.** Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 4-35.

BOULAY, M. Aspects pratiques de la multiplication in vitro des essences forestiers. **Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL**, Nangis, p. 7-43, 1984.

BOX, G. E. P. , DRAPER, N. R. **Empirical model-building and response surfaces.** Willey series in probability and mathematical statistics. New York : John Willey, 1987. 669 p.

BRIDGEN, M. P. A review of plant embryo culture. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 11, p. 1243-1246, Nov. 1994.

CARIMI, F.; PASQUALE, F. de; PUGLIA, A. M. *In vitro* rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium* L. , and their detection based on RFLP analysis. **Plant Breeding**, Berlin, v. 117, n. 3, p. 261-266, July 1998.

CARVALHO, J. M. F. C.; JUNIOR, R. L. S. de; LOPES, K. P.; SANTOS, J. W. dos. **Otimização da metodologia da regeneração de embrião imaturo de algodão.** Campina Grande, 2003. 3 p. (Comunicado técnico)

CASTRO, A. H. F.; ALVARENGA, A. A. de; PAIVA, R.; GOMES, G. A. C. Propagação do murici (*Byrsonima verbascifolia*) por cultivo *in vitro* de

embriões. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2005.

CHAGAS, E. A. **Cultivo de embriões imaturos provenientes de hibridação controlada entre 'Pêra Rio' e 'Poncã'**. 2003. 66 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; PIO, L. A. S.; DUTRA, L. F.; CAZETTA, J. O. Cultivo de embriões imaturos de citros em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 29, n. 6, p. 1125-1131, nov./dez. 2005.

CHALUPA, V. Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp. ). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 5, p. 31-43.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; BRAGA, E. J. B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 275-277, jan./fev. 2004.

FERREIRA, A. T.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 21-24.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, M. G. R. das; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S. de; CARNEIRO, A. A. C.; FILHO, C. F. D. Indução de calos embriogênicos em explantes de cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 372-374, ago. 2004.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo-de-Valinhos' em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GARCÍA, J. L.; TRONCOSO, J.; SARMIENTO, R.; TRONCOSO, A. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic

embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 1, p. 95-100, Apr. 2002.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: part 1: the technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GERALD, L. T. S.; BRESSAN, E. A. de; JÚNIOR, J. P. Q. P.; ARAÚJO, D. R. F. de; MIRANDA, D.; FIOR, R. C.; SCHMIDT, V. A. Efeito da auxina na brotação e enraizamento de estacas de pinhão-manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Anais...** Varginha, 2006.

GÖSSLOVÁ, M.; SVOBODOVÁ, H.; LIPAVSKÁ, H.; ALBRECHTOVÁ, J.; VREUGDENHIL, D. Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, Oxford, v. 37, n. 1, p. 24-28, Jan./Feb. 2001.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, Dec. 2003.

HENAO, L. M. M. **Cultivo de tejidos vegetales**. Medellin: Universidad Nacional de Colômbia, 1991. 77 p.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPH/CBAB, 1998. v. 2, p. 371-393.

JANICK, J.; WHIPKEY, A. Somatic embryogenesis in *Theobroma grandiflorum*. **HortScience**, Alexandria, v. 23, n. 3, p. 807, June 1988.

JESUS, A. M. S.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, n. 288, p. 183-189, mar./abr. 2003.

KONONOWICZ, H.; KONONOWICZ, A. K.; JANICK, J. Asexual embryogenesis via *callus* of *Theobroma cacao* L. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 113, n. 4, p. 347-358, 1984.

LATADO, R. R.; VAZ, F. B. D.; NETO, A. T. Obtenção de plantas de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort) a partir

do cultivo de protoplastos de suspensão celular. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 421-428, abr./jun. 1999.

LEDO, A. S. da.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 601-603, dez. 2002.

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; LUMSDEN, P. J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, n. 2, p. 83-109, 1995.

LI, Z. J.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 293-299, Oct./Dec. 1998.

MALIRO, M. F. A.; KWAPATA, M. B. Apomitic embryo development and survival in *Uapaca kirkiana* under *in vitro* and *in vivo* seed germination. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 139-147, Feb. 2000.

MELLO, B. de. **Cultivo de embriões in vitro da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart) Becc.]**. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in vitro culture - A review. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 155-163, Nov. 1998.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; DUTRA, L. F. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. 2001. 79 p. (Especialização em Cultura de Tecidos Vegetais: tecnologia e aplicações) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Initiation and development of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. in vitro. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 98, n. 1, p. 1-14, 1980.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*), **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, mar./abr. 2006.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. 3. ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, ago. 2001.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLEČEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, Š. Acclimatization of icropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 42, n. 4, p. 481-497, 1999.

RAGHAVAN, V. **Experimental embryogenesis in vascular plants**. London: Academic, 1976.

RAGHAVAN, V.; TORREY, J. G. Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 50, n. 6, p. 540-551, June 1963.

RATREE, S. A preliminary study on physic nut (*Jatropha curcas* L. ) in Thailand. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Punjab, v. 7, n. 9, p. 1620-1623, 2004.

RIBEIRO, V. G.; SANÁBIO, D.; SOUZA, C. N. de; LOPES, P. S. N.; BOCARDO, M. R.; PASQUAL, M. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L. ) Raf. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 27-30, Jan. 2000.

RICCI, A. P.; FILHO, F. de. A. A. M.; MENDES, M. J.; PIEDADE, S. M. de. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, Jan./Mar. 2002.

ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos e aplicações. Cali: CIAT. 970 p, 1991.

RODRIGUES, M. M. de; MELO, M. D. das; ALOUFA, M. A. I. Propagação vegetativa *in vitro* e análise estrutural de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 171-173, jan. 2006.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Produção de oleaginosas para o biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-74, 2005.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da. E. . Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng. ) Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, set./out. 2004.

SPERA, M. R. N. **Propagação *in vitro* de *Jatropha podagrica* Hook.** 1995. 78 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

TILQUIN, J. P. Plant regeneration from stem callus of *Cassava*. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 57, n. 16, p. 1761-1763, Aug. 1979.

TORRES, A. C.; DUVAL, D. F.; RIBEIRO, D. G.; BARROS, A. F.; ARAGÃO, F. A. D. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 789-792, set. 2005.

TREMBLAY, L.; TREMBLAY, F. M. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill. ) B. S. P. ) and red spruce (*P. rubens* Sarg) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 27, n. 1, p. 95-103, Oct. 1991.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G. de; PIO, L. A. S. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus spp.* ) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 47-53, Jan./Mar. 2006.