



**MARTA SILVA DO NASCIMENTO**

**ORGANOGENESE A PARTIR DE SEGMENTOS  
COTILEDONARES E CALOGÊNESE DE  
ANTERAS DE PINHÃO-MANSO  
(*Jatropha curcas* L.)**

**LAVRAS-MG**

**2013**

**MARTA SILVA DO NASCIMENTO**

**ORGANOGENESE A PARTIR DE SEGMENTOS COTILEDONARES E  
CALOGÊNESE DE ANTERAS DE PINHÃO-MANSO  
(*Jatropha curcas* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Cultura de Tecido Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Manoel Teixeira Souza Junior

Coorientador

Dr. Bruno Galvêas Laviola

**LAVRAS - MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Nascimento, Marta Silva do.

Organogênese a partir de segmentos cotiledonares e calogênese de anteras de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) / Marta Silva do Nascimento. – Lavras : UFLA, 2013.

89 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Manoel Teixeira Souza Junior.

Bibliografia.

1. Cotilédones. 2. Micropropagação. 3. Enraizamento. 4. Cultura de tecidos. 5. Calos. 6. Propagação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

**MARTA SILVA DO NASCIMENTO**

**ORGANOGENESE A PARTIR DE SEGMENTOS COTILEDONARES E  
CALOGÊNESE DE ANTERAS DE PINHÃO-MANSO  
(*Jatropha curcas* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Cultura de Tecido Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de novembro de 2012.

Dr. Bruno Galvêas Laviola      Embrapa Agroenergia

Dr. Adilson Kobayashi      Embrapa Agroenergia

Dr. Guy de Capdeville      Embrapa Agroenergia

Dr. Manoel Teixeira Souza Junior  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2012**

Dedico esta dissertação aos meus pais, que sempre com muito amor ensinaram -  
me a lutar muito por tudo que sonhei e que muitas vezes deixaram de realizar os  
próprios sonhos em função dos meus...

“ Nada é fácil na vida, mas também nada é impossível para que não possamos  
realizar.”

Muito obrigada Marcelo e Heleusa !

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos;

À Embrapa Cenargen, onde foram desenvolvidas as atividades laboratoriais;

Ao prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Jr., pela orientação, confiança, pelo crescimento pessoal e profissional que proporcionou-me;

Ao pesquisador Dr. Bruno Galvêas Laviola, pela amizade, apoio e sugestões;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pelos conhecimentos transmitidos em suas aulas teóricas e práticas;

Aos meus amigos da Embrapa Agroenergia, em especial à Priscilla, Rolando, Marcelo, Luis Henrique (Gali), Luiz Fernando (Gringo), pelo apoio, convivência, ajuda, amizade, descontração, sorrisos;

Aos analistas André P. Leão e Bárbara Dias, pela ajuda, apoio técnico e amizade e a Julcéia pela ajuda;

Ao pesquisador Jonny Everson Scherwinski Pereira, pelo apoio, amizade, sugestões;

Ao analista André, pela ajuda, amizade e pelo apoio;

A todos os colegas e amigos da Embrapa Cenargen, em especial à Patrícia e Hugo, pela preciosa ajuda, força, apoio, amizade incondicional, por compartilhar conhecimentos,

À Marilda, Paulo César, Jannife, pela amizade, convivência, conselhos e apoio;

À Embrapa Cerrados, em especial ao Júlio, Laíse e a Jú, pela ajuda no campo e casa de vegetação;

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, em especial a minha querida amiga Luana Torres;

A todos meus amigos que mesmo distantes se fizeram presente e torceram por mim, em especial a Tatielle Custódio, Andréa Tomaz, Priscilla Abreu, Stefânia, Cleide, Erika, Luiz Rabelo;

A minha família que é o meu porto seguro;

As minhas amigas que tornaram-se minha família em Brasília; Tatiana Balson e Jamaira Lanna. Obrigada por me permitirem fazer parte da vida de você, pelo apoio, conselhos, diversão;

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

(Friedrich Nietzsche)



## RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a resposta organogênica a partir de segmentos cotiledonares e calogênese de anteras de cinco acessos de pinhão-manso. Foram utilizados os acessos (CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182, CNPAE-259) oriundos do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia. Os embriões zigóticos de cada acesso foram divididos em 2 grupos. No primeiro grupo, os embriões permaneceram inoculados durante 5 dias e no segundo grupo os embriões permaneceram por 10 dias para germinação. Utilizou-se o ½ Ms básicos. Na caracterização dos acessos, em média 98,48% dos embriões germinaram. Utilizando o meio básicos de MS, acrescidos de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de AIB para a indução, observou-se intensa calosidade nos explantes. Na fase de regeneração, os brotos foram submetidos ao meio de regeneração, composto por meio básico de MS, acrescidos de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Os explantes com 5 dias de idade do acesso CNPAE-107 apresentaram o maior número de brotos, entretanto, para o acesso CNPAE-182, o maior número de brotos foi com explante de 10 dias de idade. Na alongação, os brotos foram transferidos para o meio básico de MS, suplementado com 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Os explantes com 5 dias de idade dos acessos CNPAE-107 e CNPAE-167 tiveram em média a maior altura e não houve diferença significativa para explantes com 10 dias de idade. Testaram-se cinco concentrações de AIB (0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 mg.L<sup>-1</sup>) para o enraizamento. A melhor concentração foi de 0,6 mg.L<sup>-1</sup> AIB. Foi utilizado em todas as fases, meio básico de MS, acrescidos de 100 mg.L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 10 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, o pH foi ajustado para 5,8 e solidificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de Ágar. Para análise estatística, os dados foram submetidos ao teste de Scott- knott ao nível de 5% de significância utilizando o programa SISVAR. Para a organogênese, utilizando os acessos CNPAE-107 e CNPAE-167 são mais indicados explantes com 5 dias, e para o acesso CNPAE- 182 sugere explantes com 10 dias de idade. Recomenda-se 0,6 mg.L<sup>-1</sup> de AIB para o enraizamento de pinhão-manso. Para a calogênese em anteras, os resultados obtidos mostraram que o desenvolvimento dos micrósoros das anteras não foi sincrônico. O estágio de tétrade foi encontrado em botões florais entre 1,5 e 2,0 mm e as anteras entre 657 e 811 µM de comprimento. O acesso CNPAE-170 apresentou os melhores resultados para a indução de calos em desenvolvimento tipo 1. O Tratamento III composto por meio básico de Ms, acrescido com 10µm 2,4-D, 10 µm ANA e 50µm BAP, resultou no maior número de anteras sem indução de calos (tipo 0). Diante dos resultados de calogênese em anteras, verificou-se que novos testes deverão ser realizados a fim de otimizar o protocolo.

Palavras-chave: Cotilédones. Micropropagação. Enraizamento. Cultura de tecido. calos.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the organogenic response from cotyledon segments and callogenesis of anthers of five *J. curcas* L. accessions. Accessions CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182 and CNPAE-259, derived from the Embrapa Agroenergia's germplasm bank were used. The zygotic embryos of each accession were divided into two groups. In the first group, the embryos remained inoculated during 5 days and, in the second, the embryos remained inoculated for 10 days. In the characterization of the accessions, an average of 98.48% of the embryos germinated. Using the MS alkaline medium supplied with 1.5 mg.L<sup>-1</sup> of BAP and 0.05 mg.L<sup>-1</sup> of IBA for induction, we observed intense callosity in the explants. In the regeneration phase, the sprouts were submitted to the regeneration medium, comprised of the MS alkaline medium supplied with 1.5 mg.L<sup>-1</sup> of BAP, 0.05 mg.L<sup>-1</sup> of IBA and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>. The explants with 5 days of age of accession CNPAE-107 presented the largest number of sprouts, however, for accession CNPAE-182 the largest number of sprouts, with explants of 10 days of age. In the elongation, the sprouts were transferred to the MS alkaline medium supplied with 0.3 mg.L<sup>-1</sup> of BAP. They the explants with five days of age of accessions CNPAE-107 and CNPAE-167 presented a higher height average, and there was no significant difference for the 10 day explants. Five IBA concentrations were tested (0.3, 0.6, 1.2, 2.4 and 4.8 mg.L<sup>-1</sup>) for rooting. The best concentration was of 0.6 mg.L<sup>-1</sup> of IBA. The MS alkaline medium supplied with 100 mg.L<sup>-1</sup> of myo-inositol, 10 mg.L<sup>-1</sup> of thiamine and 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose was used in all phases. The pH was adjusted to 5.8 and the medium was solidified with agar. For the statistical analyses, the data were submitted to the Scott-Knott test at the level of 5% of significance using the SISVAR program. For the organogenesis, when using accessions CNPAE-107 and CNPAE-167, the use of explants with 5 days of age is indicated, while when using accession CNPAE-182, we suggest the use of explants with 10 days of age. The IBA concentration of 0.6 mg.L<sup>-1</sup> is recommended for *J. curcas* L. rooting. For anther callogenesis, the obtained results showed that the development of anther microspores was not synchronic. A tetrad stage was found when the length of the floral buds were between 1.5 and 2.0 mm and the anthers between 657 and 811 µm. Accession CNPAE-170 presented the best results for the induction type 1 calli. Treatment III comprised of the MS alkaline medium supplied with 10 µm 2,4-D, 10 µm NAA and 50 µm BAP resulted in a larger number of anthers without calli induction (type 0). With these anther callogenesis results, it was verified that new tests must be performed in order to optimize the protocol.

Key-words: Cotyledons. Micro propagation. Rooting. Tissueculture. Callies.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 Sementes, embriões zigótico, plântulas germinadas em diferentes idades e segmentos cotiledonares de pinhão-manso.....41
- Figura 2 Calos induzidos em segmentos cotiledonares, brotos regenerados provenientes de calos oriundos de segmentos cotiledonares e plantas enraizadas .....53
- Figura 3 Plantas regeneradas e enraizadas a partir da organogênese de segmentos cotiledonares de pinhão-manso. ....55

### CAPÍTULO 3

- Figura 1 Tipos de calos obtidos após o cultivo mínimo de 60 dias em meio de indução.....74
- Figura 2 Inflorescência do Banco de germoplasma de pinhão-manso- Embrapa Cerrados, 2012.....77
- Figura 3 Imagens de flores de pinhão-manso em diferentes etapas de desenvolvimento obtidas a partir de microscopia óptica.....79

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Caracterização dos cinco acessos utilizados como fonte de explante para a organogênese .....	42
Tabela 2	Número de brotos regenerados a partir de segmentos cotiledonares com 5 e com 10 dias de idade e a altura média (cm) de brotos regenerados .....	47
Tabela 3	Número de brotos formados após a fase de regeneração <i>in vitro</i> e altura de brotos regenerados após a fase de alongação.....	48
Tabela 4	Influência de diferentes concentrações de AIB para os cinco acessos na formação de raízes após 30 dias de cultivo no meio de enraizamento.....	50
Tabela 5	Teste de eficiência de cinco concentrações de AIB nos cinco acessos para a formação de raízes após 30 dias de cultivo para os cinco acessos utilizados.....	51
Tabela 6	Influência das idades dos explantes dos cinco acessos inoculados na concentração de 0,6 mg.L <sup>-1</sup> de AIB .....	52

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Porcentagem de anteras de pinhão manso em estágio de tétrades analisadas em botões florais com comprimentos entre 1,5 a 2,0 mm e com anteras de aproximadamente com 800 µm. ....	80
Tabela 2	Números de calos produzidos em resposta ao tratamento (acessos) com o tipo de calos originados.....	81

Tabela 3	Comparação de cinco acessos ( CNPAE 107, CNPAE 167, CNPAE 170, CNPAE 182 E CNPAE 258) de pinhão-manso para o número de calos originados para cada tipo .....	81
Tabela 4	Análise de variância entre os números de tipos de calos produzidos em resposta as tratamentos testados ( concentrações de fitorreguladores).....	83
Tabela 5	Comparação entre as médias do número de tipos de calos obtidos em resposta aos tratamentos testados (concentrações de fitorreguladores) .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>cm</b>	centrímetros
<b>μM</b>	micromolar
<b>2,4-D</b>	ácido diclorofenoxiacético
<b>AIA</b>	ácido indolacético
<b>AIB</b>	ácido indolbutírico
<b>ANA</b>	ácido naftalenoacético
<b>Atm</b>	atmosfera
<b>BAP</b>	6-benzilaminopurina
<b>Cin</b>	cinetina
<b>C.V.</b>	coeficiente de variação
<b>DIC</b>	delineamento inteiramente casualizado
<b>GA<sub>3</sub></b>	ácido giberélico
<b>Kg</b>	quilogramas
<b>há</b>	hectare
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>l</b>	litro
<b>mg</b>	miligramas
<b>m</b>	metros
<b>mm</b>	milímetros
<b>mL</b>	mililitro
<b>MS</b>	Murashige & Skoog
<b>N<sub>6</sub></b>	Meio proposto por Chih-Ching (1962)
<b>NaOH</b>	hidróxido de sódio
<b>PNPB</b>	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
<b>RNA<sub>r</sub></b>	RNA ribossômico
<b>RNA<sub>t</sub></b>	RNA transportador
<b>TDZ</b>	tidiazuron

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C- graus Celsius

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Biocombustível.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Histórico e classificação botânica do pinhão-manso.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Métodos de Propagação.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4</b>	<b>Cultura de Tecidos Vegetais.....</b>	<b>21</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Organogênese <i>in vitro</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Cultura de Anteras.....</b>	<b>24</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>
	<b>CAPITULO 2 Organogênese <i>in vitro</i> a partir de segmento cotiledonar de pinhão-manso.....</b>	<b>34</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>Germinação <i>in vitro</i> e caracterização do material vegetal.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>Organogênese a partir de segmentos cotiledonares com diferentes idades.....</b>	<b>43</b>
<b>2.3</b>	<b>Enraizamento de brotos regenerados.....</b>	<b>44</b>
<b>2.4</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Germinação <i>in vitro</i> e Caracterização do material utilizado para a organogênese.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Organogênese a partir de segmentos cotiledonares com diferentes idades.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3</b>	<b>Enraizamento dos brotos regenerados.....</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>
	<b>CAPITULO 3 Calogênese <i>in vitro</i> em anteras de pinhão-manso....</b>	<b>60</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
<b>2.1</b>	<b>Cultivo <i>in vitro</i> de anteras.....</b>	<b>67</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Material Biológico.....</b>	<b>68</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo.....</b>	<b>68</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Meio de cultura para indução de Calos.....</b>	<b>69</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Condições básicas de elaboração e manutenção do experimento....</b>	<b>70</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>70</b>
<b>2.2</b>	<b>Cultivo <i>in vitro</i> de anteras de pinhão-manso do acesso 170.....</b>	<b>71</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Material Biológico.....</b>	<b>72</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo.....</b>	<b>72</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Desinfestação do material vegetal.....</b>	<b>73</b>



2.2.4	Meio de cultura para indução de calos.....	73
2.2.5	Análise estatística.....	75
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	76
3.1	Associação entre o comprimento do botão floral e da antera e o estágio de desenvolvimento do micrósporo.....	76
3.2	Indução de calos em anteras .....	80
3.3	Indução de calos em anteras do acesso CNPAE-170 .....	82
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	84
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85
	<b>CAPÍTULO 4</b> Considerações Gerais.....	88

## **CAPÍTULO 1 Introdução Geral**

### **1 INTRODUÇÃO**

#### **1.1 Biocombustível**

A maior parte da energia consumida no mundo provém do petróleo, do carvão mineral e do gás natural. Essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento em um futuro próximo. Assim, a busca por fontes alternativas de energia, em especial as renováveis, é crescente no mundo. Nesse contexto, a demanda mundial por biocombustíveis tem se expandido de forma muito rápida nos últimos anos e deverá acelerar-se ainda mais, principalmente nos países que são grandes consumidores de combustíveis (DURÃES; LAVIOLA; ALVES, 2011).

O Brasil é um país com grande potencial para a produção de biocombustíveis visando atender tanto o mercado nacional quanto o internacional. O país possui localização privilegiada na região tropical com alta incidência de energia solar, umidade e, além disso, conta com grandes reservas de terras, o que possibilita planejar o uso agrícola em bases sustentáveis, sem comprometer os grandes biomas terrestres e as atuais áreas ocupadas com culturas alimentícias. Atualmente, existem no Brasil cerca de 90 milhões de hectares de terras disponíveis para expansão agrícola, sem considerar outros 210 milhões de hectares, ocupado com pastagens com algum grau de degradação, que pela aplicação de tecnologia, podem ser recuperadas e usadas na produção de alimentos e biocombustíveis. Além disso, existem no país mais de 200 espécies que produzem óleo em frutos e sementes, com diferentes potencialidades e adaptação natural às condições edafoclimáticas, que podem ser

usadas para produção de biocombustíveis ou outros produtos de maior valor agregado (LAVIOLA; ALVES, 2011).

Desde a implantação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), em 2005, a soja se consolidou como a principal fonte de matéria-prima, com participação em cerca de 80% do óleo usado para produção de biodiesel. Isto se deve, principalmente, por ser na atualidade a única oleaginosa com escala de produção suficiente para atender as demandas do PNPB. Porém, a soja é uma oleaginosa de baixa densidade energética, com produtividade de 500 kg/ha de óleo, sendo importante a busca por fontes alternativas com maior adensamento energético e adaptações regionais. Neste sentido, o pinhão-manso junto com espécies de palmeiras nativas se destaca como opção de matéria-prima para produção de biodiesel (LAVIOLA; ALVES, 2011).

## 1.2 Histórico e classificação botânica do pinhão-manso

Historicamente, o óleo de pinhão-manso foi utilizado para produção de sabão caseiro, iluminação em lamparinas e candeeiros e na iluminação pública de cidades, por ser um óleo que queima sem fazer fumaça e sem emitir cheiro (SATURNINO et al., 2005). Atualmente, as plantas de pinhão-manso vêm sendo plantadas visando o controle de erosão, a recuperação de áreas degradadas, na contenção de encostas e de dunas, e ao longo de canais, rodovias, ferrovias e também como cerca viva em divisas internas ou nos limites de propriedades rurais.

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie perene, diplóide ( $2n = 22$  cromossomos), monóica e pertencente à família Euphorbiaceae a mesma da mamona (*Ricinus* sp.), da mandioca (*Manihot* sp.) e da seringueira (*Hevea* spp.). É um arbusto que pode atingir mais de 8m de altura, desenvolve-se

espontaneamente em diversas regiões do Brasil e do mundo. A origem é bastante controversa, uma vez que o pinhão-manso pode ser encontrado em maiores proporções nas zonas tropicais (HELLER, 1996; PEIXOTO, 1973), especialmente em países da América do Sul, América Central, África e Ásia. No entanto, há fortes evidências de que esta espécie originou-se na América Tropical.

É uma planta caducifólia, cujo ciclo fenológico apresenta fases bem definidas ao longo do ano, incluindo uma fase de crescimento vegetativo e desenvolvimento reprodutivo e outra de repouso. Para a produção de óleo, a fase fenológica mais importante é o florescimento (OLIVEIRA; CARVALHO; DAVIDE, 2005), pois há uma grande correlação entre a produção e o crescimento vegetativo, revelada pelo número total de flores produzidas (HELLER, 1996). O número de flores femininas e sua fertilização determinam o número de frutos e de sementes que eventualmente serão desenvolvidos.

Relatos afirmam que ao ser plantado no princípio da estação chuvosa, o pinhão-manso pode iniciar uma pequena produção de frutos já no primeiro ano de cultivo, embora, o seu clímax produtivo ocorra a partir do 4º ou 5º ano, com capacidade produtiva potencial por mais de 20 anos (DIAS et al., 2007).

O pinhão-manso apresenta potencial de rendimento de grãos superior às oleaginosas tradicionais, cerca de 1200 kg/ha de óleo, bem como, as características físico-químicas do óleo são muito favoráveis para a produção de biocombustível. Esta oleaginosa também possui outras características interessantes ao programa de biodiesel, tais como: espécie perene, dispensando a renovação anual de plantio; cultura não alimentar, sem concorrência direta com a agricultura de alimentos; os espaçamentos adotados permitem o cultivo intercalado com culturas anuais (feijão-caupi, milho, arroz de sequeiro), culturas perenes (açai, pupunha) e espécies florestais, intercalando na fase inicial de estabelecimento, permitindo a produção de biocombustíveis e alimentos em uma

mesma área; opção potencialmente interessante para agricultura familiar; possibilidade de diversificação das atividades agrícolas tradicionais em algumas regiões, sendo mais uma alternativa de renda; cultura pouco mecanizável e altamente dependente de mão-de-obra, gerando emprego no campo (LAVIOLA et al., 2011).

Apesar das potencialidades do cultivo do pinhão-mansão, a espécie está atualmente em processo de domesticação e existem diversos desafios de pesquisa e desenvolvimento a serem superados (DURÃES; LAVIOLA; ALVES, 2011). Dentre os desafios atuais, encontram-se a seleção de materiais genéticos uniformes com alta produtividade de sementes e óleo, bem como, o método de propagação destes materiais (ROCHA et al., 2012).

### **1.3 Métodos de Propagação**

Em pinhão-mansão, os principais métodos de propagação são: via sementes (reprodução sexuada) e multiplicação por estacas (reprodução assexuada ou vegetativa). Em ambos os casos, a seleção das matrizes devem ser rigorosas, escolhendo-se as melhores plantas. De modo geral, as plantas oriundas de sementes são mais resistentes e de maior longevidade. Apresenta melhor formação do sistema radicular, conseqüentemente as plantas são mais tolerantes ao déficit hídrico e absorvem melhor os nutrientes disponíveis no solo (PAULINO et al., 2011). Entretanto, as mudas produzidas neste sistema de propagação apresentam crescimento desuniforme, além de impossibilitar a fixação de acessos selecionados.

Na propagação vegetativa, os métodos mais utilizados são por estacas lenhosas e miniestaquia (estacas herbáceas) (DIAS et al., 2007). Em ambos os métodos, alguns autores observaram problemas no enraizamento, gerando plantas de sistema radicular com menor ramificação, ocasionando a exploração

apenas das camadas superficiais do solo (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973; SATURNINO et al., 2005). Tais problemas de sistema radicular geram plantas com pouco vigor, susceptíveis ao déficit hídrico e com tendências a problemas de sustentação, que levam ao tombamento em idades avançadas. Portanto, para propagar o pinhão-manso por estaquia em escala comercial, deve-se solucionar o problema do enraizamento (SATURNINO et al., 2005).

Diante disso, técnicas biotecnológicas incluindo a cultura de tecidos, podem ser consideradas como estratégia para contornar os problemas relacionados à propagação assexuada convencional.

#### **1.4 Cultura de Tecidos Vegetais**

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas, nas quais os explantes (células, tecidos ou órgãos) são isolados e cultivados em condições assépticas, sobre um meio nutritivo artificial e em ambiente com luminosidade e temperatura controlada (SOUZA et al., 2006). O principal fundamento da cultura de tecidos é a totipotencialidade da célula, segundo o qual, qualquer célula no organismo vegetal contém toda informação genética necessária à regeneração completa da planta (PASQUAL, 2000).

As principais técnicas da cultura de tecidos vegetais são constituídas da propagação clonal de mudas em larga escala (micropropagação), regeneração de plantas livres de vírus e patógenos (limpeza clonal), conservação de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), produção de haploides e duplo- haploides e produção de plantas geneticamente modificadas (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998). Desta forma, a cultura de tecidos vegetais é uma importante ferramenta biotecnológica na genética, no melhoramento de plantas e também em inúmeras áreas da agricultura (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 1997).

As plantas podem regenerar-se via embriogênese somática ou organogênese. A embriogênese somática é definida como o processo pelo qual, células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando uma estrutura bipolar chamada embrião somático, que ao final do processo de diferenciação dará origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Esta técnica contribui para estudos fisiológicos, genéticos e bioquímicos que norteiam o desenvolvimento embrionário, além de ser um método apropriado quando se deseja manter a estabilidade genética (FERNANDES et al., 2008).

#### **1.4.1 Organogênese *in vitro***

A organogênese *in vitro* é uma técnica que pode ser definida como um processo na qual as células e/ou tecidos vegetais são induzidos a sofrerem mudanças de desdiferenciação ou rediferenciação, que levam a produção de primórdios vegetativos, cujo sistema vascular está frequentemente conectado ao tecido de origem. Quando a organogênese ocorre a partir de tecidos do explante inicial ou de pequenas proliferações do mesmo, sem a formação de calos, denomina-se organogênese direta. A via indireta é caracterizada quando a organogênese ocorre a partir de calos isolados do explante inicial (STIRMART, 1986). Essa técnica pode ser uma alternativa eficaz para a propagação de acessos selecionados.

O sucesso da organogênese depende de diversos fatores envolvidos diretamente ou indiretamente, como exemplo, tipo de explante utilizado, concentrações e/ou combinações dos fitorreguladores (auxinas e citocininas), associados com a competência do tecido em resposta a essas mudanças hormonais, as condições ambientais de cultivo e a fatores genéticos. A variação da resposta genotípica é o principal fator para o insucesso da organogênese, pois

essas variações nas respostas são evidentes em experimentos em espécies não domesticadas, como o pinhão-manso. Portanto, o desenvolvimento de protocolos eficientes para a regeneração *in vitro* do pinhão-manso, será um método poderoso para superar o problema da obtenção de plantas regeneradas.

Há vários relatos sobre a regeneração *in vitro* de diversas espécies de *Jatropha* (DEORE; JOHNSON, 2008; KALIMUTHU et al., 2007; KHURANA-KAUL; KACHHWAHA; KOTHARI, 2010; LI et al., 2008; VARSHNEY; JOHNSON, 2010), mas as informações são incipientes. Estudos feitos por Rajore e Batra (2005), Sujatha, Makkar e Becker (2005) e Sujatha e Mukta (1996), não foram promissores, devido à baixa taxa de multiplicação de *Jatropha curcas* L. Entretanto, a regeneração de *Jatropha podagrica* (SPERA et al., 1997) e *Jatropha integerrima* (SUJATHA; DHINGRA, 1993; SUJATHA; PRABAKARAN, 2003) atingiram os melhores resultados. Li et al. (2008) obtiveram sucesso na regeneração de plantas da espécie *Jatropha curcas* L., entretanto o protocolo proposto foi utilizado para transformação via *Agrobacterium*. A reprodutibilidade desse método, bem como a abordagem transgênica, pode ser estendida a outras procedências da cultura após a sua validação.

Apesar dos estudos demonstrarem a viabilidade e relativa facilidade da multiplicação *in vitro* do pinhão-manso via organogênese, é preciso levar em consideração o efeito genotípico. Alguns estudos demonstraram que diferentes acessos de pinhão-manso submetidos às mesmas condições de cultivo, resultaram com desempenho produtivo divergente (SUNIL et al., 2012). O efeito genotípico é um dos fatores que mais influencia o desenvolvimento *in vitro* de plantas de pinhão-manso e que, estas diferenças são mais acentuadas entre os acessos tóxicos e atóxicos (ausência de ésteres de forbol) (SHARMA; KUMAR; REDDY, 2011). Portanto, estudos utilizando acessos tóxicos e não



tóxicos deverão ser realizados, a fim de desenvolver protocolos eficientes de clonagens *in vitro* do pinhão-mansão.

#### **1.4.2 Cultura de Anteras**

A cultura de anteras é uma técnica de cultura de tecidos vegetais que pode contribuir para o melhoramento do pinhão-mansão. A obtenção de plantas pode ocorrer por embriogênese ou organogênese, passando antes pela formação de calos nas anteras. Em 1992, foi desenvolvida pela Embrapa a cultivar BRS-43 de trigo por meio do método de cultura de anteras. Atualmente, esta é a técnica mais empregada para a obtenção de linhagens homozigotas, sendo a base de programas de melhoramento de culturas com grande importância econômica no cenário nacional, como o trigo (BIUDES et al., 2009), café (SIQUEIRA-SILVA et al., 2009) e milho (SILVA et al., 2009).

Para os programas de melhoramento, a cultura de anteras representa uma economia no tempo e nos custos de produção para novas linhagens (MILLANI; CARVALHO, 2005; MORAES-FERNANDES et al., 1990; SANTOS; ZANETTINI, 2002). Por meio do método de melhoramento convencional em plantas perenes, como exemplo o pinhão-mansão, são necessários vários ciclos de recombinação e seleção para a fixação e estabilidade dos acessos elites, uma vez que esta é uma espécie de reprodução mista com predisposição a alogamia. Assim, o emprego de técnicas convencionais de melhoramento é um processo demorado e trabalhoso, visto que a eficiência da seleção nas primeiras gerações de autofecundação é muito baixa, devida principalmente à ocorrência de alelos dominantes em heterozigose. Além dos despendidos anos na etapa de recombinação e seleção de materiais superiores, são necessários outros tantos anos na multiplicação desses materiais para fins comerciais. Desta forma, a produção de plantas haplóides ou duplo por meio da cultura de anteras reduz o

tempo no processo de desenvolvimento de linhagens homozigotas, e pode facilitar a obtenção de linhagens superiores.

A cultura de anteras é uma técnica que estimula, por meio da cultura *in vitro*, em meio de cultivo com composições químicas especiais (sais minerais, vitaminas, fitorreguladores adequados), o micrósporo ou grãos de pólen jovem a dividir-se continuamente, formando calos embriogênicos. Desta forma, a cultura de anteras apresenta-se como uma ferramenta em relação ao melhoramento genético convencional, pois permite o desvio da rota gametofítica, que é a formação do grão de pólen, para a rota esporofítica, no qual o pólen jovem retoma as divisões mitóticas podendo formar um embrião.

No entanto, existem determinantes críticos que influenciam o processo de androgênese *in vitro* e a sua eficiência, tais como a fisiologia da planta doadora das anteras (OUYANG et al., 1987; WANG; CHEN, 1980), o estágio de desenvolvimento do micrósporo (HE; OUYANG, 1984; OUYANG; ZHOU; JIA, 1983), as condições de cultura *in vitro* e o acessos da planta doadora (BULLOCK et al., 1982).

Fatores ambientais como fotoperíodo, intensidade luminosa, nutrição e temperatura interagem entre si, influenciando o estado endógeno da planta doadora e o potencial esporofítico dos grãos de pólen (WENZEL; FOROUGHI-WHER, 1984). Em *Brassica campestris*, com o aumento da intensidade luminosa, melhora a resposta androgenética, e, em *Nicotiana tabacum* L., há um desenvolvimento da embriogênese dos micrósporos quando as plantas doadoras crescem em dias curtos (HEBERLE-BORS, 1982; KELLER; ARMSTRONG; ROCHR, 1982). Para *Brassica napus* e *Nicotiana* (RASHID; REINERT, 1983) a temperatura baixa, em média 10°C, teve efeito benéfico para o desenvolvimento embriogênico dos micrósporos.

Para a maioria das culturas estudadas, tais com fumo, trigo, café, milho e arroz, a utilização das primeiras flores, espigas e panículas resultam maior

produção de calos quando comparadas com aquelas produzidas tardiamente, na estação de crescimento. Estudos com arroz relataram que as anteras coletadas nas primeiras inflorescências e entre 8 e 10 horas da manhã em dias de sol, obtiveram maior capacidade de resposta *in vitro*, quando comparadas com aquelas inflorescência coletadas no final da floração, em dias chuvosos e após às 10 horas da manhã (LENTINI et al., 1994). A viabilidade dos micrósporos pode estar associada com essas diferenças, citadas acima, no momento da colheita do botão floral (CHEN; TSAY; HUANG, 1991).

Outro fator importante para o sucesso na obtenção de plantas haploides é o estágio de desenvolvimento dos micrósporos. Há evidências de que o período crítico na indução do desenvolvimento androgenético é aquele imediatamente anterior à mitose do micrósporo, logo após a fase de tétrade (SANTOS; ZANETTINI, 2002). Nessa fase é sintetizada a maior parte do RNAr e RNAt sendo que, logo após esse período, os genes responsáveis pela síntese destes ácidos nucleicos são desligados. Por isso, é essencial que as anteras sejam excisadas, durante, ou em período imediatamente anterior à mitose, para que os grãos de pólen sigam a rota androgenética (VASIL; NITCH, 1975).

Existem evidências de que não há uniformidade entre anteras de um botão floral ou entre micrósporos de uma mesma antera. Muitos autores, na tentativa de monitorar o processo de divisão meiótica, associaram o tamanho do botão floral com os diferentes estádios de desenvolvimento do grão de pólen (LUZ et al., 1995). Geralmente 0,5 a 5% sofrem desenvolvimento androgenético (VASIL; NITSCH, 1975). Esse tipo de informação é importante para o sucesso de pesquisas que envolvem a cultura de anteras, porque o ponto de entrave é o estágio da microgametogênese, uma vez que para a maioria das espécies é necessário á manipulação da célula gamética uninucleada (ZHANG; LESPINASSE, 1992).

Deve-se fazer uma prévia seleção do tamanho dos botões florais e das anteras para obter o grão de pólen no melhor estágio para ser utilizado. Estudos realizados relatam que em aspargos, os micrósporos no estágio uninucleado são encontrados em anteras de botões florais medindo 1,6 a 2,0mm (BOBROWSSKI et al., 1995), em batata, os grãos de pólen uninucleados são encontrados em botões florais com 4 a 7mm (SOPORY; JACOBSEN; WENZEL, 1978). Feng e Woly (1991) concluíram que as anteras de aspargos contendo micrósporos no estágio uninucleado produziram 3 vezes mais embriões que aquelas que continham micrósporos em outros estádios de desenvolvimento.

Apesar de todos os esforços para a produção de plantas haplóides, até o momento não existem estudos com a cultura de pinhão-manso. Diante dos relatos expostos, é clara a evidência que existem muitos desafios a fim de obter a viabilidade do pinhão-manso para a produção em larga escala. Portanto, para encurtar o tempo no lançamento de materiais comerciais com maior uniformidade, é essencial que haja protocolos eficientes estabelecidos tanto para organogênese in vitro, quanto para cultura de anteras. Com isso, objetivo com este trabalho foi avaliar a resposta organogênica a partir de segmento cotiledonar e a calogênese de anteras de cinco acessos de pinhão-manso.

## REFERÊNCIAS

- BIUDES, G. B. et al. Adaptabilidade e estabilidade de linhagens diaplóides de trigo. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 63-74, 2009.
- BOBROWSSKI, V. L. et al. Efeitos de meios de cultura na formação de calos a partir de anteras de aspargos (*Asparagus officinalis* L.). **Acta Botanica Brasílica**, Porto Alegre, v. 9, n. 1, p. 17-23, jul. 1995.
- BULLOCK, W. D. et al. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F1's and their reciprocal crosses. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 62, p. 155-159, 1982.
- CHEN, C. C.; TSAY, H. S.; HUANG, C. R. Factores affecting androgenesis in Rice (*Oryza sativa* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p. 193-215.
- CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas**. Lisboa: Clássica, 1956. 231 p.
- DEORE, A. C.; JOHNSON, T. S. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. **Plant Biotechnology**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 7-11, 2008.
- DIAS, L. A. S. et al. **Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. Viçosa, MG: UFV, 2007. v. 1, 40 p.
- DURÃES, F. O. M.; LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Potential and challenges in making physic nut (*Jatropha curcas* L.) a viable biofuel crop: the Brazilian perspective. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, London, v. 6, n. 43, p. 1-8, 2011.
- FENG, X. R.; WORLY, D. J. High frequency of haploid embryos in asparagus anther culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, n. 11, p. 281-285, Nov. 1991.

FERNANDES, E. H. et al. Embriogênese somática a partir de embriões imaturos em acessos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2604-2607, ago. 2008.

HE, D. G.; OUYANG, J. W. Calli and planted formation from cultured wheat anthers at different development stages. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 33, p. 71-79, 1984.

HEBERLE-BORS, E. On the time of embryogenic pollen grain induction during sexual development of *Nicotiana tabacum* L. plants. **Planta**, Berlin, v. 156, p. 402-406, 1982.

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

KALIMUTHU, K. et al. *In vitro* propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 17, n. 2, p. 137-147, Dec. 2007.

KELLER, W. A.; ARMSTRONG, K. C.; ROCHR, A. I. de la. The production and utilization of microspore-derived haploids in Brassica crops. In: GIES, K. B.; SEM, S. K. (Ed.). **Plant cell culture in crop improvement**. New York: Plenum, 1982. p. 169-183.

KHURANA-KAUL, V.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S. L. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54, n. 2, p. 369-372, 2010.

LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Matérias-primas oleaginosas para biorrefinarias. In: VAZ, J. S. (Ed.). **Biorrefinarias**: cenários e perspectivas. Brasília: EMBRAPA Agroenergia, 2011. p. 29-43.

LAVIOLA, B. G. et al. Características morfo-agronômicas do banco de germoplasma de pinhão-manso na fase jovem. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 371-379, 2011.

LENTINI, Z. et al. **Mejoramiento del arroz con cultivo de anteras:** aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecosistemas Latinoamericanos y el Caribe. Cali: CIAT, 1994. 79 p.

LI, M. et al. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 173-181, Jan. 2008.

LUZ, J. M. Q. et al. Relação entre microsporogênese e tamanho do botão floral em pimentão (*Capsicum annum* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 385-388, maio/jun. 1995.

MILANI, M.; CARVALHO, J. M. F. C. **Utilização de cultura de anteras no melhoramento de planta.** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2005. 26 p. (Documentos, 145).

MORAES-FERNANDES, M. I. B. et al. Haploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA, 1990. p. 613-650.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; DAVIDE, A. C. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert *Leguminosae Caesalpinioideae*. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 159-166, 2005.

OUYANG, Y. W. et al. The response of anther culture to culture temperature varies with growth conditions of anther donor plants. **Plant Science**, Shannon, v. 49, p. 145-148, 1987.

OUYANG, J. W.; ZHOU, S. M.; JIA, S. E. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 66, p. 101-109, 1983.

PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 80 p.

PAULINO, J. et al. Crescimento e qualidade de mudas de pinhão-manso produzidas em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 1, p. 37-46, 2011.

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

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 4. ed. São Paulo: Globo, 1997. 359 p.

RASHID, C.; REINERT, J. Factors affecting high-frequency embryo formation in ab initio pollen cultures of *Nicotiana*. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 116, p. 155-160, 1983.

ROCHA, R. B. et al. Selection efficiency for increasing physic nut oil content. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 1, p. 44-50, jan. 2012.

RAJORE, S.; BATRA, A. Efficient plant regeneration via shoot tip explants in *J. curcas* L. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 14, n. 1, p. 73-75, 2005.

SANTOS, E. K.; ZANETTINI, M. H. B. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 163-175, jan./fev. 2002.

SATURNINO, H. M. et al. Produção de oleaginosas para o biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-74, 2005.

SHARMA, S.; KUMAR, N.; REDDY, M. P. Regeneration in *Jatropha curcas*: factors affecting the efficiency of in vitro regeneration. **Industrial Crops and Products**, London, v. 34, n. 1, p. 943-951, July 2011.

SILVA, G. J. et al. **Produção de haloploides androgenéticos em milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2009. 17 p. (Documentos, 81).

SIQUEIRA-SILVA, A. S. et al. BAP, 2,4-D and acetyl-salicylic acid on the calli induction and differentiation in *Coffea arabica* L. anthers. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 5, p. 1205-1212, set./out. 2009.



SOPORY, S. K.; JACOBSEN, E.; WENZEL, G. Production of monohaploid embryoids and plantlets in culture anthers of *Solanum tuberosum*. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 12, p. 47-54, 1978.

SOUZA, F. V. D. et al. Micropropagação. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução a micropropagação de plantas**. Salvador: EMBRAPA, 2006. p. 38-52.

SPERA, M. R. N. et al. Effect of different concentration of Knetin and 2-4D on the *in vitro* cultivation of *Jatropha podagrica* Hook' roots. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 21, n. 2, p. 386-389, mar./abr. 1997.

STIRMART, D. P. Commercial micropropagation of florist flower crops. In: ZIMMERMAN, R. H. et al. (Ed.). **Tissue culture as plant production systems for horticultural crops**. Dordrecht: M. Nijhoff, 1986. p. 301-315.

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

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

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

SUJATHA, M.; PRABAKARAN, A. J. New ornamental *Jatropha* through interspecific hybridization. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, n. 1, p. 75-82, Feb. 2003.

SUNIL, N. et al. Intra-specific variation in response of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) to elevated CO<sub>2</sub> conditions. **Physiology Molecular Biology of Plants**, New York, v. 18, n. 2, p. 105-111, Feb. 2012.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1998. v. 1, p. 11-19.

VARSHNEY, A.; JOHNSON, T. S. Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. **Plant Biotechnology Reports**, London, v. 4, n. 2, p. 139-148, 2010.

VASIL, I. K.; NITSCH, C. Experimental production of pollen haploids and their uses. **Zeitschrift für Pflanzenzüchtung**, Hamburg, v. 76, p. 191-212, 1975.

WANG, P.; CHEN, Y. R. Effects of growth conditions of anther-donor plants on the production of pollen plants in wheat anther culture. **Acta Genetica Sinica**, Beijing, v. 7, p. 64-71, 1980.

WEZEL, G.; FOROUGHI-WEHR, B. Anther culture of cereal and grasses. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic, 1984. p. 311-327.

ZHANG, Y. X.; LESPINASSE, Y. Haploids. In: HAMMERCHLANG, F. A.; LITZ, R. E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: Cambridge University, 1992. p. 57-76.

## **CAPITULO 2 Organogênese *in vitro* a partir de segmento cotiledonar de pinhão-manso**

### **RESUMO**

O objetivo do trabalho foi avaliar a resposta organogênica a partir de segmentos cotiledonares de cinco acessos (CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182, CNPAE-259) de pinhão-manso oriundos do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia. Os embriões zigóticos de cada acesso foram divididos em dois grupos. No primeiro grupo, os embriões permaneceram inoculados durante 5 dias e no segundo grupo, os embriões permaneceram por 10 dias para germinação. Na caracterização dos acessos, em média 98,48% dos embriões germinaram e a altura foi em média 4,40 cm para 5 dias e 7,32 cm para 10 dias de germinação. Foi utilizado o ½ MS básicos. Na indução, observou-se intensa calosidade nos explantes, utilizando o meio básicos de MS, acrescidos de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Na fase de regeneração o acesso CNPAE-107, com explantes de 5 dias de idade apresentaram o maior número de brotos, em contrapartida, o acesso CNPAE-182, apresentou o maior número de brotos com explantes de 10 dias de idades. Foram submetidos ao meio de regeneração, composto por meio básico de MS, acrescidos de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Na elongação, os explantes com 5 dias de idade dos acessos CNPAE-107 e CNPAE-167 tiveram em média a maior altura e não houve diferença significativa para explantes com 10 dias de idade. Os brotos foram tranferidos para o meio básico de MS, suplementado com 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Testaram-se cinco concentrações de AIB (0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 mg.L<sup>-1</sup>) para o enraizamento. A melhor concentração foi de 0,6 mg.L<sup>-1</sup> AIB e não houve diferença significativa entre os acessos e a idade dos explantes. Foi utilizado em todas as fases, meio básico de MS, acrescidos de 100 mg.L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 10 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, o pH foi ajustado para 5,8 e solidificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de Ágar. Para análise estatística, os dados foram submetidos ao teste de Scott- knott ao nível de 5% de significância utilizando o programa SISVAR. Para a organogênese, utilizando os acessos CNPAE-107 e CNPAE-167 são mais indicados explantes com 5 dias de idade, e para o acesso CNPAE- 182 sugere-se explantes com 10 dias de idade. Recomenda-se 0,6 mg.L<sup>-1</sup> de AIB para o enraizamento de pinhão-manso.

Palavras- chave: Cotilédones. Micropropagação. Enraizamento.

## CHAPTER 2 *In vitro* organogenesis from *Jatropha curcas* L cotyledon segments

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the organogenic response from cotyledon segments of five *Jatropha curcas* L. accessions (CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182 and CNPAE-259), derived from the Embrapa Agroenergi germplasm bank. The zygotic embryos of each accession was divided into two groups. In the first, the embryos remained inoculated during 5 days, and in the second, the embryos remained inoculated during 10 days. In the characterization of the accessions, an average of 98.48% of the embryos germinated and the height was in average 4.40 cm for 5 days and 7.32 cm for 10 days of germination. The MS alkaline medium, reduced to half strength, was used. In the induction, intense callosity of the explants was observed, using the MS alkaline medium supplied with 1.5 mg.L<sup>-1</sup> of BAP and 0.05 mg.L<sup>-1</sup> of IBA. In the regeneration phase, accession CNPAE-107 with 5 day explants presented a larger number of sprouts, while accession CNPAE-182 presented a larger number of sprouts with 10 day explants. They were submitted to the regeneration medium comprised by the MS alkaline medium supplied with 1.5 mg.L<sup>-1</sup> of BAP, 0.05 mg.L<sup>-1</sup> of IBA and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>. In the elongation, the explants with 5 days of age of accessions CNPAE-107 and CNPAE-167 presented a higher average height and there was no significant difference to the 10 day explants. The sprouts were transferred to the MS alkaline medium supplemented with 0.3 mg.L<sup>-1</sup> of BAP. Five IBA concentrations (0.3, 0.6, 1.2, 2.4 and 4.58 mg.L<sup>-1</sup>) were tested for rooting. The best IBA concentration used was that of 0.6 mg.L<sup>-1</sup>, and there was no significant difference between the accesses and the age of the explants. The MS alkaline medium supplied with 100 mg.L<sup>-1</sup> of myo-inositol, 10 mg.L<sup>-1</sup> of thiamine and 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose was used in all phases. The pH was adjusted to 5.8 and the media were solidified with 7 g.L<sup>-1</sup> of agar. For the statistical analyses, the data obtained were submitted to variance analysis and the means compared by the Scott-Knott test at 5% of significance, using the SISVAR program. For the organogenesis, the explants with 5 days of age from accessions CNPAE-107 and CNPAE-167 are the most indicated for obtaining a larger number of sprouts while, for accession CNPAE-182, the explants with 10 days of age are indicated. The concentration of 0.6 mg.L<sup>-1</sup> of IBA is the most indicated for *J. curcas* L. rooting.

Keywords: cotyledons, micro propagation, rooting.

## 1 INTRODUÇÃO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie oleaginosa pertencente à família das Euphorbiaceae, a mesma da mamona (*Ricinus* sp.), mandioca (*Manihot* sp.) e da seringueira (*Hevea* spp.). A origem da espécie é bastante controversa, porém há relatos que evidenciam sua procedência na América tropical. São arbustos caducifólios, lenhosos e perenes, adaptáveis as mais variadas condições edofaclimáticas. A planta apresenta grande potencial econômico, pois suas sementes contêm 33 a 38% de óleo rico em hidrocarbonetos reduzidos, que podem ser convertidos em compostos similares aos derivados do petróleo, como o biodiesel, além de apresentarem propriedades interessantes para a indústria de fármacos e tintas (ARRUDA et al., 2004).

Há, atualmente, um crescente interesse no plantio do pinhão-manso. No entanto, o cultivo dessa espécie em escala comercial é limitado pela dificuldade de encontrar material propagativo de qualidade, resultando em plantios desuniformes e com baixo rendimento produtivo.

A propagação do pinhão-manso pode ser sexuada (via sementes) e assexuada ou vegetativa (multiplicada por estacas ou miniestaquia). Paulino et al. (2011) afirmam que plantas oriundas por sementes apresentam melhor formação do sistema radicular, obtendo-se desta forma plantas mais tolerantes á seca e com melhor aproveitamento dos nutrientes no solo. Contudo, as mudas produzidas neste sistema de propagação apresentam crescimento desuniforme. Por meio do método de propagação vegetativa, as mudas ou clones possuem a vantagem de serem precoces, entretanto são plantas de vida mais curta e de sistema radicular menos vigoroso (ARRUDA et al., 2004). Tais problemas com o sistema radicular originam plantas susceptíveis a falta de água e com predisposição a problemas de sustentação, que pode ocasionar ao acamamento em idades avançadas.

Assim, a capacidade de propagação vegetativa ou clonal do pinhão-mansão com a produção de mudas será uma etapa essencial para a expansão dessa cultura. A produção e comercialização em larga escala exigem o estabelecimento de sistema de propagação capaz de garantir a sanidade e uniformidade dos propágulos, permitindo assim, a implantação de cultivos padronizados e com grande potencial produtivo.

De fato, existem muitos desafios de pesquisa para que o pinhão-mansão possa se tornar viável tanto para o cultivo em larga escala quanto para a produção do óleo combustível. Assim sendo, a biotecnologia, aliada ao programa de melhoramento, pode auxiliar no desenvolvimento de cultivares com crescimento uniforme e na produção comercial de mudas com alta qualidade fitossanitária em menor período de tempo.

Uma técnica biotecnológica promissora é a cultura de tecidos vegetais, pois visa a micropropagação (propagação *in vitro*) em larga escala. Diversos explantes podem ser usados para a propagação de uma planta *in vitro*, mas deve ser considerado o nível de diferenciação do tecido utilizado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Plântulas originadas de sementes possuem tecidos meristemáticos, isto é, tecidos pouco diferenciados, o que possibilita uma ótima fonte de explantes competentes (SILVA; CAMILLO; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012) para a organogênese direta e/ou indireta.

A organogênese direta consiste em induzir os explantes a um processo de dediferenciação ou rediferenciação, a partir de células diferenciadas de um tecido, resultando a formação de um eixo caulinar e a forma indireta da organogênese consiste na formação de estruturas denominadas calos antes de originar novos órgãos (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998). A organogênese é uma técnica bastante laboriosa, pois para obter o sucesso não depende unicamente da ação de fitorreguladores, auxinas e citocininas, mas

principalmente, da competência do tecido em resposta a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (LEMOS, 2010).

Diversos estudos organogênicos foram realizados em pinhão-mansinho nos últimos anos com os mais variados objetivos e na maioria dos casos, utilizando tecidos jovens como fontes de explantes. Ápices caulinares e segmentos cotiledonares têm sido utilizados com boa eficiência nos estudos visando transformação genética (DEORE et al., 2008; LI et al., 2008; PURKAYASTHA et al., 2010); segmentos nodais têm se mostrado bastante eficientes na micropropagação clonal (SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2008); discos foliares coletados em plantas adultas demonstraram bom potencial na clonagem dos materiais (KHURANA-KAUL; KACHHWAHA; KOTHARI, 2010) e mais recentemente, pesquisas relataram resultados promissores na utilização da embriogênese somática a partir de segmentos cotiledonares para clonagem em larga escala (SIANG; SOONG; YIEN, 2012).

Apesar dos estudos demonstrarem a viabilidade e a relativa facilidade da multiplicação *in vitro* de pinhão-mansinho via organogênese, é preciso levar em consideração o efeito genotípico. Alguns estudos concluíram que o efeito genotípico é um dos fatores que influenciam o desenvolvimento de plantas de pinhão-mansinho e que esta diferença é mais acentuada entre os acessos tóxicos e atóxicos. Os acessos atóxicos não contêm ésteres de forbol na composição de suas sementes.

Com base nestes relatos e, considerando que estudos sobre diferenças genotípicas e sua influência no desenvolvimento de protocolos de clonagem *in vitro* de pinhão-mansinho são escassos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta organogênica a partir de segmentos cotiledonares de cinco acessos de pinhão-mansinho.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Germinação *in vitro* e caracterização do material vegetal

Para o estudo da organogênese *in vitro* foram utilizadas sementes de pinhão-mansão provenientes do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia, estabelecido na área experimental da unidade Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina – DF. Foram testados quatro acessos tóxicos (CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-182 e CNPAE-259) e um acesso não tóxico (CNPAE-170). Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF.

Foram utilizados como explante inicial para a indução da organogênese, cotilédones provenientes da germinação *in vitro* dos embriões zigóticos de pinhão-mansão. As sementes foram lavadas com detergente neutro em água corrente e, após a lavagem, removeu-se as cascas e as sementes foram transferidas para um frasco com tampa. Realizou-se a assepsia das sementes pela sua imersão em água destilada, adicionada de duas gotas de detergente comercial por 1 minuto, seguido pela imersão em etanol 70% (v/v) por 1 minuto e em hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) durante 20 minutos, sob agitação constante. Por fim as sementes foram lavadas com água destilada estéril para a retirada de todo o resíduo. As etapas da assepsia foram realizadas em fluxo laminar. Posteriormente, as sementes permaneceram submersas por 24 horas em água destilada estéril, para facilitar a remoção do tegumento (Figura 1A). O embrião foi removido do endocarpo com auxílio de bisturi e pinça estéreis e inoculado longitudinalmente colocando o hipocótilo-radicular em contato com o meio em tubos de ensaio estéril contendo 20 ml de meio gelificado (Figura 1 B). Para germinar os embriões zigóticos foi utilizado o meio básico de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), reduzido pela metade da



concentração original. Os tubos de ensaios foram vedados com filme de PVC e cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz ( $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e temperatura  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Foram selecionados 600 embriões para quatro repetições. As repetições continha 15 embriões de cada acesso (CNPAE- 107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182, CNPAE-259) e dois tempos para a germinação (5 e 10 dias). Os embriões foram considerados germinados após o crescimento do eixo embrionário e a expansão dos cotilédones (Figura 1 C e D). Para a caracterização dos acessos foram verificados o percentual de embriões germinados e a altura das plântulas após os 5 e 10 dias de cultivo, conforme dados apresentados na Tabela 1.

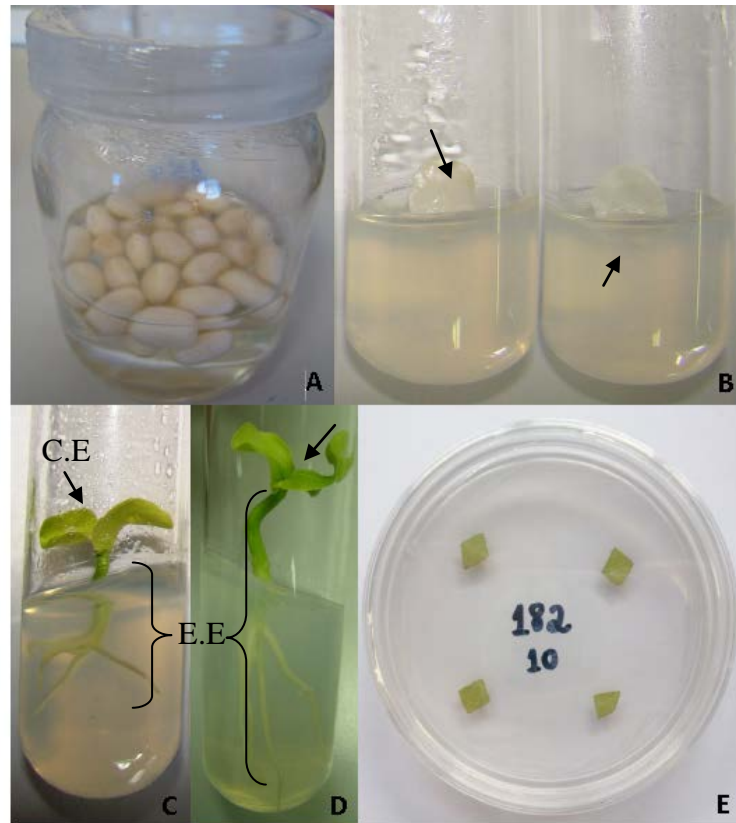


Figura 1 Sementes, embriões zigótico, plântulas germinadas em diferentes idades e segmentos cotiledonares de pinhão-mansó

Nota: **A)** Sementes (sem a casca) submersas em água destilada estéril. **B)** Embrião inoculado longitudinalmente com o hipocótilo-radicular em contato com o meio de cultura para a germinação. **C)** Embriões germinados após 5 dias de inoculação resultando plântulas com eixo embrionário (E.E) e cotilédones expandidos (C.E). **D)** Embriões germinados após 10 dias de inoculação resultando plântulas com eixo embrionário e cotilédones expandidos. **E)** Explantes cotiledonares inoculados em meio de indução composto por meio básico de MS, suplementado com 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de Bap, 0,05 mg.l<sup>-1</sup> de AIB.

Tabela 1 Caracterização dos cinco acessos utilizados como fonte de explante para a organogênese

Acessos	Germinação	Altura média de plântulas (cm)	
	(%)	5 dias <sup>(*)</sup>	10 dias <sup>(*)</sup>
107	97,77	4,50	7,43
167	97,77	4,17	7,46
170	100,00	4,43	7,62
182	100,00	4,19	6,96
259	96,76	4,61	7,15
Médias	98,46	4,40	7,32

Nota: (\*)Dias após a germinação (idade dos cotilédones)

Porcentagem (%) de germinação dos acessos. Altura média das plântulas (cm) com 5 e 10 dias após a germinação

A partir da obtenção e caracterização do material foram realizados os ensaios experimentais inteiramente casualizados, nas seguintes fases da organogênese: indução de calos, regeneração, alongamento e enraizamento dos acessos. Em todas as fases da organogênese, o meio de cultivo utilizado foi o meio básico de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescidos de 100 mg.L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 10 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificados com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 com solução de 1N de NaOH ou HCl e após aferir o pH, os meios de cultivo foram autoclavados durante 20 minutos a uma temperatura de 121 °C. Todas as fases foram desenvolvidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, menos na fase de indução que foi isenta de luz.

## 2.2 Organogênese a partir de segmentos cotiledonares com diferentes idades

Para realizar o ensaio de indução foram utilizados materiais oriundos da germinação *in vitro* previamente caracterizados. Os cotilédones foram excisados com aproximadamente 5x5 mm da região central das folhas de modo que, cada plântula gerou quatro segmentos cotiledonares. Uma vez obtidos, os explantes foram inoculados em placas de Petri, com a face abaxial em contato com o meio de cultivo e separados por certa distância para evitar a interferência de um explante sobre o outro (Figura 1E). O meio de cultivo utilizado para indução de calos foi meio básico de MS, suplementado com 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilapurina (BAP), 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB). As placas foram vedadas com filme de PVC e armazenadas em câmara de germinação tipo B.O.D no escuro com temperatura de 28 °C durante 21 dias.

Após o período de 21 dias, os explantes que continham calos foram transferidos, em condições estéreis, para o meio de regeneração que continha o meio básico de MS, adicionado de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). Os explantes foram cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz branca fluorescente com intensidade luminosa de 30 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> durante 28 dias. Posteriormente, foi avaliado o número de brotos regenerados por segmento cotiledonar.

Os regenerantes foram transferidos, para o meio de alongação composto pelo meio básico de MS suplementado de 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP permanecendo 14 dias nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao término do período de inoculação, foi avaliada a altura dos brotos.

Para o estudo da organogênese foi adotado um esquema fatorial 2x5, sendo dois a idade dos cotilédones (5 e 10 dias de germinação) e cinco, os acessos (CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182 e CNPAE-259).

Os explantes com 5 dias de germinação foram repetidos 15 vezes (placas de Petri) e cada repetição continha quatros segmentos cotiledonares. O mesmo procedimento foi feito com os explantes com 10 dias de germinação. As placas de Petri contendo 4 segmentos cotiledonares foram consideradas com unidade experimental para as análises de variância e teste de média e os ensaios experimentais e houve 4 repetições biológicas.

### **2.3 Enraizamento de brotos regenerados**

Os brotos regenerados e alongados com altura superior de 1 cm foram direcionados para o enraizamento. A base caulinar dos brotos foi cortada em bisel com estilete estéril e imediatamente inoculados em frascos de vidro contendo 50 ml de meio de enraizamento de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), reduzido pela metade da concentração original e 5 concentrações da auxina AIB (0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 mg.L<sup>-1</sup>). Os frascos foram vedados com filme PVC e cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob luz branca fluorescente com intensidade 30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante 30 dias. Foi avaliada a melhor concentração de AIB para o enraizamento dos acessos.

Para este experimento foi utilizado o esquema fatorial 5x5, sendo cinco acessos (CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182, CNPAE-259) e cinco, concentrações de AIB (0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 mg.L<sup>-1</sup>). Selecionou-se o total de 375 brotos, da qual foram utilizados para as cinco concentrações de AIB. Para cada concentração havia 15 brotos de cada acesso, totalizando 75 brotos por concentração. O experimento foi realizado com 15 repetições para os cinco acessos e para as cinco concentrações. Após 30 dias foi avaliado o número de brotos enraizados. Cada frasco continha um broto que foi considerado uma unidade experimental para as análises de variância e teste comparativos de média.

Um novo experimento foi conduzido, utilizando os brotos regenerados a partir de segmentos cotiledonares com diferentes idades que não foram enraizados. Um novo corte em bisel foi feito e os brotos foram imediatamente inoculadas em frascos de vidro contendo 50 ml de meio de enraizamento composto por meio básico de MS, reduzido a metade da força da concentração original, acrescido de  $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB.

Para esse ensaio experimental foi utilizado um esquema fatorial  $5 \times 2$ , sendo cinco acessos (CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE- 182, CNPAE- 259) e dois, a idade dos explantes (5 e 10 dias de germinação). Utilizou o total de 50 brotos. Para cada acesso havia 5 brotos oriundos de explantes com 5 dias de germinação e 5 brotos oriundos de explantes com 10 dias de germinação. Após 30 dias foram avaliadas o número de plantas enraizadas. Para a análise de variância e teste comparativo de média, cada broto foi considerado uma unidade experimental.

## **2.4 Análise estatística**

Os ensaios experimentais foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, e os resultados do número de brotos regenerados, diferentes concentrações para o enraizamento e diferentes idades de plantas enraizadas, foram transformadas ( $\sqrt{x+0,5}$ ), a idade dos cotilédones foi feito o Teste t de Student (LSD) e foram comparados por análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de significância, utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Germinação *in vitro* e Caracterização do material utilizado para a organogênese**

O método utilizado para assepsia das sementes foi eficaz não havendo nenhum tipo de contaminação. Para a taxa de germinação dos embriões foi observada uma vez que a média geral foi de 98,46% dos materiais germinados (Tabela 1). A altura média das plântulas com cinco dias de germinação foi de 4,40 cm e das plântulas com 10 dias de germinação de 7,32 cm (Tabela 1).

#### **3.2 Organogênese a partir de segmentos cotiledonares com diferentes idades**

De maneira geral, observou-se que para organogênese houve diferenças significativas nos acessos testados. . Na fase de indução, observou-se uma intensa proliferação celular no bordo dos explantes (Figura 2 A e B). Na análise de variância (Tabela 2), foram observados diferenças significativas entre os acessos em nível de 1% de probabilidade para as variáveis avaliadas (número e altura dos brotos regenerados) e houve uma dependência entre os fatores (acessos e idade dos explantes).

Tabela 2 Número de brotos regenerados a partir de segmentos cotiledonares com 5 e com 10 dias de idade e a altura média (cm) de brotos regenerados

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios	
		Nº Brotos/ placa	Altura (cm)
Acessos	4	0,63 <sup>**</sup>	2,36 <sup>**</sup>
Idade dos Cotilédones	1	0,10 <sup>n.s</sup>	0,61 <sup>n.s</sup>
Ac.x I.C	4	0,38 <sup>**</sup>	0,32 <sup>n.s</sup>
Resíduo	590	0,10	0,44
<b>Média</b>		1,03	0,74
<b>CV (%)</b>		31,52	90,10

<sup>\*\*</sup> significativo a 5 e 1% de probabilidade respectivamente, <sup>n.s</sup> não significativo a 5% de probabilidade.

As médias do número de brotos e de altura dos mesmos, seguido pela mesma letras, não diferiram significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade (Tabela 3). Os brotos regenerados proveniente de explantes com cinco dias de idade, do acesso CNPAE-182, foram significativamente menor que o número de brotos obtidos a partir de explantes com dez dias de idade (Tabela 3). Analisado o fator acesso, o número médio de brotos por placa diferiu significativamente. Quando foram utilizados segmentos cotiledonares oriundos de cotilédones com 5 dias de idade, os acessos CNPAE-107 e CNPAE-167 obtiveram o maior número de brotos regenerados quando comparado com os demais acessos (Figura 2 A). Para a formação de brotos a partir de explante com 10 dias de germinação houve efeito genótipo (Figura 2 B). Os acessos CNPAE-167 e CNPAE-182 tiveram o maior número de brotos quando comparados com o acesso CNPAE-170, onde foi observado o menor número de brotos regenerados (Tabela 3).



Tabela 3 Número de brotos formados após a fase de regeneração *in vitro* e altura de brotos regenerados após a fase de alongação

Acessos	Número de brotos regenerados		Altura de brotos regenerados	
	Idade dos	Idade dos	Idade dos	Idade dos
	Cotilédones	Cotilédones	Cotilédones	Cotilédones
	(5 dias)	(10 dias)	(5 dias)	(10 dias)
107	1,11aA	1,01bA	0,85aA	0,72 aA
167	1,07aA	1,16aA	1,03aA	0,87 aA
170	0,95bA	0,89cA	0,65bA	0,55 aA
182	0,95bB	1,13aA	0,65bA	0,76 aA
259	1,00bA	1,03bA	0,67bA	0,61aA

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL e mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si.

No teste comparativo de médias, ao analisar altura média dos brotos regenerados, verificou-se diferença significativa entre os acessos. A altura de brotos regenerados a partir de segmentos cotiledonares com 5 dias de idade dos acessos CNPAE-107 e CNPAE-167, apresentaram a maior média de altura, e os demais acessos não diferiram significativamente. Entretanto, brotos oriundos de explantes com 10 dias de os acessos testados (Tabela 3).

O efeito genotípico observado na organogênese *in vitro*, de certa forma, foi um resultado esperado, uma vez que, estudos de variabilidade indicam que há uma alta divergência genética entre materiais de pinhão-manso. Em condições experimentais de campo, caracteres morfo-agronômicos têm mostrado diversidade em plantas na fase jovem (LAVIOLA et al., 2011).

Foi verificado que para o acesso CNPAE-170, houve um baixo desempenho na regeneração independente da idade do explante, fato que corrobora os resultados obtidos por Laviola et al. (2010) que, em condições experimentais de campo, relataram que o acesso não-tóxico apresentou crescimento menos vigoroso, refletindo diretamente no rendimento produtivo.

No entanto, comparações genotípicas em estudos de micropropagação de pinhão-mansão não são encontradas com frequência na literatura. Igualmente escassos, são os estudos que relatam a eficiência na regeneração *in vitro* de explantes de pinhão-mansão atóxico, assim, observa-se que a eficiência de regeneração é dependente de vários fatores, entre eles, o tipo e idade dos explantes, acesso, o meio de cultura e a realização de subcultivos adicionais.

Em geral, os resultados na quantidade de brotos regenerados oriundos de segmentos cotiledonares em pinhão-mansão, apresentaram-se bastante divergentes. Para o protocolo utilizado, a média de regeneração foi de 1,03 broto por placa. Entretanto, os resultados encontrados por Zong et al. (2010) foi em média 4,25 brotos por explante. Os autores utilizaram duas citocininas (Cin e BAP), no presente estudo foi utilizado auxina, citocinina e ácido giberélico para a regeneração. Deore e Johnson (2008) observaram médias de regeneração variando entre 1,15 e 1,60 brotos por explante. Os autores verificaram que a regeneração foi crescente a cada subcultivo. Embora, a literatura relate que o aumento do número de subcultivos seja favorável à formação de brotos em pinhão-mansão, sabe-se que existe um fator limitante para o tempo de exposição das culturas aos reguladores de crescimento denominado variação somaclonal. A variação somaclonal é de origem genética, nos quais, os descendentes serão geneticamente diferentes da planta-mãe, mesmo não havendo reprodução sexuada. Esta, é um fator indesejado para a clonagem, esta pode ocorrer a partir do primeiro subcultivo, logo, quanto maior o número de subcultivos e o tempo de exposição aos reguladores, maior a possibilidade de ocorrer a variação somaclonal.

### 3.3 Enraizamento dos brotos regenerados

Após trintas dias de cultivo, foi observado a eficiência da auxina AIB no enraizamento das plantas de pinhão-manso, no entanto, verificou-se que o enraizamento foi dependente da dosagem hormonal a que as plantas foram submetidas. Na análise de variância (Tabela 4), observou-se diferenças significativas em nível de 1% de probabilidade entre as concentrações de AIB e houve uma relação de dependência entre os fatores (acesso com a concentração de AIB).

Tabela 4 Influência de diferentes concentrações de AIB para os cinco acessos na formação de raízes após 30 dias de cultivo no meio de enraizamento

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios
		Plantas enraizadas
Acessos	4	0,03 <sup>n.s</sup>
Concentração AIB	4	0,65 <sup>**</sup>
Ac. x Conc.	16	0,06 <sup>**</sup>
Resíduo	350	0,02
<b>Média</b>		0,78
<b>CV (%)</b>		20,44

\* \*\* significativo a 5 e 1% de probabilidade respectivamente, <sup>n.s</sup> não significativo a 5% de probabilidade.

Foi utilizada a regressão polinomial para análise dos dados quantitativos, porém o gráfico dos resultados obtidos foi negativo. Devido ao resultado da regressão, o teste de média foi realizado. Foi verificado que houve uma relação de dependência entre os fatores pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

A melhor concentração para os acessos CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170 e CNPAE-182 foi 0,6 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Para o acesso CNPAE-259 as concentrações 0,3; 0,6; 1,2 mg.L<sup>-1</sup> observou-se o mesmo número de plantas enraizadas, sendo que as demais concentrações não diferiram entre si (Tabela 5)

Tabela 5 Teste de eficiência de cinco concentrações de AIB nos cinco acessos para a formação de raízes após 30 dias de cultivo para os cinco acessos utilizados

Acessos	Concentração de AIB ( mg.L <sup>-1</sup> )				
	0,3	0,6	1,2	2,4	4,8
<b>107</b>	0,71bB	1,01aA	0,71bB	0,71aB	0,77aB
<b>167</b>	0,71bB	0,98aA	0,71bB	0,77aB	0,78aB
<b>170</b>	0,81aB	1,02aA	0,81aB	0,71aB	0,71aB
<b>182</b>	0,71bB	0,91bA	0,71bB	0,78aB	0,71aB
<b>259</b>	0,81aA	0,81bA	0,81aA	0,71aB	0,71aB

(<sup>1</sup>) Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL e mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si.

Novo experimento foi realizado, com os cinco acessos comparando a idade do explantes inoculados na concentração de 0,6 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, uma vez que essa concentração apresentou o melhor resultado no experimento anterior (Figura 2 E e F). Na Tabela 6, é apresentada ANOVA dos cinco acessos e diferentes idades dos explantes. Os fatores testados (acessos e idade dos explantes) não diferiram estatisticamente entre si. Observou-se no presente estudo, uma média de 0,89 de plantas enraizadas por frasco, seguindo-se o protocolo proposto por Li et al. (2008) com algumas modificações.

Tabela 6 Influência das idades dos explantes dos cinco acessos inoculados na concentração de  $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios
		Nº de plantas enraizadas
Acessos	4	0,032 <sup>ns</sup>
Idade dos Cotilédones	1	0,002 <sup>ns</sup>
Acesso x I.C	4	0,018 <sup>ns</sup>
Resíduo	40	0,040
Média		0,89
CV (%)		22,52

<sup>\*,\*\*</sup> significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, <sup>ns</sup> não significativo a 5% de probabilidade.

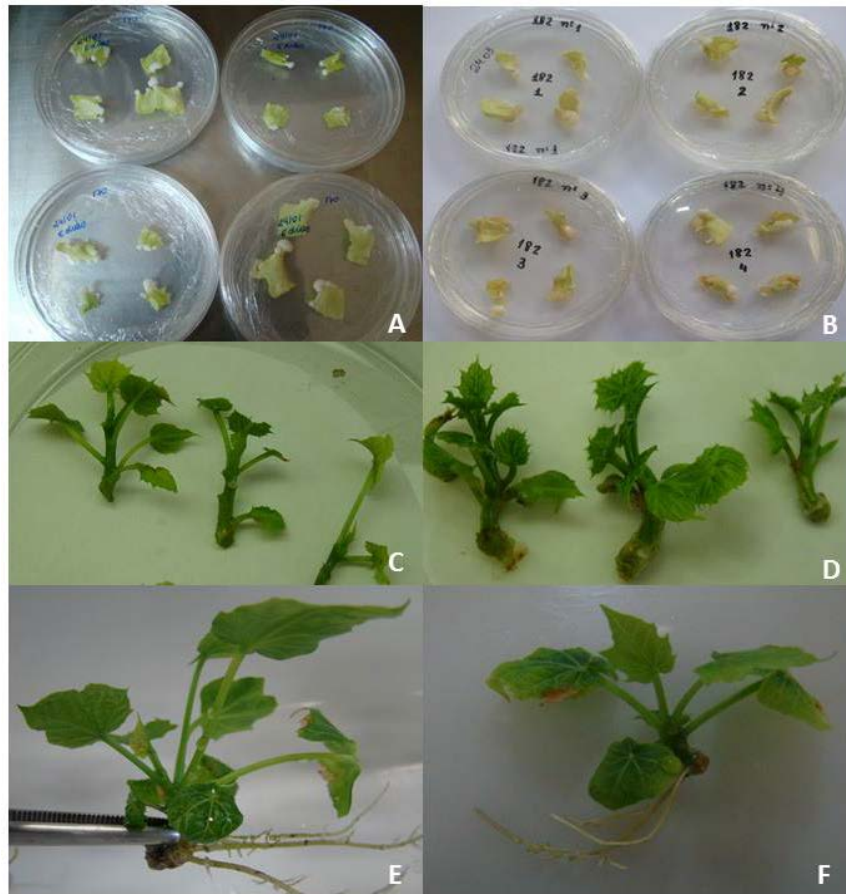


Figura 2 Calos induzidos em segmentos cotiledonares, brotos regenerados provenientes de calos oriundos de segmentos cotiledonares e plantas enraizadas

Nota: **A)** Calos induzidos em explantes com 5 dias de idade. **B)** Calos induzidos em explantes com 10 dias de idade. **C)** Brotos regenerados a partir de explantes com 5 dias de germinação. **D)** Brotos regenerados a partir de explantes com 10 dias de germinação. **E)** Planta enraizada proveniente de explantes com 5 dias de germinação. **F)** Planta enraizada oriundas de explantes com 10 dias de germinação.

O ácido indolbutírico (AIB) é a auxina a mais responsiva para o enraizamento, pois interagem com o ácido 3-indolacético (AIA) endógeno para induzir a formação de raízes. Usualmente esse fitorregulador é o mais utilizado no enraizamento de plantas de pinhão-manso. As concentrações utilizadas em geral são baixas, variando entre  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  (KHEMKLADNGOEN et al., 2011) e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (KHURANA-KAUL; KACHHWAHA; KOTHARI, 2010). Observou-se que plantas submetidas em concentrações superiores a  $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB no enraizamento, induziram calos na base do explantes. Portanto, a utilização de concentrações superiores a  $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$  são consideradas excessivas para o enraizamento de plantas de pinhão-manso.

Foram selecionadas plantas com altura mínima de 1 cm para serem submetidas ao meio de enraizamento. Entretanto, a altura adotada por Shrivastava e Banerjee (2008) variou entre 5 e 6 cm e obtiveram boa formação de raíz. Já Deore e Johnson (2008) usaram plantas com alturas entre 2 a 3,5 cm e observaram a formação de raíz em 80% das plantas de pinhão-manso. As plantas regeneradas e enraizadas no presente estudo foram aclimatizadas e transferidas para casa de vegetação (Figura 3 A e B).

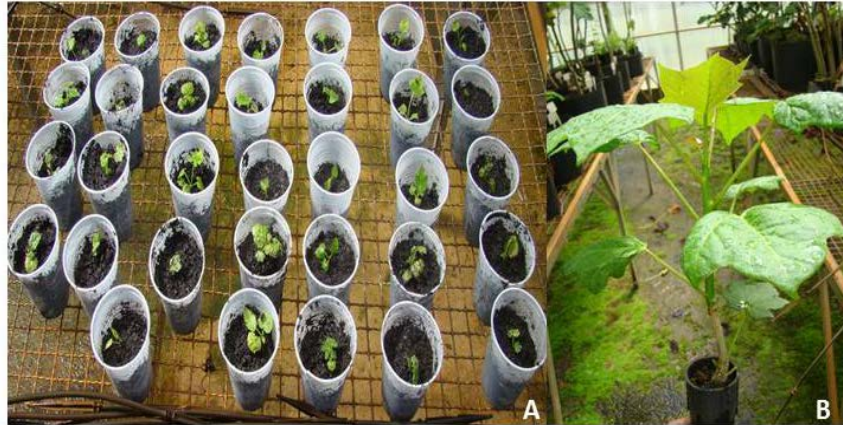


Figura 3 Plantas regeneradas e enraizadas a partir da organogênese de segmentos cotiledonares de pinhão-manso.

Nota: **A)** Plantas transferidas para substrato em casa de vegetação. **B)** Planta de pinhão-manso mantida em casa de vegetação com seis meses de idade.



#### 4 CONCLUSÕES

O protocolo adotado para descontaminação e germinação das sementes mostra-se eficiente, com a taxa de contaminação próxima a zero e alto índice de germinação para os acessos estudados.

Na fase de indução, os explantes de todos os acessos exibem uma intensa proliferação celular no bordo dos segmentos cotiledonares.

Os cinco acessos de pinhão-manso estudados respondem diferentemente à organogênese, sob as mesmas condições de cultivo.

Para o acesso CNPAE- 107 são verificados o maior número de brotos por placa, quando é utilizado explantes com 5 dias de idade, entretanto, para o acesso CNPAE-182, o maior número de brotos é verificada para explantes com 10 dias de idade. O acesso CNPAE-170 apresenta dificuldade para regenerar brotos independente da idade dos explantes utilizados.

A concentração  $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$  promove a formação de raiz em todos os acessos estudados. Não há influência das idades dos explantes dos cinco acessos para enraizamento de pinhão-manso.

## REFERÊNCIAS

- ARRUDA, F. P. et al. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.
- DEORE, A. C.; JOHNSON, T. S. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. **Plant Biotechnology**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 7-11, 2008.
- FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados - SISVAR 4.1**. Lavras: UFLA, 2000. Software.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. 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. 183-260.
- KHEMKLADNGOEN, N. et al. Adventitious shoot regeneration from juvenile cotyledons of a biodiesel producing plant *Jatropha curcas* L. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 111, n. 1, p. 67-70, Jan. 2011.
- KHURANA-KAUL, V.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S. L. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54, n. 2, p. 369-372, 2010.
- LAVIOLA, B. G. et al. Características morfo-agronômicas do banco de germoplasma de pinhão-manso na fase jovem. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 371-379, 2011.
- \_\_\_\_\_. Genetic improvement of *Jatropha* for biodiesel production. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIO-FUEL CROP PRODUCTION AND DEVELOPMENT, 1., 2010, Tegucigalpa. **Proceedings...** Tegucigalpa: CEIBA, 2010. p. 1-10.

- LEMOS, E. E. P. Organogênese. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2010. p. 25-30.
- LI, M. et al. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 173-181, Jan. 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PAULINO, J. et al. Crescimento e qualidade de mudas de pinhão-manso produzidas em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 1, p. 37-46, 2011.
- PURKAYASTHA, J. et al. Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54, n. 1, p. 13-20, 2010.
- SHRIVASTAVA, S.; BANERJEE, M. *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): influence of additives. **Internacional Journal of Integrative Biology**, Tsukuba, v. 3, n. 1, p. 73-79, 2008.
- SIANG, T. C.; SOONG, S. T.; YIEN, A. T. S. Plant regeneration studies of *Jatropha curcas* using induced embryogenic calli from cotyledon explants. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 31, p. 8022-8031, Apr. 2012.
- SILVA, R. C.; CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. A method for seedling recovery in *Jatropha curcas* after cryogenic exposure of the seeds. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 60, n. 1, p. 473-482, 2012.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1998. v. 1, p. 11-19.

ZONG, H. et al. Effective regeneration from leaf of *Jatropha curcas* L. and origin of its adventitious shoots. **China Journal Applied Environment Biology**, Beijing, v. 16, n. 6, p. 789-793, 2010.

### CAPITULO 3 Calogênese *in vitro* em anteras de pinhão-mansó

#### RESUMO

O objetivo com esse estudo foi avaliar a resposta da calogênese em cinco acessos de pinhão-mansó oriundos do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia, por meio da cultura de anteras. No ensaio da calogênese em anteras de pinhão-mansó, os acessos utilizados foram (CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182 e CNPAE-258). Os botões florais foram coletados e fixados em solução de Carnoy 3:1 (álcool etílico: ácido acético, respectivamente). Posteriormente, prepararam-se lâminas com as anteras utilizando hematoxilina para a verificação do estágio de desenvolvimento das mesmas. As anteras foram inoculadas em meio básico de MS, contendo 1  $\mu\text{M}$  2,4-D, 1  $\mu\text{M}$  ANA e 5  $\mu\text{M}$  BAP. Avaliou-se o tipo de calo formado nas anteras. Outro ensaio foi realizado apenas com o acesso CNPAE-170, testando 3 concentrações de fitorreguladores, 2,4-D (1,0; 5,0; 10,0  $\mu\text{M}$ ), ANA (1,0; 5,0; 10,0  $\mu\text{M}$ ) e BAP (5,0; 10,0; 50,0  $\mu\text{M}$ ). Os meios utilizados foram compostos por meio básico de MS, suplementado com 90  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, o pH ajustado para 5,8 e solidificado com 8  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar. Para análise estatística utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições e a comparação das médias foi feita usando o programa GENES e o teste de média utilizou-se o teste Tukey em nível de 5% de significância. Os resultados obtidos mostraram que o desenvolvimento dos micrósporos das anteras não foi sincrônico. O estágio de tetrade foi encontrado quando o comprimento dos botões florais estava entre 1,5 e 2,0 mm e as anteras entre 657 e 811  $\mu\text{m}$  de comprimento. O acesso CNPAE-170 apresentou os melhores resultados para a indução de calos tipo 1 que são calos em estágio de desenvolvimento, e o menor número de anteras sem a indução de calos. O Tratamento III foi composto por meio básico de MS, acrescido com 10  $\mu\text{M}$  2,4-D, 10  $\mu\text{M}$  ANA e 50  $\mu\text{M}$  BAP, resultou no maior número de anteras sem indução de calos (tipo 0). Diante dos resultados de calogênese em anteras, verificou-se que novos testes deverão ser realizados a fim de aperfeiçoar o protocolo.

Palavras-chave: Cultura de anteras. Acessos. Calos.

### CHAPTER 3 *In vitro* callogenesis of *Jatropha curcas* l. anthers

#### ABSTRACT

The purpose of the study was to evaluate the response of the callogenesis on five *J. curcas* L. accessions derived from the Embrapa Agroenergia's germplasm bank, by means of anther culture. The accessions used were: CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182 and CNPAE-258. The flower buds were collected and fixed in 3:1 Carnoy solution (ethanol: acetic acid respectively). Subsequently, slides were prepared with the anthers using hematoxylin in order to identify their development state. Anthers were inoculated the MS alkaline medium supplemented with 1 $\mu$ M of 2,4-D, 1 mM of NAA and 5 $\mu$ M of BAP. The type of calli formed on the anthers was evaluated. Another trial was performed with only the CNPAE-170 accession, testing 3 concentrations of phytohormones: 2,4-D (1.0; 5.0; 10.0 mM), NAA (1.0; 5.0; 10.0 mM) and BAP (5.0; 10.0; 50.0 mM). The media used were comprised of the MS alkaline medium supplemented with 90 g L<sup>-1</sup> of sucrose, with pH adjusted to 5.8, and solidified with agar 8g.L<sup>-1</sup>. A completely randomized design was used in the statistical analyses, with 15 replicates, and the means were compared by the Tukey test at 5% significance level, using the program GENES. The obtained results showed that the development of microspores of the anthers was not synchronic. A tetrad state was found when the length of the floral buds was between 1,5 and 2,0 mm and of the anthers was between 657 and 811  $\mu$ m. The CNPAE-170 accession presented the best results for the induction of type 1 calli, which are calli in development phase, and the lower number of anthers without the induction of calli. Treatment III, comprised of the MS alkaline medium supplied with 10 $\mu$ M of 2,4-D, 10 $\mu$ M of NAA and 50 $\mu$ M of BAP, resulted in a larger number of anthers without calli induction (type 0). With these anther callogenesis results, it was verified that new tests must be performed in order to optimize the protocol.

Keywords: Anther culture. Accessions. Callis.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil existem mais de 200 espécies oleaginosas que podem ser usadas para a produção de biocombustível. O pinhão-mansão tem despertado grandes interesses por ser uma cultura que apresenta um potencial de rendimento de grãos superior às oleaginosas tradicionais e por não concorrer diretamente com a agricultura de alimentos.

O Pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie perene, diplóide ( $2n=22$  cromossomos), monóica e pertence à família das Euphorbiaceae. É uma cultura que está em processo de domesticação e tem diversos desafios de pesquisa para serem superados. Dentre os desafios encontra-se a seleção de materiais uniformes, pois o melhoramento dessa espécie é dificultado devido à forma de propagação, que pode ser seminal ou vegetativa. É uma planta com reprodução mista e predisposição à alogamia, necessitando de vários ciclos de recombinação e seleção para a fixação de acessos elites. No entanto, o uso de técnicas convencionais para o melhoramento do pinhão-mansão é dificultado devido a fatores como alta heterozigidade dos melhores genótipos, pelo longo período juvenil das plantas, pois seu clímax produtivo ocorre a partir do 4º ou 5º ano e, também, pelas complicações advindas do efeito ambiental (DIAS et al., 2007; FIALHO et al., 2005).

Com o passar dos anos e com os avanços tecnológicos, o melhoramento de plantas sofreu influência de metodologias e técnicas advindas de áreas afins, objetivando principalmente a economia de tempo e trabalho na obtenção de acessos superiores. Neste contexto, o uso de ferramentas biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais vem ganhando espaço, pois atualmente é uma das áreas de conhecimento da biologia vegetal que fornece aplicações práticas ao melhoramento de plantas. Entre elas a germinação precoce de sementes *in vitro*, a cultura de embriões imaturos e a cultura de anteras ou micrósporos, que podem

atuar na aceleração de fases do programa de melhoramento genético (MILLANI; CARVALHO, 2005).

Para os programas de melhoramento a utilização da cultura de anteras contribui com a economia dos custos e redução do tempo de produção de novas linhagens (MILLANI; CARVALHO, 2005; MORAES-FERNANDES et al., 1999; SANTOS; ZANETTINI, 2002). Essa técnica consiste basicamente em produzir plantas haplóides ou duplo-haplóides diminuindo o tempo de desenvolvimento de linhagens homozigotas, facilitando a obtenção de linhagens superiores.

Ratificando a ideia, existem relatos de uso rotineiro da cultura de anteras em programas de melhoramento de famílias vegetais com grande importância econômica, como os cereais, as crucíferas e as solanáceas (MORAES-FERNANDES et al., 1999). O primeiro relato de obtenção de planta haplóide via cultura de antera foi em 1964, com a espécie *Datura inóxia* (GUHA; MAHESHWARI, 1964). Os autores relatam que o cultivo de anteras íntegras, contendo grãos de pólen em desenvolvimento, induzia a formação de calos, posteriormente embriões e em seguida o desenvolvimento de plantas haplóides. Na China, durante a década de 70, foram desenvolvidos as primeiras cultivares de fumo, arroz e trigo, por meio do cultivo de anteras (MORAES-FERNANDES et al., 1999). No Brasil, a cultivar de trigo BRS-43 foi obtida mediante esse método (CAETANO; MORAES-FERNANDES, 1992).

A cultura de antera *in vitro* estimula os micrósporos a dividirem continuamente, por meio de condições adequadas de cultivo, em meio de cultura com composições químicas especiais (sais minerais, vitaminas, fitoreguladores adequados), com isso, induz a formação de calos embriogênicos ou embriões. Assim, os micrósporos podem ser manipulados, desviando a rota gametofítica, que induz a produção do grão de pólen, para a rota esporofítica, em cujo grãos



de pólen jovem são induzidos a sofrerem divisões mitóticas para formar um embrião.

São inúmeros os fatores que influenciam a eficiência e o processo de androgênese *in vitro*, tais como o estágio de desenvolvimento do micrósporo (HE; OUYANG, 1984; OUYANG; ZHOU; JIA, 1983), a fisiologia da planta doadora de anteras (OUYANG et al., 1987; WANG; CHEN, 1980), as condições de cultura *in vitro* e o genótipos da planta doadora (BULLOCK et al., 1982). A androgênese é definida como sendo, um modo de reprodução em que a progênie possui o material genético nuclear oriundo somente do genitor masculino (MCKONE; HAL PERN, 2003).

O estágio de desenvolvimento dos micrósporos é um dos fatores mais importantes para o sucesso na obtenção de plantas haplóides. Tem-se constatado que o período crítico para a indução do desenvolvimento androgenético é aquele imediatamente anterior à mitose do micrósporo, logo após a fase de tétrade (SANTOS; ZANETTINI, 2002). É nessa fase que sintetiza a maior parte do RNAr e RNAt dos micrósporos, sendo que, logo após esse período, os genes responsáveis pela síntese destes ácidos nucléicos são desligados. Portanto, é imprescindível que as anteras sejam excisadas, durante, ou um período imediatamente anterior, à mitose para que os grãos de pólen sigam a rota androgenética (VASIL; NITCH, 1975).

Entretanto, há evidências de que não existe uniformidade entre anteras de um botão floral ou entre micrósporos de uma mesma antera. Há uma relação entre o tamanho do botão floral com os estádios de desenvolvimento dos micrósporos (LUZ et al., 1995), sendo que apenas 0,5 a 5% sofrem desenvolvimento androgenético (VASIL; NITSCH, 1975).

Logo, é imprescindível a seleção prévia do tamanho dos botões florais e das anteras para obter o micrósporo no melhor estágio para ser utilizado. Há relatos de que em batata, o estágio uninucleado dos grãos de pólen jovens é

encontrado em botões florais com tamanhos entre 4 a 7 mm (SOPORY; JACOBSEN; WENZEL, 1978), já em aspargos, os grãos de pólen em fase ideal são encontrados em anteras cujos botões florais medem de 1,6 a 2,0mm (BOBROWSSKI et al., 1995). Feng e Woly (1991) concluíram que as anteras de aspargos contendo micrósporos no estágio uninucleado produziram três vezes mais embriões que aquelas que continham micrósporos em outros estádios de desenvolvimento. Diante do exposto, é essencial saber a fase de desenvolvimento dos micrósporos para obter sucesso nas pesquisas que envolvem a cultura de anteras.

O meio de cultura é outro fator essencial para o sucesso da cultura de anteras. A composição correta do meio de cultivo é imprescindível para a eficiência na indução de calos. O meio utilizado pode ser líquido e/ou sólido, os mais usuais são o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e N6 (CHU et al., 1975). No entanto, calos produzidos em meio líquido apresentam menor taxa de regeneração que os induzidos em meio sólido (BOBROWSSKI et al., 1995; ZHOU; BALL; KONZAK, 1992). A influência dos reguladores de crescimento sobre o desenvolvimento de calos tem sido estudada em diversas espécies. Chu (1982) relata que as auxinas são essenciais ou benéficas para a indução de calos. As citocininas tem se mostrado benéficas em alguns casos, porém em muitos casos têm ação inibitória. Para as solanáceas, o meio de cultivo de anteras, não requer adição de auxina para indução, diferentemente das gramíneas e crucíferas, nas quais a auxina 2,4-D é a mais utilizada. Em arroz, as auxinas e citocininas se interagem para a indução de calos sendo que ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido naftalenoacético (ANA) são as mais eficientes nesta função.

Apesar de todos os esforços para a produção de plantas haplóides até o momento, não existe estudos com a cultura de pinhão-manso. O presente estudo foi baseado no protocolo de Chatuverdi, Razdan e Bhojwani (2003), no qual os

autores utilizaram uma espécie lenhosa e perene e alcançaram 60% regeneração de plantas haloploides por meio de calos. Portanto, o objetivo foi avaliar a resposta de calogênese em anteras utilizando cinco acessos de pinhão-manso.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cultivo *in vitro* de anteras

Após a determinação do estágio de desenvolvimento e a desinfestação do micrósporo, as anteras contendo os micrósporos uninucleados (pertencentes aos acessos CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182 e CNPAE-258), foram inoculadas em placas de Petri 60x15mm, lisa e estéril, contendo 10 ml de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 90g de sacarose, 1 $\mu$ M de ácido diclorofenoxiacético (2,4- D), 1 $\mu$ M de ácido naftalenoacético (ANA), 5 $\mu$ M de 6- Benzilaminopurina (BAP) para a formação de calos, previamente esterilizado em autoclave. As anteras foram armazenadas em câmara de germinação tipo B.O.D com temperatura  $\pm$  28°C na ausência de luz por um período de 60 dias.

Após o período de 60 dias de cultivo, foi avaliada a proliferação celular nas anteras por meio das características dos tipos de calos, utilizando uma escala que variou de zero a dois (0 – nenhuma formação; 1 – calo em estágio inicial de desenvolvimento; 2 – calo em avançado estágio de desenvolvimento) (Figura 1).

Foram selecionados 150 botões florais, sendo 30 anteras por acesso. E os acessos estudados foram (CNPAE- 107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182, CNPAE-258). O ensaio experimental foi composto por cinco tratamentos (acessos), cada tratamento com 3 repetições contendo 10 anteras. As anteras foram avaliadas através da formação de calos utilizando uma escala de 3 tipos (0- nenhuma formação; 1- calo em estágio inicial de desenvolvimento; 2- calo em avançado estágio de desenvolvimento). Cada repetição (placa de Petri) foi considerada uma unidade experimental para as análises de variância e teste comparativo de médias Tukey a 5% de probabilidade.

### **2.1.1 Material Biológico**

Na determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo, foram utilizadas anteras de quatro acessos tóxicos (CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-182 e CNPAE- 258) e um acesso atóxico (CNPAE-170). As inflorescências foram coletadas de plantas matrizes de pinhão-manso, pertencentes do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia, localizado no núcleo de apoio a culturas energéticas (CNPAE) em Planaltina – DF (Figura 4). O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II e no Laboratório de Microscopia Eletrônica, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF.

### **2.1.2 Determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo**

Inflorescências jovens, com botões florais de vários comprimentos (0,5mm a 5,0mm) foram coletadas aleatoriamente no início da manhã, acondicionadas em caixa térmica com gelo e conduzidos para o laboratório. Os botões florais foram fixados em solução de Carnoy 3:1 (álcool etílico: ácido acético respectivamente) por um período mínimo de 24 horas. Após, esse período foram armazenadas em álcool 70% e mantidas em geladeira a uma temperatura  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ , até o momento do preparo das lâminas para a identificação do estágio de tétrades.

Com auxílio de um paquímetro (precisão 150 x 0,02 mm), foram verificadas as medidas do comprimento e diâmetro dos botões florais e do comprimento das anteras (Figuras 5A e 5B). Para a determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo as anteras retiradas do botão floral foram colocadas em lâminas limpas onde se adicionou uma gota de hematoxilina diluída em álcool 70%. O preparado foi coberto por uma lamínula e foi exercida

uma leve pressão sobre a mesma, de modo que, a antera fosse rompida e os micrósporos expelidos para o exterior. Em seguida o material foi levado para análise em microscópio óptico Axiphot Zeiss com câmera acoplada. As imagens dos micrósporos em fase de tétrade foram capturadas e salvas digitalmente. Foi avaliada a percentagem de micrósporos em estágio de tétrade (Tabela 2 ).

### **2.1.3 Meio de cultura para indução de Calos**

Após a determinação do estágio de desenvolvimento e a desinfestação do micrósporo, as anteras contendo os micrósporos uninucleados (pertencentes aos acessos CNPAE-107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182 e CNPAE-258), foram inoculadas em placas de Petri 60x15mm, lisa e estéril, contendo 10 ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 90g de sacarose, 1 $\mu$ M de ácido diclorofenoxiacético (2,4- D), 1 $\mu$ M de ácido naftalenoacético (ANA), 5 $\mu$ M de 6- Benzilaminopurina (BAP) para a formação de calos, previamente esterilizado em autoclave. As anteras foram armazenadas em câmara de germinação tipo B.O. D com temperatura  $\pm$  28°C na ausência de luz por um período de 60 dias.

Após o período de 60 dias de cultivo, foi avaliada a proliferação celular nas anteras por meio das características dos tipos de calos, utilizando uma escala que variou de zero a dois (0 – nenhuma formação; 1 – calo em estágio inicial de desenvolvimento; 2 – calo em avançado estágio de desenvolvimento) (Figura 1).

Foram selecionados 150 botões florais, sendo 30 anteras por acesso. E os acessos estudados foram (CNPAE- 107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182, CNPAE-258). O ensaio experimental foi composto por cinco tratamentos (acessos), cada tratamento com 3 repetições contendo 10 anteras. As anteras foram avaliadas por meio da formação de calos utilizando uma escala de 3 tipos (0- nenhuma formação; 1- calo em estágio inicial de desenvolvimento; 2- calo

em avançado estágio de desenvolvimento). Cada repetição (placa de Petri) foi considerada uma unidade experimental para as análises de variância e teste comparativo de médias Tukey a 5% de probabilidade.

#### **2.1.4 Condições básicas de elaboração e manutenção do experimento**

O protocolo foi proposto por Chaturvedi, Razdan e Bhojwani (2003). O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da adição do agente gelificante 0,8% ágar, com 1M de NaOH ou HCl sendo, em seguida, autoclavados por 20 minutos, a 121°C e 1,3 atm de pressão.

#### **2.1.5 Análise Estatística**

Os testes foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizados, no esquema fatorial 5X3 sendo, cinco os acessos (CNPAE- 107, CNPAE-167, CNPAE-170, CNPAE-182, CNPAE-258) e três os tipos de calos (0- nenhuma formação; 1- calo em estágio inicial de desenvolvimento; 2- calo em avançado estágio de desenvolvimento). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com teste F a 1% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância, utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 2006). Devido aos resultados obtidos no experimento, um novo ensaio experimental foi realizado como descrito a seguir:

## 2.2 Cultivo in vitro de anteras de pinhão-manso do acesso 170

Para induzir a formação de calos, foram testadas três concentrações de fitorreguladores. O ensaio experimental foi dividido em três tratamentos. O tratamento I foi composto por meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 1 $\mu$ M de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), 1  $\mu$ M ácido naftalenoacético (ANA), 5  $\mu$ M 6-Benziladenina ( BAP). O Tratamento II foi composto por meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 5  $\mu$ M de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), 5  $\mu$ M ácido naftalenoacético (ANA), 25 $\mu$ M 6-Benziladenina ( BAP). O Tratamento III foi composto por meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 10 $\mu$ M de ácido diclorofenoxiacético (2,4- D), 10  $\mu$ M ácido naftalenoacético (ANA), 50  $\mu$ M 6-Benziladenina ( BAP).

As anteras foram inoculadas em placa de Petri de 60 x 15 mm, lisa e estéril, contendo 10 ml de meio. As placas foram vedadas com filme de PVC, armazenadas no escuro em câmara de germinação tipo B.O.D., a uma temperatura de 28°C durante 60 dias.

Após o período de 60 dias de cultivo, foi avaliada a proliferação celular nas anteras por meio de características de tipos de calos, utilizando uma escala variando de zero a dois (0- nenhuma formação; 1-calo em estágio inicial de desenvolvimento; 2-calo em avançado estágio de desenvolvimento). Os tipos de calos seguiu o critério mostrado na figura 1.

Foram selecionados 90 botões florais, sendo 30 anteras por tratamento. Para o estudo da calogênese, foi adotado um esquema fatorial 3x3, sendo 3 tratamentos e 3 tipos de calos. Os ensaios experimentais foram compostos por 3 tratamentos (Tratamento I: 1 $\mu$ M de 2,4-D + 1  $\mu$ M de ANA + 5  $\mu$ M de BAP; Tratamento II: 5  $\mu$ M de 2,4-D + 5  $\mu$ M de ANA + 25 $\mu$ M de BAP; Tratamento III: 10 $\mu$ M de 2,4- D +10  $\mu$ M ANA + 50  $\mu$ M de BAP), cada tratamento com 3



repetições contendo 10 anteras. As anteras foram avaliadas através da formação de calos utilizando uma escala de 3 tipos (0- nenhuma formação; 1- calo em estágio inicial de desenvolvimento; 2- calo em avançado estágio de desenvolvimento). Cada repetição (placa de Petri) foi considerada uma unidade experimental para as análises de variância e teste comparativo de médias Tukey a 5% de probabilidade.

### **2.2.1 Material Biológico**

Pela manhã, foram coletadas de forma aleatória diversas inflorescências das plantas matrizes do acesso CNPAE 170 de pinhão-manso, provenientes do banco de germoplasma da Embrapa Agroenergia, estabelecido na área experimental da unidade Embrapa Cerrados, localizado em Planaltina- DF. O procedimento realizado foi citado no item 2.1.1.

### **2.2.2 Determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo**

Um novo ensaio experimental foi realizado utilizando o acesso 170 (atóxico). Foram selecionados somente os botões florais com tamanhos pré-estabelecidos no experimento anterior. Os botões florais foram fixados durante 24h por imersão em solução Carnoy 3:1 (etanol - ácido acético, respectivamente) e, posteriormente, transferidos para solução de etanol 70% e acondicionados em geladeira a 4 °C. Com auxílio de lupa os botões florais foram abertos e as anteras extraídas. Em seguida, foi realizada a medida das anteras para o preparo das lâminas. Após espalhamento das anteras, a lâmina foi coberta com lamínula e verificada no microscópio óptico Axiphot Zeiss para a presença de micrósporos no estágio de tétrade.

### **2.2.3 Desinfestação do material vegetal**

A assepsia dos botões florais foi realizada utilizando-se etanol 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) por 20 minutos e, em seguida, a remoção do resíduo com tríplice lavagem em água destilada, por 30 segundos cada. As anteras foram selecionadas por tamanho e presença do estádio de tétrade.

### **2.2.4 Meio de cultura para indução de calos**

Para induzir a formação de calos, foram testadas três concentrações de fitoreguladores. O ensaio experimental foi dividido em três tratamentos. O tratamento I foi composto por meio básico de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 1 $\mu$ M de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), 1 $\mu$ M ácido naftalenoacético (ANA), 5 $\mu$ M 6-Benziladenina (BAP). O Tratamento II foi composto por meio básico de MS, acrescido de 5 $\mu$ M de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), 5 $\mu$ M ácido naftalenoacético (ANA), 25 $\mu$ M 6-Benziladenina (BAP). O Tratamento III foi composto por meio básico de MS, acrescido de 10 $\mu$ M de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), 10 $\mu$ M ácido naftalenoacético (ANA), 50 $\mu$ M 6-Benziladenina (BAP).

As anteras foram inoculadas em placa de Petri de 60 x 15 mm, lisa e estéril, contendo 10 ml de meio. As placas foram vedadas com filme de PVC, armazenadas no escuro em câmara de germinação tipo B.O.D., a uma temperatura de 28°C durante 60 dias.

Após o período de 60 dias de cultivo, foi avaliada a proliferação celular nas anteras por meio de características de tipos de calos, utilizando uma escala variando de zero a dois (0- nenhuma formação; 1-calo em estádio inicial de

desenvolvimento; 2-calo em avançado estágio de desenvolvimento). Os tipos de calos seguiram o critério mostrado na figura 1.

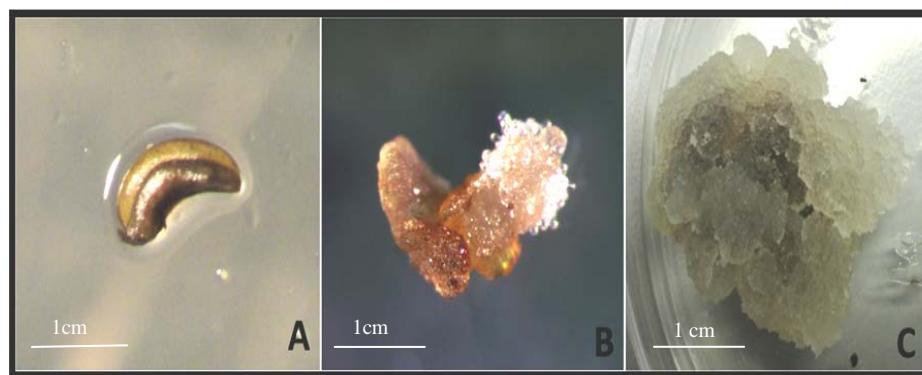


Figura 1 Tipos de calos obtidos após o cultivo minino de 60 dias em meio de indução

Nota: **A)** Tipo0: anteras com nenhuma formação de calo **B)** Calo primário tipo1: calo em estágio inicial de desenvolvimento. **C)** Calo primário tipo2 : calo em avançado estágio de desenvolvimento. Fotos tiradas com auxílio da lupa esterioscopia SV6 ( Modelo Stemi, Marca ZEISS).

Foram selecionados 90 botões florais, sendo 30 anteras por tratamento. Para o estudo da calogênese, foi adotado um esquema fatorial 3x3, sendo 3 tratamentos e 3 tipos de calos. Os ensaios experimentais foram compostos por 3 tratamentos (Tratamento I: 1 $\mu$ M de 2,4-D + 1 $\mu$ M de ANA + 5 $\mu$ M de BAP; Tratamento II: 5 $\mu$ M de 2,4-D + 5 $\mu$ M de ANA + 25 $\mu$ M de BAP; Tratamento III: 10 $\mu$ M de 2,4- D +10 $\mu$ M ANA + 50 $\mu$ M de BAP), cada tratamento com 3 repetições contendo 10 anteras. As anteras foram avaliadas por meio da formação de calos utilizando uma escala de 3 tipos (0- nenhuma formação; 1- calo em estágio inicial de desenvolvimento; 2- calo em avançado estágio de desenvolvimento). Cada repetição (placa de Petri) foi considerada uma unidade experimental para as análises de variância e teste comparativo de médias Tukey a 5% de probabilidade.

### **2.2.5 Análise estatística**

Em todos os experimentos realizados, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância, utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 2006). Foram utilizados três tratamentos compostos por 10 repetições para avaliar as anteras por meio da formação de calos utilizando uma escala de 3 tipos de calo (0 - nenhuma formação; 1-calo em estágio inicial de desenvolvimento; 2-calo em avançado estágio de desenvolvimento) em cada tratamento.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Associação entre o comprimento do botão floral e da antera e o estágio de desenvolvimento do micrósporo**

Em visualizações das lâminas feitas em microscópio óptico Axiphot Zeiss, foi observada que não houve sincronismo no estágio de desenvolvimento dos micrósporos de uma mesma antera (Figura 2). O tamanho e a aparência interna dos botões florais foram observados na figura 3. A análise microscópica mostrou-se micrósporos em estágio de tetrade em diferentes tamanho de botão floral. Foi encontrado com maior frequência o estágio de tetrade em anteras com 2,00 mm de comprimento (Figura 3E). Não foi possível identificar o estágio de tetrade em anteras com tamanho superior a 2,00 mm. Entretanto, não é indicado utilizar medida do botão floral para determinar o desenvolvimento de todos os estádios do micrósporo, em função da falta de sincronismo dentro das anteras de um mesmo botão floral, ou seja, em botões florais do mesmo tamanho podem ser encontradas anteras em estágio diferentes de desenvolvimento.

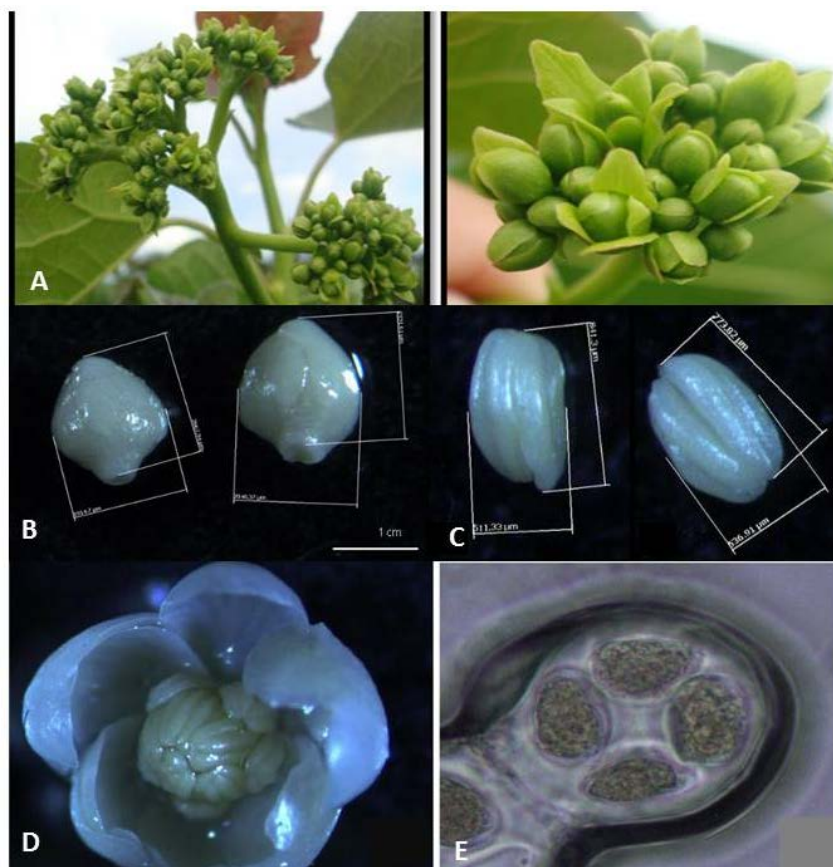


Figura 2 Inflorescência do Banco de germoplasma de pinhão-mansô

Fonte: Embrapa Cerrados (2012).

Nota: **A)** Botões florais em diversos tamanhos. **B)** Medidas dos botões florais antes da excisão das anteras. **C)** Anteras com diferentes tamanhos. **D)** Botão floral aberto evidenciando as anteras em seu interior. **E)** Microspóro em estágio de tetrade.

Contudo, o comprimento da antera permitiu identificar a fase dos micrósporos em estágio de tetrade. A percentagem de micrósporos em estágio de tetrade variou de 87% a 60% quando analisados os botões florais de comprimento entre 1,5 e 2,00 mm e anteras com 657 a 811  $\mu\text{m}$  de comprimento (Tabela 1). O acesso CNPAE-170 observou-se o maior número de anteras em

estádio de tetrade. Estudos feitos com maracujazeiro-amarelo, realizados por Souza et al. (1996), mostraram que houve associação entre o tamanho dos botões florais e o tamanho das anteras com o desenvolvimento de micrósporos dos acessos testados. Entretanto, Lauxen et al. (2003) constataram a falta de sincronismo entre as anteras de um mesmo botão floral, testando três cultivares de soja. Corroborando os resultados encontrados por Souza, Pereira e Martins (2002), que também encontraram a falta de sincronismo entre o tamanho do botão floral e o comprimento da antera do maracujazeiro. A falta de sincronismo dificulta uma fixação do tamanho exato do botão floral a fim de obter os micrósporos na etapa de tetrade.

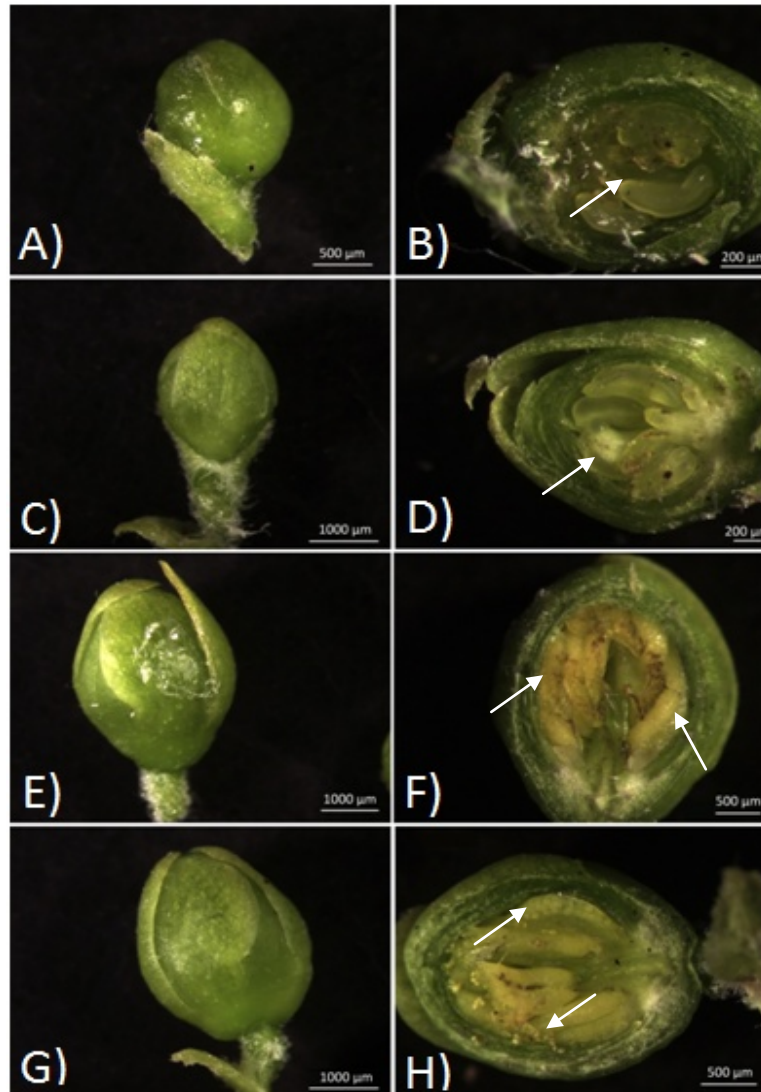


Figura 3 Imagens de flores de pinhão-mansó em diferentes etapas de desenvolvimento obtidas a partir de microscopia óptica

Nota: A) Flor fechada com 1,5 mm de tamanho. B) Nesse estágio, botão floral apresenta anteras com uma coloração verde. C) Flor fechada com 2,0 mm de tamanho. D) Nesse estágio, o botão floral apresentou com anteras em verde mais escuro e contém micrósporos no estágio de tetrade. E) Flor fechada com 2,5 mm de tamanho. F) Nesse estágio, o botão floral apresenta anteras com micrósporos amarelos. G) Flor fechada com 3,0 mm de tamanho. H) Nesse estágio, o botão floral apresenta anteras com grãos de pólen.



Tabela 1 Percentagem de anteras de pinhão manso em estágio de tétrades analisadas em botões florais com comprimentos entre 1,5 a 2,0mm e com anteras de aproximadamente com 800 $\mu$ m.

Génotipos	Percentagem de anteras em estágio de tétrade
170	87
107	80
167	60
182	60
258	60

### 3.2 Indução de calos em anteras

Ao final dos 60 dias de cultivo em meio de indução em condições de escuro, as anteras foram avaliadas para tipos de calos que originaram. Na análise de variância (Tabela 2), para o calo tipo 0 e calo tipo 1, foi observadas diferença significativas em nível de 1% de probabilidade entre os acessos, indicando uma relação entre o acesso e a capacidade de indução das anteras. Para os calos primários tipo 2, não houve diferença significativa em nível de 1% de probabilidade entre os tratamentos. O calo primário tipo 2 possui aspecto compacto, aquoso, esbranquiçado, com crescimento desordenado e excessivo, e este, é o calo de interesse para o estudo. No teste comparativo (Tabela 3), analisando os calos primário tipo 0 e calo primário tipo 1, o acesso CNPAE-170 diferiu estatisticamente dos demais acessos. Já para a indução do calo tipo 2, não houve diferença estatística nos acessos estudados. No acesso CNPAE-170 foi observado os melhores resultados de indução para calos primário tipo 1 e menor índice de anteras sem indução de calos. Devido à baixa eficiência na formação de brotos, uma hipótese a ser relatada pode ter sido a concentração de fitorreguladores, pois o protocolo utilizado não foi específico para indução de

calos em pinhão-manso e sim de para Neem, que é uma espécie lenhosa e perene. A partir dos resultados obtidos um novo ensaio experimental foi realizado, testando novas concentrações de fitorreguladores a fim de obter melhores resultados na indução de calos do acesso CNPAE-170.

Tabela 2 Números de calos produzidos em resposta ao tratamento (acessos) com o tipo de calos originados

F. V	GL	Quadrado Médio		
		Calos tipo 0	Calos tipo 1	Calos tipo 2
<b>Tratamento</b>	4	459,80 **	460,53 **	0,076 <sup>ns</sup>
<b>Resíduo</b>	145	51,31	50,73	0,143
<b>Média Geral</b>		11,82	8,06	0,11
<b>C.V (%)</b>		60,56	88,30	333,91

\*, \*\* significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, <sup>ns</sup> não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 3 Comparação de cinco acessos ( CNPAE 107, CNPAE 167, CNPAE 170, CNPAE 182 E CNPAE 258) de pinhão-manso para o número de calos originados para cada tipo

Acessos	Tipos de calos		
	0	1	2
107	12,6a	7,3b	0,1a
167	13,6a	6,3b	0,3a
170	4,9b	15,0a	0,1a
182	13,9a	5,9b	0,2a
258	14,1a	5,8b	0,1a

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si.

### 3.3 Indução de calos em anteras do acesso CNPAE-170

Foi observado diferenças na indução de calos para as concentrações testadas. Na ANOVA, houve diferença estatística em nível de 1% de probabilidade para os calos tipo e tipo1, para o calo tipo 2 não houve diferença significativa (Tabela 4). Para o calo primário tipo 1 do acesso CNPAE-170 a média de indução foi de 3,63 anteras por placa. Este resultado esta relacionado com o tipo de tratamento utilizado. No teste comparativo (Tabela 5), o Tratamento I ( 1 $\mu$ M de 2,4-D + 1 $\mu$ M de ANA + 5 $\mu$ M de BAP) e o Tratamento II (5 $\mu$ M de 2,4-D + 5 $\mu$ M de ANA + 25 $\mu$ M de BAP) não diferiram estatisticamente para a indução de calos para os três tipos. O tratamento III (10 $\mu$ M de 2,4- D +10 $\mu$ M ANA + 50  $\mu$ M de BAP) houve maior número de calos tipo 0 e menor indução de calo primário tipo 1 (Tabela 5). No teste de médias ficou evidente que a indução de calos foi influenciada pela concentração do fitorregulador utilizado no meio de cultura. Conforme foi observado no Tratamento III, altas concentrações de reguladores resultaram em maiores números de anteras sem indução e não apresentando resultados com a indução de calos primários tipo 2 (Tabela 5). Os tratamentos I e II foram os mais responsivos para indução de calos primários tipo 1 e tipo 2. Chatuverdi, Razdan e Bhojwani (2003) obtiveram 100% de indução de calos em anteras de Neem, utilizando o meio MS suplementado com 1 $\mu$ M 2,4D, 1 $\mu$ M ANA e 5 $\mu$ M de BAP. Já para pinhão-manso, essas concentrações para os acessos testados não resultaram em altas taxas de indução. Após a transferência das anteras para o meio de multiplicação verificou-se que os calos apresentaram oxidação. Portanto, novos estudos devem ser realizados para a otimização da indução de calos a partir de anteras para posterior regeneração de plantas haplóides.

Tabela 4 Análise de variância entre os números de tipos de calos produzidos em resposta as tratamentos testados (concentrações de fitorreguladores)

F. V	GL	Quadrado Médio		
		Calo tipo 0	Calo tipo 1	Calo tipo 2
Tratamento	2	205,87**	191,87**	0,290 <sup>ns</sup>
Resíduo	87	10,70	10,53	0,109
Média Geral		6,25	3,64	0,101
C.V (%)		52,30	89,07	326,98

\*, \*\* significativo a 5 e 1% de probabilidade respectivamente, <sup>ns</sup> não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 5 Comparação entre as médias do número de tipos de calos obtidos em resposta aos tratamentos testados (concentrações de fitorreguladores)

Concentração	Tipos de calos/ anteras		
	0	1	2
Tratamento I	5,0b	4,9a	0,1a
Tratamento II	4,5b	5,3a	0,2a
Tratamento III	9,3a	0,73b	0,0a

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si.

#### **4 CONCLUSÃO**

O tamanho do botão floral com comprimento entre 1,5 e 2,00 mm e anteras com 657 a 811  $\mu\text{m}$  de comprimento apresenta maior números de anteras em estágio de tétrade.

O Acesso CNPAE-170 apresenta o maior número de anteras com calo tipo 1, isto é, calo em estágio inicial de desenvolvimento.

O Tratamento III contendo 10 $\mu\text{M}$  de 2,4- D +10  $\mu\text{M}$  ANA + 50  $\mu\text{M}$  de BAP, há maior número de anteras sem formação de calos e a menor indução de calo primário tipo 1(em estágio inicial de desenvolvimento) e calo primário tipo 2 ( em avanço estágio de desenvolvimento).

## REFERÊNCIAS

BOBROWSSKI, V. L. et al. Efeitos de meios de cultura na formação de calos a partir de anteras de aspargos (*Asparagus officinalis* L.). **Acta Botanica Brasília**, Porto Alegre, v. 9, n. 1, p. 17-23, jul. 1995.

BULLOCK, W. D. et al. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F1's and their reciprocal crosses. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 62, p. 155-159, 1982.

CAETANO, V. R.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Interdisciplinaridade no CNPT/EMBRAPA: estudos que culminaram com o lançamento, por meio de métodos biotecnológicos, do trigo BR-43. In: ENCONTRO DE GENETICISTAS DO RIO GRANDE DO SUL, 8., 1992, São Leopoldo. **Anais...** São Leopoldo: SBG, 1992. p. 15-19.

CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M. K.; BHOJWANI, S. S. Production of haploids of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by anther culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 6, p. 531-537, Feb. 2003.

CHU, C. C. Haploids in plant improvement. In: VASIL, I. K.; SCOWCROFT, W. R.; FREY, K. J. (Ed.). **Plant improvement and somatic cell genetics**. New York: Academic, 1982. p. 129-158.

CHU, C. C. et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen-sources. **Scientia Sinica**, Taipei, v. 18, p. 659-668, 1975.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: estatística experimental e matrizes**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 285 p.

DIAS, L. A. S. et al. **Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. Viçosa, MG: UFV, 2007. v. 1, 40 p.

FENG, X. R.; WORLY, D. J. High frequency of haploid embryos in asparagus anther culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, n. 11, p. 281-285, Nov. 1991.

FIALHO, J. S. et al. Desenvolvimento de metodologia para obtenção de haloploides de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) via cultura de anteras. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 2, p. 195-202, maio/ago. 2005.

GUHA, S.; MAHESHWARI, S. C. *In Vitro* production of embryos from anthers of datura. **Nature**, London, v. 204, p. 497, 1964.

HE, D. G.; OUYANG, J. W. Calli and planted formation from cultured wheat anthers at different development stages. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 33, p. 71-79, 1984.

LAUXEN, M. S. et al. Association between floral bud size and developmental stage in soybean microspores. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 4, p. 515-520, July/Aug. 2003.

LUZ, J. M. Q. et al. Relação entre microsporogênese e tamanho do botão floral em pimentão (*Capsicum annum* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 385-388, maio/jun. 1995.

MCKONE, M. M.; HALPERN, S. L. The evolution of androgenesis. **The American Naturalist**, Chicago, v. 161, n. 4, p. 641-656, 2003.

MILANI, M.; CARVALHO, J. M. F. C. **Utilização de cultura de anteras no melhoramento de planta**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2005. 26 p. (Documentos, 145).

MORAES-FERNANDES, M. I. B. et al. Haploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 613-650.

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

OUYANG, Y. W. et al. The response of anther culture to culture temperature varies with growth conditions of anther donor plants. **Plant Science**, Shannon, v. 49, p. 145-148, 1987.

OUYANG, J. W.; ZHOU, S. M.; JIA, S. E. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 66, p. 101-109, 1983.

SANTOS, E. K.; ZANETTINI, M. H. B. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 163-175, jan./fev. 2002.

SOUZA, F. V. D. et al. Micropropagação. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução a micropropagação de plantas**. Salvador: EMBRAPA, 2006. p. 38-52.

SOPORY, S. K.; JACOBSEN, E.; WENZEL, G. Production of monohaploid embryoids and plantlets in culture anthers of *Solanum tuberosum*. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 12, p. 47-54, 1978.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Revista Ciência Agropecuária**, Fortaleza, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, nov./dez. 2002.

VASIL, I. K.; NITSCH, C. Experimental production of pollen haploids and their uses. **Zeitschrift für Pflanzenzüchtung**, Hamburg, v. 76, p. 191-212, 1975.

WANG, P.; CHEN, Y. R. Effects of growth conditions of anther-donor plants on the production of pollen plants in wheat anther culture. **Acta Genetica Sinica**, Beijing, v. 7, p. 64-71, 1980.

ZHOU, H.; BALL, S. T.; KONZAK, C. F. Functional properties of Ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 77-83, Mar. 1992.



## **CAPÍTULO 4 Considerações Gerais**

Este trabalho relatou estudos de organogênese de segmentos cotiledonares e calogênese de anteras, onde a origem, idade do explante, os acessos utilizados e o meio de cultura, dentre outros fatores foram avaliados quanto à resposta para a cultura de pinhão-manso. Embora os resultados apresentados mostrassem uma evolução, novos trabalhos devem ser realizados com o intuito de avaliar outras características, no estabelecimento de um protocolo eficiente para cultura de anteras e de organogênese de pinhão-manso. Dentre estas características estudadas o tempo de germinação do explante, onde foram comparados 5 dias e 10 dias, observou-se que explante com 5 dias são capazes de induzir calos. Entretanto, para a organogênese alguns acessos resultam em maiores números de plantas regeneradas utilizando explantes com 10 dias de germinação, pois a planta está mais desenvolvida. Novos testes deverão ser realizados para aumentar o número de plantas com raiz. Um grande passo foi dado para originar um protocolo eficiente de culturas de anteras de pinhão-manso, pois o experimento realizado estabeleceu o tamanho do botão floral e das anteras, na qual, existe a maior possibilidade de encontrar micrósporos em estádios de tétrades. Novos testes de concentrações de fitoreguladores devem ser realizados, pois as auxinas 2,4-D e ANA acima de 10 $\mu$ M e a citocinina BAP acima de 50  $\mu$ M inibiram a formação de calos primários tipo 2 em anteras. Por fim, a otimização dos protocolos de organogênese e calogênese e sua eficiência serão essenciais para a produção de mudas em larga escala.

Contudo, após a obtenção de clones por meio de organogênese de segmentos cotiledonares, ou plantas homozigotas por meio da cultura de anteras, a aclimatização das plantas é considerada uma das etapas mais críticas, pois a planta é submetida ao estado autotrófico para a retomada normal do

crescimento. Para tanto, a formulação de novos substratos para o pleno estabelecimento destas plantas devem ser testados e desenvolvidos.