

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA

MAGDA LAIARA BEZERRA DE LIMA

ORGANOGENESE *in vitro* EM *Jatropha curcas* L.

FORTALEZA – CE
2013

MAGDA LAIARA BEZERRA DE LIMA

ORGANOGENESE *in vitro* EM *Jatropha curcas* L.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia.

Área de concentração: Fisiologia, Bioquímica e Biotecnologia Vegetal.

Orientador: Prof. Francisco de Assis de Paiva Campos.

FORTALEZA – CE
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- L699o Lima, Magda Laiara Bezerra de.
 Organogênese *in vitro* em *Jatropha curcas* L. / Magda Laiara Bezerra de Lima. – 2013.
 81f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,
 Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia /Fitotecnia, Fortaleza, 2013.
 Área de Concentração: Fisiologia, Bioquímica e Biotecnologia Vegetal.
 Orientação: Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos.
1. Pinhão manso – propagação *in vitro*. 2. Organogênese. I. Título.

CDD 631.4

MAGDA LAIARA BEZERRA DE LIMA

ORGANOGENESE *in vitro* EM *Jatropha curcas* L.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia. Área de concentração: Fisiologia, Bioquímica e Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Francisco de Assis de Paiva Campos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Prof^a. Arlete Aparecida Soares
Universidade Federal do Ceará
Departamento de Biologia

Prof^a. Cristina Paiva da Silveira Carvalho
Universidade Federal do Ceará
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

A Deus

Minha vida, Fonte de sabedoria e amor,
Apoio nos momentos mais difíceis e sabedoria nas
escolhas.

OFEREÇO

À minha mãe **Antonia Bezerra**, meu pai **Osman
Carvalho**, aos meus irmãos **Porfirio e Michael
Lima** e minha sobrinha **Mariana Lima**, meus
eternos amores.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por todas conquistas, proteção e amor.

À **minha família**, pela confiança, compreensão e carinho empregados na realização do meu sonho. Por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis, sem o apoio de vocês tudo seria bem mais complicado. Amo a todos vocês.

Ao meu orientador **Profº Francisco de Assis de Paiva Campos** pelos ensinamentos, pela confiança, paciência e pela oportunidade de concluir uma das etapas de minha vida acadêmica. Muito obrigada!

As professoras **Drª Cristina Paiva** e **Drª Arlete Soares** pela dedicação e auxílio na conclusão do meu trabalho.

Ao curso de **Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia** da Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – **CAPES**, pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho.

As minhas grandes amigas e irmãs de coração conquistadas ao longo desse tempo **Viviane Ruppenthal, Tatiana Silva, Aline Madeira** e **Amanda de Paula** meu muito obrigada pela paciência, dedicação, carinho e bons momentos proporcionados.

Aos meus amigos do Bioplant **Emanoella (Manuzinha), Verônica (Vevezinha), Camila (Camilinha), Fabiano, Woshington, Mohib, Roberto, Ícaro, Derick** e **Antonio**. Agradeço imensamente pelos conhecimentos, paciência e carinho dedicados ao longo de todo esse tempo.

Aos amigos da Pós graduação em Fitotecnia **Francelino, Karina, Wanderlucia, Ramom, Tiago, Livia, Bruno, Lineker, Maria Lucilânia** e aos demais que direta ou indiretamente estiveram presentes ao longo de todo o tempo, me apoiando e compartilhando todos os momentos.

Aos meus amigos que estão distantes **Nayara, Elquilândia, Sandra, Gemes** e a todos os demais, todos estão presentes no meu dia-a-dia. Muito obrigada, pois fizeram da distância apenas um detalhe.

As minhas amigas de graduação **Aliny, Júlia, Déborah** e **Liberdade**, pessoas que levarei no meu coração sempre.

Gostaria de agradecer imensamente a minha primeira professora **Raimunda Vaz Magalhães**, responsável por muito do que sou hoje e também até onde cheguei. Muito obrigada.

RESUMO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é considerado uma fonte potencial para a produção de biocombustíveis, tendo por base a alta produtividade e qualidade do óleo extraído de suas sementes. Entretanto, seu uso é inviabilizado para alimentação humana e animal devido à presença de fatores antinutricionais como a curcina e, em especial, os ésteres de forbol. A utilização de ferramentas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, pode vir a minimizar ou solucionar essas limitações. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi propagar *in vitro* plantas inteiras via cultivo de ápices caulinares obtidos a partir de sementes de pinhão manso germinadas *in vivo* e *in vitro*; determinar a reprodutibilidade de um protocolo de regeneração disponível na literatura e definir, através de estudos histológicos, a origem da planta regenerada *in vitro*. Para a propagação *in vitro* utilizou-se ápices caulinares, como explantes, que foram colocados em meio MS suplementado com as citocininas BAP (6-benzilaminoprina), KIN (cinetina) e 2-iP (2-isopenteniladenina) na concentração de 2,0 mg.L⁻¹. O BAP apresentou os melhores resultados no desenvolvimento dos ápices caulinares. Este e a giberelina foram utilizados juntos no mesmo meio ou separados, para a indução do alongamento dos mesmos. O ácido indol-3-butírico (AIB) foi usado para o enraizamento. A suplementação do meio de cultura com BAP foi eficiente no desenvolvimento dos ápices caulinares e o alongamento apresentou êxito com o uso do GA₃ individualmente. O enraizamento com o AIB foi conseguido. A fim de determinar a reprodutibilidade do protocolo de organogênese, cotilédones de sementes de pinhão manso germinadas *in vitro* foram colocados em meio MS suplementado com BAP e AIB para a indução da formação de partes aéreas, estas foram alongadas com BAP e enraizadas com AIB. Além disso, os explantes cotiledonares foram colocados com a face abaxial e adaxial em contato com o meio de cultivo a fim de estabelecer a melhor posição do mesmo na regeneração *in vitro*. Plantas inteiras de *J. curcas* L. foram obtidas a partir da utilização do protocolo testado. A melhor posição do segmento cotiledonar foi a face adaxial em contato com o meio, onde 56% dos explantes formaram partes aéreas. A análise histológica foi feita com a coleta de explantes cotiledonares em intervalos sequenciais de 0, 5, 10, 15 e 25 dias de permanência do meio de regeneração. O estudo anatômico possibilitou o acompanhamento da organogênese do pinhão manso, no qual células parenquimáticas próximas à região adaxial do explante cotiledonar se dividiram e formaram as partes aéreas. Os dados obtidos nesse trabalho mostraram que ambos os protocolos utilizados, a partir de ápices caulinares e de explantes cotiledonares, foram eficientes no processo de regeneração; as análises histológicas sugerem que a regeneração ocorre via organogênese direta e possivelmente apresenta origem multicelular.

Palavras chave: Biocombustíveis. Regeneração. Histologia

ABSTRACT

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is considered a potential source for the biofuel production, because of its high productivity and oil quality extracted from the seeds. However, its use is unfeasible for human and animal food due to antinutritional factors like the curcin protein and specially the secondary metabolites – phorbol esters. The application of biotechnological tools, like tissue culture, can be used to overcome these limitations. In this context, the aim of this work was to propagate whole plants *in vitro* using shoot cultures obtained from physic nut seeds germinated *in vitro* and *in vivo*; to determine the reproducibility of a regeneration protocol available in the literature, and to define through histological studies, the origin of the regenerated plant *in vitro*. For the *in vitro* propagation, shoots were used as explants sources, which were placed on MS medium supplemented with the cytokinins BAP (6- benzylaminopurine), KIN (kinetin) e 2-iP (2- isopentenyl adenine), 2,0 mg.L⁻¹. BAP showed the best results in the development of the shoots. This regulator was used alone or in association with gibberelins for the elongation of the shoots. The indole-3-butyric-acid was used for the rooting. The supplementation of the medium culture with BAP was efficient in the development of the shoots and the elongation was superior with the use of GA₃ alone. The rooting was achieved with AIB. To determine the reproducibility of an organogenesis protocol, cotyledons from physic nut seeds germinated *in vitro* were placed on MS medium supplemented with BAP and AIB for the promotion of aerial which were elongated with BAP and rooting with AIB. The cotyledonary explants were placed with the abaxial and adaxial face in contact with the medium to establish the best position of it in the *in vitro* regeneration. Whole plants of *J. curcas* L. were obtained using the protocol tested. The best position of the cotyledonar segment was the adaxial face in contact with the medium, where 56% of the explants formed shoots. The histological analysis was made with cotyledonary explants collected in sequential intervals of 0, 5, 10, 15 e 25 days of permanency in the regeneration medium. The anatomical study allowed the accompaniment of the organogenesis in physic nut, where parenchymal cells next to the adaxial region of the cotyledonar explants were divided and formed the shoots. The data obtained from this work showed that both protocols used, from shoots tips and cotyledonar explants, were efficient in the regeneration process; the histological analysis suggests that regeneration occurs via direct organogenesis and possibly presents multicellular origin.

Keywords: Biofuels. Regeneration. Histology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características morfológicas de <i>Jatropha curcas</i> L.....	16
Figura 2 - Efeito das citocininas KIN (cinetina), BAP (6-benzilaminopurina) e 2-iP (2-isopenteniladenina) na concentração de 2 mg.L ⁻¹ , para a formação de partes aéreas de <i>Jatropha curcas</i> L. utilizando ápice caulinar como explante, por um período de 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	35
Figura 3 - Desenvolvimento de partes aéreas de <i>Jatropha curcas</i> L., após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> , regeneradas em meio MS com as seguintes suplementações: MS0 (com ausência de regulador de crescimento); 0,1 mg.L ⁻¹ BAP e 0,34 mg.L ⁻¹ GA ₃ (em associação no mesmo meio de cultivo); 0,1 mg.L ⁻¹ de BAP e 0,34 mg.L ⁻¹ de GA ₃	44
Figura 4 - Regeneração de plantas de <i>Jatropha curcas</i> L. a partir de ápice caulinar após quatro semanas de cultivo <i>in vitro</i>	46
Figura 5 - Características morfológicas das sementes e embriões das sementes de <i>Jatropha curcas</i> L.....	48
Figura 6 - Plantas de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) regeneradas a partir de ápice caulinar isolados de embriões de sementes maduras.....	50
Figura 7 - Relação existente entre o número médio de gemas formadas por explante em função das diferentes concentrações de BAP (mg.L ⁻¹), após 30 dias de cultivo, para a formação de partes aéreas de <i>J. curcas</i> L. (7 ≤ n ≤ 15).....	52
Figura 8 - Regeneração <i>in vitro</i> de plantas de <i>Jatropha curcas</i> L.....	55
Figura 9 - Relação entre a formação do número médio de gemas (A), comprimento médio do broto principal (cm) (B), comprimento médio da parte aérea (cm) (C) por explante em função das diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L ⁻¹), após 30 dias de cultivo, para a formação de partes aéreas de <i>Jatropha curcas</i> L.....	56
Figura 10 - Regeneração <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i> L. via organogênese.....	61
Figura 11 - Efeito da posição do explante cotiledonar sobre o percentual de regeneração de parte aérea de <i>Jatropha curcas</i> L. O asterisco (*) representa diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade. (abaxial n=138; adaxial n=150).....	64
Figura 12 - Secções transversais de cotilédones de <i>J. curcas</i> L. colocados em meio de regeneração de partes aéreas em estágios iniciais da organogênese direta.....	66
Figura 13 - Secções transversais de cotilédones de <i>J. curcas</i> L. colocados em meio de regeneração de partes aéreas em estágios avançados da organogênese direta...	68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características das partes aéreas formadas de *Jatropha curcas* L. a partir de ápice caulinar fazendo uso de diferentes tipos de citocininas, por um período de 30 dias de cultivo em ambiente controlado..... 37
- Tabela 2** - Efeito de diferentes concentrações de giberelina (GA_3) em associação com a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na formação de parte aérea de *J. curcas* L., por um período de 30 dias de cultivo em ambiente controlado..... 39
- Tabela 3** - Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) em associação com giberelina (GA_3) na formação de parte aérea de *J. curcas* L., por um período de 30 dias de cultivo em ambiente controlado..... 40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Aspectos agronômicos e botânicos do pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)	14
2.2 <i>Jatropha curcas</i> L.: fonte potencial para a produção de biodiesel	15
2.3 <i>Jatropha curcas</i> L. e suas limitações	17
2.4 Sistemas de propagação do pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)	18
2.4.1 Micropropagação de <i>Jatropha curcas</i> L.	19
2.4.1.1 Embriogênese somática.....	20
2.4.1.2 Organogênese	20
3. OBJETIVOS	24
3.1 Gerais	24
3.2 Específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Material vegetal	25
4.2 Regeneração <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i> L.	25
4.2.1 Propagação de pinhão manso <i>in vitro</i> via cultivo de ápices caulinares.....	25
4.2.1.1 Experimento I – Efeito de diferentes citocininas no desenvolvimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares de <i>J. curcas</i> L.....	26
4.2.1.1.1 Indução do desenvolvimento dos ápices caulinares.....	26
4.2.1.2 Experimento II – Efeito da associação de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA ₃) no desenvolvimento de ápices caulinares de <i>J. curcas</i> L.....	26
4.2.1.2.1 Indução do desenvolvimento dos ápices caulinares.....	26
4.2.1.3 Experimento III – Efeito do uso combinado e individual de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA ₃) no desenvolvimento de ápices caulinares de <i>J. curcas</i> L.....	27
4.2.1.3.1 Indução do desenvolvimento dos ápices caulinares.....	27
4.2.1.4 Experimento IV – Efeito do estágio de desenvolvimento das sementes utilizadas para o isolamento do embrião, fonte de explante, no desenvolvimento de ápices caulinares de <i>J. curcas</i> L.....	28
4.2.1.4.1 Obtenção, desinfestação e isolamento dos explantes.....	28
4.2.1.4.2 Indução do desenvolvimento dos ápices caulinares.....	28
4.2.1.4.3 Alongamento.....	29
4.2.1.4.4 Enraizamento	29
4.2.1.5 Experimento V – Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) no desenvolvimento de ápices caulinares provenientes de sementes maduras de <i>J. curcas</i> L.....	29
4.2.1.5.1 Obtenção, desinfestação e isolamento dos explantes.....	29
4.2.1.5.2 Indução de parte aérea.....	29
4.2.1.5.3 Alongamento.....	30
4.2.1.5.4 Multiplicação	30

4.2.1.5.5 Enraizamento	30
4.2.2 Organogênese <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i> L. a partir de explante cotiledonar.....	31
4.2.2.1 Obtenção, desinfestação e isolamento dos explantes.....	31
4.2.2.2 Indução da parte aérea	31
4.2.2.3 Alongamento.....	31
4.2.2.4 Enraizamento.....	31
4.2.2.5 Experimento I – Efeito da posição dos explantes cotiledonares no meio de cultivo, para a formação de plantas inteiras e análise histológica do processo de organogênese de <i>J. curcas</i> L.....	32
4.2.3 Análise histológica do processo organogênico de <i>J. curcas</i> L.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
5.1 – Propagação de pinhão manso <i>in vitro</i> via cultivo de ápices caulinares.....	34
5.1.1 Efeito de diferentes citocininas no desenvolvimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares de <i>J. curcas</i> L.	34
5.1.2 - Efeito da associação de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA ₃) no desenvolvimento de ápices caulinares de <i>J. curcas</i> L.	38
5.1.3 - Efeito do uso combinado e individual de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA ₃) no desenvolvimento de ápice caulinar de <i>J. curcas</i> L.....	43
5.1.4 - Efeito do estágio de desenvolvimento das sementes utilizadas para o isolamento do embrião, fonte de explante, no desenvolvimento de ápices caulinares de <i>J. curcas</i> L.....	47
5.1.5 - Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) no desenvolvimento de ápices caulinares provenientes de sementes maduras de <i>J. curcas</i> L.....	54
5.2 – Organogênese <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i> L. a partir de explante cotiledonar	59
5.2.1 Regeneração <i>in vitro</i>	59
5.2.1.1 Indução de parte aérea de <i>Jatropha curcas</i> L.....	60
5.2.1.2 Alongamento e enraizamento das partes aéreas de <i>Jatropha curcas</i> L.....	62
5.2.2 - Efeito da posição dos explantes cotiledonares no meio de cultivo, para a formação de plantas inteiras de <i>J. curcas</i> L.	63
5.3 Análise histológica da organogênese de <i>J. curcas</i> L.....	65
6. CONCLUSÃO.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

O aumento acelerado do uso de fontes não renováveis para a produção de energia causa sérios prejuízos ambientais. A fim de minimizar esses danos, o uso de fontes de energia renováveis como hidroeletricidade, energia eólica e a tradicional biomassa crescem a cada ano. Esta última diz respeito ao uso de espécies vegetais que podem ser processadas para fornecer um substituto para o óleo diesel derivado do petróleo. Por outro lado, a produção de plantas em larga escala e também a obtenção de mudas saudáveis são elementos importantes que visam implementar a produção de biodiesel.

Desse modo a regeneração *in vitro* de pinhão manso tem sido objeto de algumas pesquisas com essa espécie vegetal. De tal maneira que esses estudos buscam estabelecer eficientes protocolos de regeneração através da organogênese e da embriogênese somática que são as vias de regeneração utilizadas para tal fim e com isso utilizá-los nas pesquisas relacionadas à transformação genética. Diversos estudos relacionados à micropropagação *in vitro* dessa espécie vêm sendo realizados com a utilização de vários tipos de reguladores de crescimento (auxinas, citocininas e ácido giberélico) e também o uso de diferentes tipos de explantes.

A teoria da totipotencialidade afirma que a célula é autônoma, portanto, que contém o potencial necessário para originar um organismo completo; nesse caso, uma planta completa (CID, 2001). Ao utilizar esse princípio, a cultura de tecidos vegetais é tida como uma ferramenta básica para os processos biotecnológicos. De modo que, existem três fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro*: o genótipo, a fonte de explante e a condição da cultura (ANDRADE, 2002), uma combinação eficiente desses fatores implica no sucesso da propagação *in vitro* de uma planta.

No Brasil, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), espécie pertencente à família Euphorbiaceae surge como alternativa de matéria-prima, baseando-se na expectativa de que a planta possui alta produtividade de óleo e tem baixo custo de produção, por ser perene e extremamente resistente ao estresse hídrico (SATURNINO et al., 2005). No entanto, existem limitações quanto ao não uso dos resíduos provenientes da extração do óleo para a alimentação animal, devido à presença de substâncias tóxicas como a curcina e principalmente os estéres de

forbol, além disso, a ineficácia dos sistemas propagativos geram preocupações relacionadas à propagação em massa do pinhão manso. Muitas dessas limitações podem ser superadas através de pesquisas na área da biotecnologia e engenharia genética (CEASAR e IGNACIMUTHU, 2011).

Khemkladngoen et al. (2011) desenvolveram um protocolo de regeneração para o pinhão manso a partir de explantes cotiledonares. Esses autores obtiveram aproximadamente 78% de frequência de regeneração ao utilizarem a combinação entre a auxina AIB (ácido indolbutírico) e a citocinina BAP (6-benzilaminopurina) possibilitando a regeneração de plantas inteiras. No entanto, não é sabido se a aplicação deste protocolo na regeneração dessa espécie nos genótipos disponíveis na região Nordeste brasileira é eficiente. Além disso, seria de grande valia a determinação dos exatos locais, no explante cotiledonar, onde a organogênese se inicia. Este conhecimento trará benefícios para os estudos relacionados ao estabelecimento de estratégias para a transformação genética dos genótipos locais de pinhão manso.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos agronômicos e botânicos do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), pertence à família Euphorbiaceae que se destaca como uma das maiores, em número de espécies (SÁTIRO e ROQUE, 2008). Segundo Heller (1996) tem sido proposto que essa espécie originou-se nas Américas, muito embora, não se sabe ao certo a verdadeira origem dessa planta.

Segundo Arruda et al., (2004) o pinhão manso é uma planta de porte arbustivo, de crescimento rápido, cuja altura normal é de dois a três metros, mas pode alcançar até cinco metros em condições especiais. Estes mesmos autores afirmam que o pinhão manso tem sido considerado uma opção agrícola para o Nordeste brasileiro por ser uma fonte de biodiesel e por ser uma espécie rústica, exigente quanto à intensidade luminosa e com forte resistência à seca. Além disso, de acordo com Alves et. al., (2008) plantas de pinhão manso têm sido cultivadas visando o controle de erosão, recuperação de áreas degradadas e contenção de encostas e dunas. A produção dos frutos dessa cultura se dá entre o primeiro e o segundo ano de desenvolvimento. Essa produção estabiliza-se, aproximadamente, no quarto ano permanecendo por até quarenta anos (SUJATHA et al., 2005), mas esse efeito só pode ser alcançado com a manutenção de um manejo de solo, precipitação e irrigações favoráveis ao desenvolvimento da planta. A utilização de adubos verdes simultaneamente ao cultivo do pinhão manso disponibiliza nutrientes por meio da reciclagem e fixação biológica do nitrogênio, além de promover a conservação do solo (CASTRO et al., 2008). Nesse sentido, Campos (2009) ao trabalhar com aplicação de resíduos orgânicos, corretivos e fertilizantes naturais concluiu que os resíduos orgânicos na forma de cama de ovinos quando aplicados ao solo favorecem o desenvolvimento fenológico e de produção das plântulas da cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), com destaque para a altura das plântulas.

De acordo com Farias (2008) as folhas da planta pinhão-manso são de coloração verde, esparsas e brilhantes, alternadas e ditas como largas, pecioladas e em forma de palma, com três a cinco lóbulos, e ainda apresentam nervuras

esbranquiçadas (Figura 1A). Suas flores são unissexuais, sendo as flores masculinas, em número maior alojadas nas extremidades das ramificações, já as femininas, nas ramificações em geral. A floração desta cultura é descontínua, com frutos na mesma inflorescência de idades e níveis de deiscência diferentes dificultando assim a colheita mecânica (ALVES et al., 2008). A inflorescência é axilar paniculada formada terminalmente sobre as ramificações (DIVAKARA et al., 2010) (Figura 1C).

O fruto do pinhão manso é capsular ovóide e trilocular, com uma semente em cada cavidade, tendo um pericarpo e/ou uma casca dura e lenhosa. Inicialmente, apresenta-se de coloração verde passando a amarelo, castanho e, por fim, preto, quando atinge o seu estado de maturação (FARIAS, 2008) (Figura 1B). Cada planta de pinhão manso produz em média quatro quilos de semente por ano, quando cultivadas em condições ideais (PARAWIRAA, 2010) sendo que, o período produtivo varia de 30 a 50 anos (TAMALAMPUNDI et al., 2008).

A semente de *J. curcas* L., parte principal usada para a produção de biocombustível, é relativamente grande; quando seca mede de 1,5 a 2 cm de comprimento e 1,0 a 1,3 cm de largura; tegumento externo rígido, quebradiço, de fratura resinosa (Figura 1D). Abaixo do involúcro da semente existe uma película branca cobrindo a amêndoa; endosperma esbranquiçado, oleaginoso, contendo o embrião provido de dois largos cotilédones achatados (ARRUDA et al., 2004) (Figura 1E). As sementes de pinhão manso são ortodoxas (HELLER, 1996), ou seja, suportam desidratação a baixos níveis de umidade e também o armazenamento em ambientes com baixas temperaturas. Segundo Martinez-Herrera et al., (2006) a composição química de sementes de *J. curcas* L. coletadas em diferentes regiões do México é de 31- 35% de proteína bruta, 55 – 58% de lipídeos, 3,9 a 4,5% de conteúdo de fibra, e 6% de açúcar solúvel total.

2.2 *Jatropha curcas* L.: fonte potencial para a produção de biodiesel

Os combustíveis oriundos da biomassa, como o biodiesel e o álcool, com capacidade de substituir parte dos combustíveis veiculares, constituem outra inserção energética na Era do Petróleo (MOTHÉ et al., 2005). O biodiesel é fabricado através de transesterificação, em que a glicerina é separada da gordura ou óleo vegetal. O processo gera dois produtos: ésteres de ácidos graxos (o nome

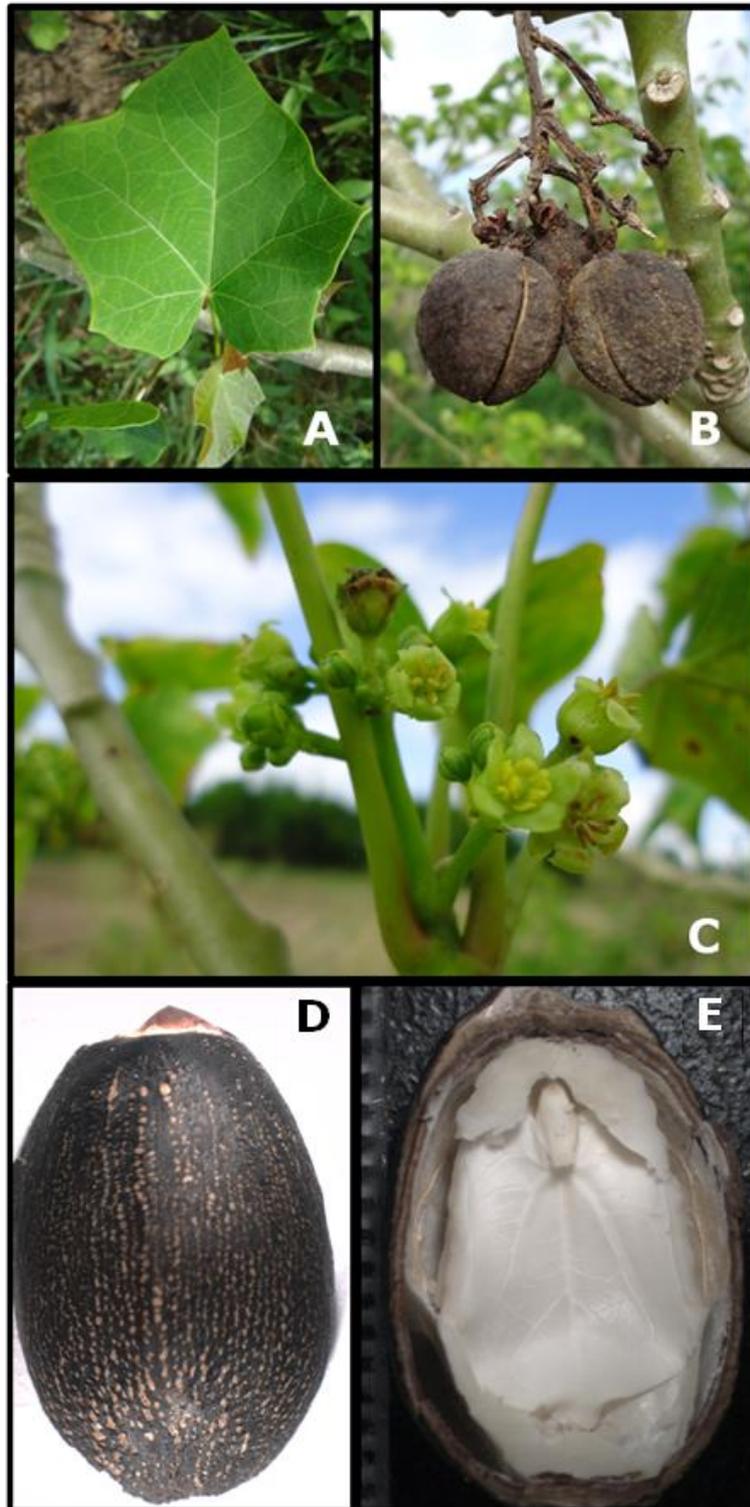


Figura 1 – Características morfológicas de *Jatropha curcas* L. **(A)** - Folha; **(B)** – Fruto; **(C)** - Inflorescência; **(D)** – Vista do tegumento externo da semente madura e **(E)** – Vista interna da semente com exposição do embrião.

químico do biodiesel) e glicerina (produto valorizado no mercado de sabões); além de coprodutos (torta, farelo etc.) que podem constituir outras fontes de renda importantes para os produtores (ABDALLA et al., 2008).

Atualmente existe uma série de pesquisas voltadas para o estudo de fontes e métodos que possibilitem o uso dos biocombustíveis. É grande a diversidade de oleaginosas aptas a serem utilizadas como fonte de matéria-prima promissora para a fabricação desse produto, tais como: amendoim (*Arachis hypogaea*), soja (*Glycine max*), girassol (*Helianthus annuus*), mamona (*Ricinus communis* L.) e o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).

No pinhão manso, o óleo presente nas sementes tem tido grande visibilidade comercial, tendo em vista seu potencial para a produção de biodiesel. As sementes dessa espécie contêm 40-60% de óleo, aproximadamente. Os ácidos graxos saturados constituem 20% do óleo, e o percentual restante são de ácidos graxos insaturados. O ácido oléico é o mais abundante (44,8%) seguido do linoléico (34%), palmítico (12,8%) e o esteárico (7,3%), aproximadamente (SHAH et al., 2004).

O biodiesel feito através do óleo extraído das sementes de pinhão manso, tanto pelas rotas metílica e etílica, apresentou características físico-químicas compatíveis com a Resolução 42 da Agência Nacional de Petróleo (ANP), que visa implementar a política nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis (ARAÚJO, et al., 2008). Adicionalmente, o óleo processado pode vir a ser utilizado diretamente em motores a diesel, desde que a máquina sofra pequenas modificações ou a utilização do óleo pode ser feita após a mistura desse óleo diesel convencional (PARAWIRAA, 2010). Economicamente, a produção de biodiesel a partir de *J. curcas* L. é lucrativa, desde que os subprodutos oriundos da extração do óleo dessa planta também sejam comercializados (Berchmans e Hirata, 2008).

2.3 *Jatropha curcas* L. e suas limitações

Haja vista a grande importância da cultura do pinhão manso na produção de biodiesel aumenta a cada dia o interesse nos estudos dessa planta, visando à seleção de cultivares que propiciem aumento na produção e que possibilitem a comercialização de seus subprodutos, já que esses tem grande potencial no fornecimento de nutrientes essenciais. A presença de substâncias tóxicas inviabiliza

a utilização do óleo e da torta na alimentação humana e animal (MAKKAR et al., 1998; SHAH et al., 2004). Nesse sentido Beltrão (2006), alerta que não se conhece quase nada da bioquímica e da fisiologia desta planta, não existem cultivares definidas e alguns aspectos agronômicos ainda carecem de investigação.

As sementes de *J. curcas* L. possuem vários outros componentes tóxicos. Muito embora a toxicidade seja atribuída à presença dos ésteres de forbol (diterpeneo) e uma RIP (proteína inativadora de ribossomos) (curcina) (King et al., 2009). No entanto, variedades de pinhão manso que existem unicamente no México são consideradas não tóxicas, e são utilizadas na produção de biocombustível e na alimentação animal (OPENSHAW, 2000).

2.4 Sistemas de propagação do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)

A cultura do pinhão manso é propagada principalmente por sementes obtidas a partir de plantas matrizes selecionadas e através da propagação vegetativa, (DRUMOND et al., 2007). A via clonal ou vegetativa se estabelece por estaquia, micropropagação e enxertia (SATURNINO et al., 2005).

A utilização da estaquia em pinhão manso resulta em crescimento rápido da planta, e espera-se que o início da produção de frutos ocorra um ano após o plantio. Entretanto, a viabilidade da propagação comercial de mudas por estaquia depende da capacidade de enraizamento de cada espécie e da qualidade do sistema radicial formado, a fim de proporcionar um melhor desenvolvimento da planta (NEVES et al., 2005). Vale ressaltar que existem desvantagens em relação à produção de mudas através da estaquia, dentre elas tem-se que há uma necessidade de grande volume propagativo quando se objetiva a produção em escala comercial. Nesse sentido, Sujatha et al., (2005) relatam que a macropropagação de pinhão manso através de cortes de hastes é possível, mas os rendimentos de sementes são baixos e as plantas estabelecidas são facilmente arrancadas por apresentarem raízes superficiais.

Segundo Alves et al., (2008) o desenvolvimento das plantas originadas de sementes ou de estacas é diferenciado. Por propagação vegetativa, utilizando-se estacas, obtém-se maior precocidade de produção e as características da planta mãe se reproduzem com maior fidelidade, verifica-se, portanto, menor desenvolvimento vegetativo inicial. Por outro lado, plantas estabelecidas a partir de

sementes apresentam maior variabilidade em relação à planta mãe, e apresentam-se mais vigorosas, ainda que iniciem a produção mais tarde. Neves et al., (2009) dizem que aliada à expansão da cultura do pinhão-manso nos últimos anos, a comercialização de sementes desta oleaginosa está sendo feita de forma desordenada, sem fiscalização e sem testes que visem a determinação da sua qualidade fitossanitária. Segundo os autores, esse fato faz com que haja o risco de disseminação de fitopatógenos para diferentes áreas produtoras e a distribuição de sementes com baixo poder de germinação, o que resulta em prejuízos para os produtores. Além disso, de acordo com Nunes (2007), a desvantagem da propagação via sementes é o fato da espécie apresentar grande índice de polinização cruzada, pois é este fator que determina alta variabilidade genética nos cultivos seminais.

Atentando a esses fatos é clara a necessidade de estudos envolvendo a utilização de métodos de propagação dessa cultura que visem reduzir qualquer problemática relacionada à produção em larga escala de mudas de pinhão manso.

2.4.1 Micropropagação de *Jatropha curcas* L.

A produção e comercialização em larga escala exigem o estabelecimento de sistemas de propagação capazes de garantir a sanidade e uniformidade dos propágulos, permitindo assim a implantação de cultivos padronizados e com grande potencial produtivo (DODE et al., 2011). Além disso, tendo em vista o potencial de utilização do pinhão manso para a produção de biodiesel, o uso de ferramentas que visem determinar o comportamento bioquímico, fisiológico e até mesmo de produção em larga escala, é de fundamental importância. Nesse contexto a micropropagação tem sido utilizada para esse fim.

A micropropagação *in vitro* de pinhão manso é tida como via fundamental para a transformação genética, podendo acarretar melhorias significativas para essas plantas. Ressaltando que a transformação genética pode ser através de bombardeamento de partícula (PURKAYASTHA et al., 2010), e também por método biológico, com a utilização da *Agrobacterium tumefaciens* (LI et al., 2007; PAN et al., 2010).

Analisando as diferentes vias de propagação vegetativa é possível notar que a micropropagação *in vitro* é tida como superior às demais, sendo uma ótima

alternativa para a seleção de genótipos superiores, oferecendo soluções para os programas de melhoramento vegetal. É sabido que o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições mais significativas para o avanço do processo de propagação (SALVADOR et al., 2012). Deste modo, o processo de regeneração *in vitro* pode ser via organogênese e embriogênese somática em qualquer cultura vegetal. A utilização dessas metodologias com *Jatropha curcas* L. visa o estabelecimento de protocolos eficientes de regeneração dessa espécie.

2.4.1.1 Embriogênese somática

A embriogênese somática é uma via de desenvolvimento na qual a formação de embriões é induzida de células somáticas, pode ocorrer diretamente de um explante sem o aparecimento de calos. Entretanto, a via de embriogênese indireta, na qual embriões somáticos são induzidos e desenvolvidos de proliferações de calos é a mais comum (ANDRADE, 2002).

Na cultura do pinhão manso ainda são escassos os estudos a fim de se propagar essa espécie através dessa via de regeneração. No entanto, Jha et al., (2007) desenvolveram um protocolo de regeneração *in vitro* de *J. curcas* L. via embriogênese somática. Esses autores utilizaram segmentos foliares como material de origem cultivados em meio MS acrescido de citocinina e auxina. As plantas de pinhão manso regeneradas *in vitro* utilizando esse protocolo foram bem formadas, além disso, esse método tem a capacidade de produzir grande número de plantas. Muito embora, os autores observaram algumas limitações referentes ao desenvolvimento dos embriões, principalmente, com relação à baixa frequência de indução da embriogênese somática secundária, limitando a frequência regenerativa do processo embriogenético.

2.4.1.2 Organogênese

A organogênese *in vitro* ocorre com a formação de gemas adventícias, que são assim denominadas por terem origem em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta. Esta via de regeneração

pode ser indireta ou direta, dependendo da formação ou não de calos, respectivamente (MOURA et al., 2001).

Com o objetivo de estabelecer eficientes protocolos de regeneração por organogênese *in vitro* de *Jatropha curcas* L., diversos estudos estão sendo realizados (DATTA et al., 2007; KUMAR et al., 2010; SINGH et al., 2010; VARSHNEY e JOHNSON, 2010; SAHOO et al., 2012;) com intuito de utilizá-los em processos biotecnológicos que visem a melhoria dessa cultura.

O explante a ser utilizado no processo regenerativo é um fator relevante no sucesso deste. Assim sendo, a regeneração *in vitro* de pinhão manso vem sendo realizada através do estabelecimento de protocolos com o uso de diferentes tipos de explantes tais como gemas axilares, folha, segmentos caulinares e pecíolo (DATTA et al., 2007; JHA et al., 2007; SINGH et al., 2010; KUMAR, et al., 2011).

Nogueira et al., (2011), regeneraram plantas de pinhão-manso através de explantes cotiledonares, fazendo uso da organogênese como meio de regeneração. A aquisição da competência organogênica, foi obtida com a utilização do meio CIM (meio de competência organogênica), para a formação dos calos. Logo após os explantes foram incubados em meio MS contendo BAP, AIB (ácido-3-butírico) e GA₃ (giberelina) para a regeneração da parte aérea com posterior alongamento da mesma. O enraizamento foi feito com suplementação do meio MS com AIB. A análise histológica dos diferentes eventos que ocorreram durante o processo de organogênese sugeriu as plantas regeneradas foram originadas via organogênese direta, além disso, os autores sugerem também que o processo regenerativo teve origem multicelular.

Kumar et al., (2011), desenvolveram um protocolo de regeneração de pinhão manso via organogênese direta a partir de pecíolos de plantas não-tóxicas cultivadas *in vitro* e *in vivo*, em diferentes concentrações de TDZ (tiadizuron), colocados na posição horizontal e vertical em contato com o meio MS. Para a proliferação de gemas apicais caulinares utilizou-se meio de cultura suplementado com KIN (cinetina) e BAP (6-benzilaminopurina). Subsequentemente as gemas apicais caulinares foram individualizadas e submetidas ao contato com meio MS suplementado com BAP e AIA (ácido indolacético) com o objetivo de alongamento. O enraizamento das partes aéreas foi conseguido com meio MS meia força suplementado com as auxinas AIB (ácido-3-butírico), AIA e ANA (ácido naftalenacético) e logo após as plantas foram aclimatadas e transferidas para casa

de vegetação. De acordo com os autores, concentrações superiores de TDZ induziram altas taxas de proliferação de gemas apicais caulinares, no entanto, essas estruturas apresentavam internódios curtos que não poderiam ser alongadas posteriormente. Em contrapartida, baixas concentrações desse regulador proporcionaram menor número de gemas apicais caulinares formadas, mas que apresentaram êxito nas fases subsequentes. Com isso fica evidente a necessidade de desenvolvimento de protocolos de regeneração eficientes dessa cultura, atentando principalmente as concentrações de reguladores de crescimento.

O uso de explantes provenientes de tecidos jovens e em crescimento constitui um fator de grande relevância para o sucesso da regeneração *in vitro*, portanto deve-se observar a maturidade, o estado fisiológico e o tipo de tecido utilizado para tal fim. Deste modo, o desenvolvimento *in vitro* dos embriões, isolados das sementes de pinhão manso, tem sido constantemente utilizado como uma maneira rápida eficiente para a obtenção desses explantes (LI et al., 2007; MAO et al., 2009; PURKAYASTHA, et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2011).

Purkayastha et al., (2010) estabeleceu um protocolo de regeneração e transformação genética de pinhão manso. Segundo esses autores a utilização de ápices caulinares como explante, isolados de embriões de sementes imaturas, germinadas *in vitro*, se deu devido a sua capacidade extensa de proliferação de brotações adventícias. De acordo com Peres (2002) explantes que contém tecidos meristemáticos são preferidos e eles são encontrados em gemas caulinares apicais e axilares. Nesse sentido Tavares et al., (2004) relatam que atualmente têm-se utilizado explantes oriundos da região basal e meristemática de ápices caulinares obtidos a partir de sementes recém germinadas, que podem ser conseguidos em qualquer época, sem a dependência do ciclo da planta. Adicionalmente, segmentos cotiledonares também são utilizados como explante na regeneração *in vitro* de plantas. Khemkladngoen et al. (2011) ao regenerarem plantas inteiras de pinhão manso a partir de folhas cotiledonares de embriões germinados *in vitro* observaram que a associação do tipo de explante com os reguladores de crescimento (BAP e AIB) foi favorável na indução de partes aéreas adventícias propiciando uma frequência de regeneração de aproximadamente 78%.

Semelhantemente, outro estudo foi realizado por Datta et al. (2007). Os autores estabeleceram um protocolo de regeneração, via organogênese direta, a partir de explantes cotiledonares, obtidos *in vitro* e *in vivo* de diferentes genótipos

(CSMCRI-JC-1, SMCRI-JC-2, e CSMCRIJC) de *J. curcas* L. Nesse estudo, o TDZ teve grande influência na regeneração das partes aéreas adventícias. Além disso, os autores observaram que a regeneração também foi afetada pela fonte de explante, ou seja, os explantes cotiledonares obtidos *in vitro* obtiveram maior frequência e número de brotos caulinares quando comparados com os obtidos *in vivo* independentemente do genótipo estudado. Mazumdar et al., (2010) ao estudarem o comportamento do tipo e posição do explante a ser utilizado na regeneração de pinhão manso elucidaram que a indução de calos e a capacidade de regeneração da parte aérea a partir de segmentos de folhas cotiledonares foram significativamente relacionadas com a idade dos explantes e da sua orientação em meio de cultura, ou seja, o explante mais jovem induziu a resposta mais alta em comparação com a regeneração daqueles com uma ou mais semanas de idade.

Diante do exposto, observa-se a necessidade de pesquisas como as citadas acima, a fim de se obter um eficiente protocolo de regeneração para a cultura do pinhão manso, o qual é imprescindível para os estudos relacionados à transformação genética.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

- Propagar *in vitro* plantas inteiras via cultivo de ápices caulinares obtidos a partir da germinação *in vivo* e *in vitro* de sementes de pinhão manso cultivadas no Estado do Ceará;
- Determinar a reprodutibilidade do protocolo de regeneração adventícia desenvolvido por Khemkladngoen et al. (2011)^a em plantas de pinhão manso cultivadas no Estado do Ceará;
- Verificar, por meio de análises histológicas, a ontogênese das partes aéreas adventícias formadas na regeneração do pinhão manso.

3.2 Específicos

- Obter plantas inteiras de pinhão manso a partir de ápices caulinares cultivados *in vitro* e *in vivo*;
- Obter plantas inteiras de *J. curcas* L. a partir de segmentos cotiledonares por meio de organogênese;
- Definir a posição do explante cotiledonar no meio de cultivo para a formação de partes aéreas de pinhão manso;
- Determinar a localização das partes aéreas adventícias originadas no processo ontogênico a partir de explantes cotiledonares de pinhão manso.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) foram coletadas na fazenda experimental da Universidade Federal do Ceará, localizada no município de Pentecoste, Ceará, Brasil. Antes de serem armazenadas, as sementes foram beneficiadas e selecionadas de acordo com o peso (>600 mg). Logo em seguida foram acondicionadas a 4 °C em frascos de vidro bem vedados contendo sílica por um período aproximado de 30 a 60 dias até a sua utilização nos experimentos.

4.2 Regeneração *in vitro* de *J. curcas* L.

A micropropagação do pinhão manso foi executada utilizando o ápice caulinar de sementes germinadas *in vitro* e *in vivo*. O processo organogênico foi realizado a partir de explantes cotiledonares de sementes germinadas *in vitro*. Todas as metodologias utilizadas a fim de estudar o processo regenerativo de *Jatropha curcas* L. serão descritas a seguir.

4.2.1 Propagação de pinhão manso *in vitro* via cultivo de ápices caulinares

Nos experimentos I, II e III os processos de obtenção, desinfestação e isolamento dos explantes foram realizados da seguinte maneira: sementes maduras de *J. curcas* L. foram semeadas em copos de polietileno com capacidade de 200 ml. O substrato utilizado foi areia peneirada e lavada, esse material foi mantido em casa de vegetação, recebendo irrigação diária conforme necessidade. Passados vinte dias, as partes aéreas (plantas de pinhão manso que tiveram suas folhas e raízes retiradas) foram levadas ao laboratório e submetidas ao processo de desinfestação com solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 5 minutos e lavadas três vezes com água destilada estéril. Os ápices caulinares com aproximadamente 2 - 3 mm de comprimento foram isolados com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus® – modelo SZ61) e imediatamente transferidos para frascos de cultura contendo meio nutritivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Tanto o processo de desinfestação quanto o isolamento dos explantes foram feitos em câmara de fluxo laminar horizontal (Pachane® - modelo MM-80 Manometer).

4.2.1.1 Experimento I – Efeito de diferentes citocininas no desenvolvimento *in vitro* de ápices caulinares de *J. curcas* L.

4.2.1.1.1 Indução do desenvolvimento dos ápices caulinares

Os ápices caulinares de pinhão manso foram isolados e incubados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) contendo diferentes tipos de citocininas: BAP (6-benzilaminopurina), KIN (cinetina) e 2-iP (2-isopenteniladenina) a uma concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D. (Marconi® - modelo 402/1). Os meios de cultura foram suplementados com 100 mg.L^{-1} de myo-inositol, sacarose a 3% e ágar a 0,8%, o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. As culturas foram mantidas a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 horas. Após 30 dias de cultivo, os ápices caulinares desenvolvidos foram avaliados quanto ao número médio de gemas formadas, percentual de vitrificação e de clorose. O delineamento experimental aplicado foi o inteiramente casualizado, consistindo de três tratamentos com cinco repetições, sendo a unidade experimental um frasco com seis explantes. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando para isso o programa estatístico Sisvar. O percentual de vitrificação e clorose foi obtido mediante a observação de cada ápice desenvolvido, onde aqueles que apresentavam qualquer indício dessas características foram contabilizados e posteriormente foi feito um cálculo percentual em relação ao número total de estruturas regeneradas.

4.2.1.2 Experimento II – Efeito da associação de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA_3) no desenvolvimento de ápices caulinares de *J. curcas* L.

4.2.1.2.1 Indução do desenvolvimento dos ápices caulinares

Explantes de *J. curcas* L., previamente desinfestados, foram incubados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ácido giberélico (GA_3) (0,0; 0,034; 0,34 e $3,4 \text{ mg.L}^{-1}$) e com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Também foram testadas diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,01; 0,1 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) combinados com $0,34 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 . Em ambos os experimentos quatro tratamentos foram testados,

havendo cinco repetições por tratamento sendo a unidade experimental um frasco com seis plantas. Os ápices foram mantidos por um período de quatro semanas em câmara de germinação tipo B.O.D. (Marconi® - modelo 402/1), mantidas a 25 ± 2 °C com um fotoperíodo de 16 horas. Logo após esse tempo os ápices caulinares desenvolvidos foram avaliados quanto ao número médio de gemas, comprimento da parte aérea (cm) e percentual de vitrificação. O delineamento experimental aplicado foi o inteiramente casualizado. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa estatístico Sisvar®.

4.2.1.3 Experimento III – Efeito do uso combinado e individual de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA_3) no desenvolvimento de ápices caulinares de *J. curcas* L.

4.2.1.3.1 Indução do desenvolvimento dos ápices caulinares

Os ápices caulinares de pinhão manso já desinfestados e isolados foram incubados em meio MS. Foram quatro tratamentos: MS 0 (sem regulador de crescimento), MS suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA em associação com $0,34 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 , MS com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA e MS suplementado com $0,34 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 . Cada tratamento consistiu de cinco repetições com cinco plantas cada. O material isolado foi mantido por quatro semanas em câmara de germinação obedecendo ao fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C. Os parâmetros avaliados foram os seguintes: número médio de gemas, comprimento do broto principal (cm) e do comprimento médio da parte aérea (cm). A análise estatística foi feita utilizando a ANOVA, seguida pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado.

4.2.1.4 Experimento IV – Efeito do estágio de desenvolvimento das sementes utilizadas para o isolamento do embrião, fonte de explante, no desenvolvimento de ápices caulinares de *J. curcas* L.

4.2.1.4.1 Obtenção, desinfestação e isolamento dos explantes

Para realização deste experimento foram utilizadas sementes pertencentes a quatro estágios de desenvolvimento: 25, 25-30, 30 dias após a polinização (DAP) e maduras. A superfície das sementes foi esterilizada com Etanol 70% por dois minutos, tendo sido o tegumento externo da semente removido, e as sementes posteriormente imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% (cloro ativo) por 5 min e subsequentemente lavadas com água esterilizada e autoclavada, por cinco vezes. O embrião foi exposto cuidadosamente, mediante remoção do endosperma, e cultivado em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) meia força (metade da quantidade de macronutrientes) contendo 100 mg.L^{-1} de myo-inositol, sacarose a 3% e ágar 0,8% - com as radículas em contato com o meio para germinação, durante quatro dias. Passado esse período as folhas cotiledonares foram removidas e os ápices caulinares (4 - 5 mm) isolados.

4.2.1.4.2 Indução do desenvolvimento dos ápices caulinares

Os ápices caulinares provenientes de cada estágio de desenvolvimento das sementes foram cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações da citocinina BAP (6-benzilaminopurina) (0,01; 0,1 e 0,5 mg.L^{-1} BAP), onde permaneceram por 30 dias em câmara de germinação tipo B.O.D (Marconi® - modelo 402/1). As avaliações foram feitas aos 10 e 30 dias. Aos 10 dias as avaliações foram feitas quanto o comprimento médio do broto principal (cm) e comprimento médio da parte aérea (cm) e aos 30 dias os ápices caulinares desenvolvidos foram avaliados quanto ao número médio de gemas, comprimento médio do broto principal (cm) e o comprimento médio da parte aérea (cm).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x3, onde quatro estágios de sementes foram combinados a três concentrações diferentes de BAP. Cada tratamento testado consistiu de seis repetições com cinco explantes cada, totalizando $n=30$. A análise estatística foi feita

utilizando a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Quando se avaliou as concentrações de citocinina, foi feita uma análise de regressão, utilizando o programa estatístico Sisvar.

4.2.1.4.3 Alongamento

Para o alongamento, os ápices caulinares desenvolvidos de pinhão manso foram transferidas para meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), contendo 100 mg.L^{-1} de myo-inositol, sacarose a 3%, ágar 0,8 e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de giberelina (GA_3), onde permaneceu por um período de 10 dias.

4.2.1.4.4 Enraizamento

Após o alongamento, os ápices caulinares desenvolvidos de pinhão manso foram transferidos para meio MS suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ da auxina AIB (ácido indol-3-butírico), permanecendo por tempo indeterminado até a formação das raízes. Todos os procedimentos descritos até o momento foram realizados em câmara de fluxo laminar e permaneceram em câmara de germinação – tipo B.O.D. para efetivo desenvolvimento.

4.2.1.5 Experimento V – Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) no desenvolvimento de ápices caulinares provenientes de sementes maduras de *J. curcas* L.

4.2.1.5.1 Obtenção, desinfestação e isolamento dos explantes

Para obtenção do explante foi utilizado os mesmos procedimentos descritos anteriormente no item 4.2.1.1.1, mas utilizando apenas as sementes já desenvolvidas (maduras).

4.2.1.5.2 Indução de parte aérea

Após a desinfestação, os ápices isolados foram cultivados em meio MS suplementados com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) (tratamentos):

1. meio MS sem regulador de crescimento;
2. meio MS contendo $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP;
3. meio MS contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP;
4. meio MS contendo $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP;

As culturas permaneceram por 30 dias, em câmara de germinação – tipo B.O.D. Passado esse período foram analisados os seguintes parâmetros: comprimento do broto principal (cm), comprimento da parte aérea (cm) e número médio de gemas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) onde cada tratamento foi constituído de oito repetições com cinco explantes cada, totalizando um $n=40$. Ao final foi realizada uma análise de regressão com os dados obtidos, utilizando o programa estatístico Sisvar.

4.2.1.5.3 Alongamento

Com o intuito de alongar os ápices caulinares desenvolvidos, utilizou-se meio MS suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido giberélico (GA_3), por um período de 10 dias.

4.2.1.5.4 Multiplicação

Após 30 dias os ápices caulinares desenvolvidos foram submetidos ao processo de subcultivo, ou seja, aqueles que apresentavam os internódios mais alongados eram seccionados e passados para meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e colocadas em B.O.D. por um período de 30 dias.

4.2.1.5.5 Enraizamento

Os ápices caulinares desenvolvidos foram transferidos para meio MS meia força suplementado com $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB) e mantidos em câmara de germinação-tipo B.O.D.

4.2.2 Organogênese *in vitro* de *J. curcas* L. a partir de explante cotiledonar

Todas as etapas do processo de regenerativo descritas a seguir foram baseadas no protocolo de regeneração *in vitro* desenvolvido por Khemkladngoen et al. (2011) a fim de testar a reprodutibilidade deste em plantas de pinhão manso cultivadas no Estado do Ceará.

4.2.2.1 Obtenção, desinfestação e isolamento dos explantes

Sementes maduras de pinhão manso foram germinadas *in vitro* em placas de Petri contendo meio MS (MURAHIGE e SKOOG, 1962) desprovidos de reguladores de crescimento (MS 0). O período de germinação durou quatro dias, em seguida as folhas cotiledonares foram subdivididas e inoculadas no meio de cultivo.

4.2.2.2 Indução da parte aérea

Para a regeneração das partes aéreas, folhas cotiledonares germinadas *in vitro* foram cortadas em pequenos pedaços 4 a 5 mm e transferidas para placas de Petri contendo meio MS suplementado com 3 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de AIB, mantidos por seis semanas em câmara de germinação tipo B.O.D., sendo que a cada duas semanas os explantes foram subcultivados para meio MS com a mesma suplementação.

4.2.2.3 Alongamento

Passadas seis semanas as partes aéreas regeneradas foram transferidas para potes de cultura contendo meio MS suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP por um período de quatro semanas e foram mantidas em câmara de germinação-tipo B.O.D (a 27 °C e fotoperíodo de 16h).

4.2.2.4 Enraizamento

As partes aéreas formadas foram transferidas para meio MS meia força suplementado com 0,20 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e mantidas em câmara de germinação-tipo B.O.D a 27°C e fotoperíodo de 16h.

4.2.2.5 Experimento I – Efeito da posição dos explantes cotiledonares no meio de cultivo, para a formação de plantas inteiras e análise histológica do processo de organogênese de *J. curcas* L.

Com o objetivo de testar o efeito da posição do explante na indução de partes aéreas de pinhão manso os segmentos cotiledonares foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS suplementado com 3 mg.L^{-1} de BAP e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, com a superfície abaxial e adaxial firmemente em contato com o meio e mantidos por seis semanas em câmara de germinação tipo B.O.D., sendo que a cada duas semanas os explantes foram subcultivados em meio MS com a mesma suplementação. Por fim, foi realizada uma análise estatística relacionada ao número de explantes que deram origem a parte aérea. As etapas de alongamento e enraizamento sucederam normalmente como já descritas acima nos itens 4.2.2.3 e 4.2.2.4.

4.2.3 Análise histológica do processo organogênico de *J. curcas* L.

A caracterização histológica foi realizada utilizando explantes cotiledonares submetidos ao tratamento para indução de parte aérea (descrito no item 4.2.2.5) nos seguintes estágios de desenvolvimento: 0, 5, 10, 15 e 25 dias de incubação.

Os explantes foram coletados e isolados com auxílio de microscópio estereoscópico (Olympus® – modelo SZ61) e fixados em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,2 - KARNOVSKY, 1965), por 24 a 48h, lavados com tampão fosfato de sódio a 0,2 M, pH 7,2, por 5 vezes (3 min cada troca). Em seguida, o material foi desidratado em série etílica crescente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% - v/v) por 1h cada, e transferido para solução de pré-infiltração [álcool absoluto + solução de infiltração (resina básica: 2 - hidroximetil metacrilato + ativador: peróxido de benzoíla) – 1:1 – v/v] por 24h. Logo em seguida, os explantes foram embebidos por 21 dias em historesina, sob vácuo para facilitar o processo de infiltração, e emblocados. Os blocos foram cortados com 5 μm de espessura em micrótomo rotativo (Leica® – modelo 2065). A coloração dos cortes foi realizada com azul de toluidina a 0,12% por 15 min e, em seguida, a fucsina básica a 0,05% por até 1min. Para montagem

das lâminas foi utilizada resina sintética Entellan (Merck®) e, posteriormente, as análises foram feitas em microscópio óptico (Olympus® – modelo CX40).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

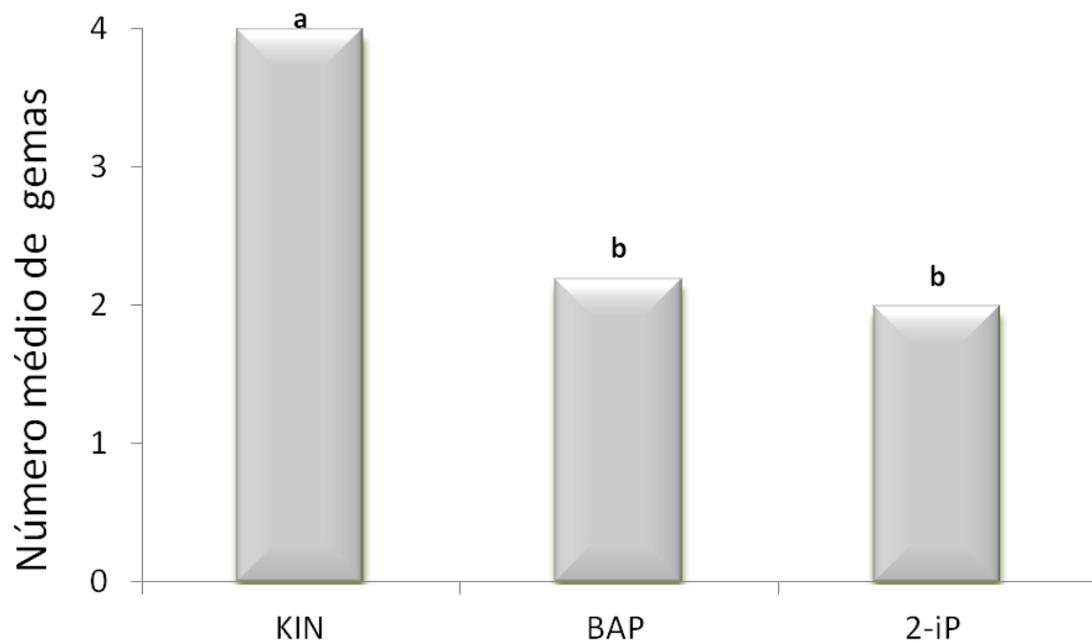
5.1 – Propagação de pinhão manso *in vitro* via cultivo de ápices caulinares

5.1.1 Efeito de diferentes citocininas no desenvolvimento *in vitro* de ápices caulinares de *J. curcas* L.

Ápices caulinares de pinhão manso, provenientes de sementes germinadas em casa de vegetação, foram cultivados *in vitro* a fim de avaliar o efeito das citocininas KIN (cinetina), BAP (6-benzilaminopurina) e 2-iP (2-isopenteniladenina) na formação de partes aéreas. Inicialmente, os explantes apresentaram sinais visíveis de intumescimento em todos os tratamentos, o que seria uma resposta ao contato com o meio ou mesmo com o regulador de crescimento ali presente. A partir da segunda semana de cultivo os ápices iniciaram o processo de desenvolvimento das gemas. Ao final de quatro semanas, período considerado para o desenvolvimento do experimento, avaliou-se o número médio de gemas formadas por broto.

O meio suplementado com KIN (cinetina) mostrou média de quatro gemas por broto sendo, superior aos demais tratamentos, ou seja, BAP e 2-iP, que apresentaram média de 2,2 e 2 gemas respectivamente (Figura 2). Esses dados divergem daqueles obtidos por Rajore e Batra (2005) também utilizando ápice caulinar de *J. curcas* L. como explante que obtiveram média de $2,9 \pm 0,43$ gemas ao utilizar a mesma concentração de BAP, enquanto que a cinetina (KIN) propiciou apenas $1,77 \pm 0,22$ gemas por parte aérea regenerada. Datta et al., (2007) também discordaram dos resultados obtidos nesse trabalho ao induzirem parte aérea de pinhão manso a partir de gemas axilares em meio de cultura MS suplementado com diferentes citocininas (BAP, 2-iP, KIN e TDZ) individualmente, onde, $4,95 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP no meio de cultivo utilizado mostrou os melhores resultados com $6,2 \pm 0,56$ número médio de gemas por explante.

Clorose e vitrificação (32 e 20%, respectivamente) foram identificados nos brotos obtidos em meio com KIN (cinetina), enquanto que no meio suplementado com 2-iP os valores para as mesmas características foram de 26 e 35%, respectivamente. No meio suplementado com BAP, a vitrificação foi de 36% sendo



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 2 - Efeito das citocininas KIN (cinetina), BAP (6-benzilaminopurina) e 2-iP (2-isopenteniladenina) na concentração de 2 mg.L^{-1} , para a formação de partes aéreas de *Jatropha curcas* L. utilizando ápice caulinar como explante, por um período de 30 dias de cultivo *in vitro*.

que, não foi identificada a presença de folhas cloróticas (Tabela 1).

Os reguladores de crescimento são considerados substâncias fundamentais na composição do meio de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de organismos vegetais, dentre eles têm-se principalmente as auxinas, giberelinas e as citocininas (CID, 2001). Estas últimas atuam na quebra da dominância apical dos brotos e no aumento da taxa de multiplicação (ERIG e SCHUCH, 2006), além disso, estão envolvidas diretamente na divisão das células vegetais *in vitro* (TAIZ e ZEIGER, 2006) sendo, portanto, de fundamental importância para a diferenciação e regeneração de plantas em ambientes controlados. Dentro da classe das citocininas, estão os reguladores de crescimento BAP, 2iP e KIN que estão entre as mais comumente empregadas na cultura de tecidos, por serem eficientes no processo de multiplicação das estruturas aéreas e na indução de gemas adventícias em diversas espécies (HU e WANG, 1983).

Singh et al., (2010) ao regenerarem parte aérea de *J. curcas* L. a partir de hipocótilo notaram que BAP e KIN presentes individualmente no meio de cultura não foram suficientes para induzir a formação de brotos e mesmo com o aumento na concentração de KIN houve a diminuição na indução de gemas vegetativas. Kalimuthu et al., (2007) em seu trabalho observaram que a concentração de BAP ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), KIN ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e de IAA ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) em combinação no mesmo meio, foi eficaz para a formação de brotos de *J. curcas* L. a partir de explantes nodais indicando que o uso individual das citocininas atua negativamente na formação de partes aéreas e, portanto, sugere uma atividade benéfica dos reguladores de crescimento (auxinas e citocininas) em associação no meio de cultivo.

De maneira geral, a citocinina KIN foi a mais eficiente no desenvolvimento de ápices caulinares de pinhão manso, por apresentar média superior na formação de gemas muito embora, observou-se o aparecimento de altos índices de clorose e vitrificação que inviabilizam a formação e desenvolvimento das gemas, diferindo da utilização do BAP no qual, apresentou apenas estruturas vitrificadas. Nessa investigação, tal comportamento sugere que o BAP é a citocinina mais indicada para a micropropagação *in vitro* dessa planta, mas que estudos para a determinação de concentrações que proporcionem melhor desempenho na formação de gemas e que apresentem ausência de vitrificação são necessários.

Tabela 1 - Características das partes aéreas formadas de *Jatropha curcas* L. a partir de ápice caulinar fazendo uso de diferentes tipos de citocininas, por um período de 30 dias de cultivo em ambiente controlado

Tratamentos	Vitrificação (%)	Clorose (%)
KIN [2 mg.L ⁻¹]	20	32
BAP [2 mg.L ⁻¹]	36	0
2iP [2 mg.L ⁻¹]	35	26

5.1.2 - Efeito da associação de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA₃) no desenvolvimento de ápices caulinares de *J. curcas* L.

A combinação da citocinina BAP (6-benzilaminopurina) com o ácido giberélico (GA₃) teve como intuito o desenvolvimento e alongamento dos ápices caulinares de pinhão manso. Nesse sentido foram realizados estudos preliminares a fim de estabelecer as concentrações da giberelina a serem utilizadas nesse experimento. A concentração de 0,1 mg.L⁻¹ de BAP foi determinada a partir de estudos realizados por Feitosa et al. (2007) com o intuito de regenerar genótipos de mandioca, espécie também pertencente a família das Euphorbiaceae, tendo como tecido de origem ápices caulinares. Portanto, para estimar o efeito combinado entre o BAP e a giberelina (GA₃), foram avaliadas as seguintes características: comprimento da parte aérea (cm), número médio de gemas e percentual de vitrificação (%).

No primeiro caso, onde variaram-se apenas as concentrações de GA₃, permanecendo constante a de BAP, não houve diferença estatística significativa tanto para comprimento de parte aérea quanto para o surgimento de gemas (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Reis et al., (2008) ao induzirem brotos *in vitro* de paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*) em que a presença do regulador de crescimento GA₃, associado ao BAP, não influenciou na formação e alongamento de brotos. Esse comportamento também foi observado em outras espécies como: unha de gato (*Uncaria guianensis* (PERREIRA et al., 2006) e macieira (*Malus domestica* Borkh) cv. Golden Delicious (YUI et al., 1990).

Ao avaliar as diferentes concentrações de BAP e a permanência na concentração de GA₃ foi possível observar que o comprimento da parte aérea foi estatisticamente superior quando os explantes foram submetidos às concentrações de 0,1 mg.L⁻¹ de BAP associado com 0,34 mg.L⁻¹ de GA₃ e também 1 mg.L⁻¹ BAP em associação com a mesma concentração de GA₃ apresentaram 1,74 e 1,83 cm de parte aérea respectivamente. O tratamento com ausência total de BAP no meio de cultura apresentou comprimento de parte aérea de 0,76 cm sendo inferior aos demais, esse comportamento indica que as maiores concentrações de BAP associado com 0,34 mg.L⁻¹ de GA₃ resultaram em ápices caulinares de pinhão manso mais desenvolvidos (Tabela 3).

Tabela 2 - Efeito de diferentes concentrações de giberelina (GA₃) em associação com a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na formação de parte aérea de *J. curcas* L., por um período de 30 dias de cultivo em ambiente controlado

BAP (mg.L ⁻¹)	GA ₃ (mg.L ⁻¹)	Número médio de gemas	Comprimento da parte aérea (cm)	Vitrificação (%)
0,1	0	2,4 ^a	1,38 ^a	0
0,1	0,034	2,6 ^a	2,44 ^a	19
0,1	0,34	2,4 ^a	1,90 ^a	7
0,1	3,4	2,8 ^a	2,13 ^a	53

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) em associação com giberelina (GA₃) na formação de parte aérea de *J. curcas* L., por um período de 30 dias de cultivo em ambiente controlado

BAP (mg.L ⁻¹)	GA ₃ (mg.L ⁻¹)	Número médio de gemas	Comprimento da parte aérea (cm)	Vitrificação (%)
0	0,34	1,6 ^a	0,76 ^b	0
0,01	0,34	2,2 ^a	1,41 ^{ab}	14
0,1	0,34	2,5 ^a	1,74 ^a	29
1,0	0,34	2,6 ^a	1,83 ^a	41

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nos tratamentos com ausência total de um dos reguladores de crescimento (BAP e GA₃) não foi possível observar a formação de estruturas vitrificadas (Tabelas 2 e 3) enquanto que, os demais arranjos que combinavam esses fitohormônios apresentaram essa característica. Isso indica que a presença de ambos os reguladores em um mesmo meio de cultivo *in vitro* possa vir a causar essa anormalidade impossibilitando o desenvolvimento da planta. Essas observações concordaram com o estudo de Diniz et al. (2003) ao avaliarem crescimento *in vitro* de macela (*Egletes viscosa* (L.) Less.) onde o maior número de plantas com folhas malformadas e hiperhídricas foi observado na presença de BAP e GA₃, enquanto o menor número de plantas com essa característica foi verificado na ausência dos dois reguladores. Esse comportamento foi observado também no trabalho de Fráguas et. al. (2004) onde o GA₃ na presença de cinetina (KIN) reduziu a formação e multiplicação dos brotos e induziu ao estiolamento, a hiperhidricidade, clorose e necrose apical das plântulas de *Ficus carica* L. multiplicadas *in vitro*. Em contrapartida, o meio suplementado com a maior concentração de giberelina (0,1 mg.L⁻¹ BAP e 3,4 mg. L⁻¹ GA₃) mostrou 53% desse efeito (Tabela 2) e o mesmo comportamento foi verificado no meio com a maior concentração de BAP (1 mg.L⁻¹ BAP e 0,34 mg. L⁻¹ GA₃) onde 41% das partes aéreas mostraram vitrificação durante todo o período de cultivo (Tabela 3). Os tratamentos com concentrações iguais nos dois experimentos (0,1 mg.L⁻¹ BAP e 0,34 mg.L⁻¹ GA₃), diferiram no percentual de vitrificação, o primeiro apresentou apenas 7% enquanto que, no segundo 29% das partes aéreas formadas mostraram essa anomalia, sugerindo que esse comportamento pode estar relacionado com as diferenças nas condições químicas ou ambientais a que esses isolados foram submetidos, como por exemplo a umidade relativa nos frascos de cultivo (MAJADA et al., 1997), já que esse fator influencia diretamente para que a hiperhidricidade ocorra nas plantas regeneradas *in vitro*.

A utilização do BAP (6-benzilaminopurina) e GA₃ (giberelina) baseia-se nos efeitos causados por esses reguladores de crescimento. Ou seja, o BAP é um regulador de crescimento pertencente à classe das citocininas, bastante empregado na multiplicação *in vitro* de partes aéreas de *J. curcas* L. (KUMAR et al., 2010; PURKAYASTHA et al., 2010; SAHOO et al., 2012). Além disso, as giberelinas (GA₃) são reguladores de crescimento que incrementam tanto a divisão celular quanto o alongamento das células formadas (TAIZ e ZEIGER, 2006), tendo como principal

efeito estimular o crescimento de órgãos já formados (REIS et al., 2008). No entanto, nesse estudo o uso de tais reguladores em combinação não foi eficiente para a regeneração e desenvolvimento de partes aéreas de pinhão manso *in vitro*. Purkayastha et al. (2010) desenvolveram um protocolo eficiente de transformação genética de pinhão manso. Nesse estudo a regeneração *in vitro* foi conseguida com a indução de partes aéreas com meio MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP por 30 dias e em seguida a adição de 0,1 mg.L⁻¹ de GA₃ possibilitou o alongamento dessas estruturas. Esses autores observaram que a utilização da giberelina individualmente no meio de cultivo por 10 dias proporcionou o alongamento em 98% das estruturas regeneradas. Comportamento contrário foi observado no trabalho de Kumari et al. (2008) ao regenerarem plantas de mamona (*Ricinus communis* L.) onde, a adição de GA₃ ao meio de cultura contendo diferentes tipos de citocininas favoreceu o crescimento e desenvolvimento das partes aéreas regeneradas.

Outro aspecto observado nesse trabalho é o aparecimento da vitrificação nos ápices desenvolvidos de pinhão manso. Nesse caso, as plantas exibem seus órgãos com aspecto translúcido, coloração verde claro e menor rigidez em sua estrutura (KEVERS et al., 2004), tornando os brotos quebradiços (CARVALHO e VIDAL, 2003). Esse comportamento denuncia elevado teor de água no interior das células e conseqüentemente nos tecidos, o que provoca desordens morfológicas e fisiológicas ao vegetal (ZIV e ARIEL, 1991). Segundo Park et al., (2004) esse efeito é uma consequência da resposta as tensões a que os explantes são expostos quando esses são colocados em um ambiente *in vitro* inadequado.

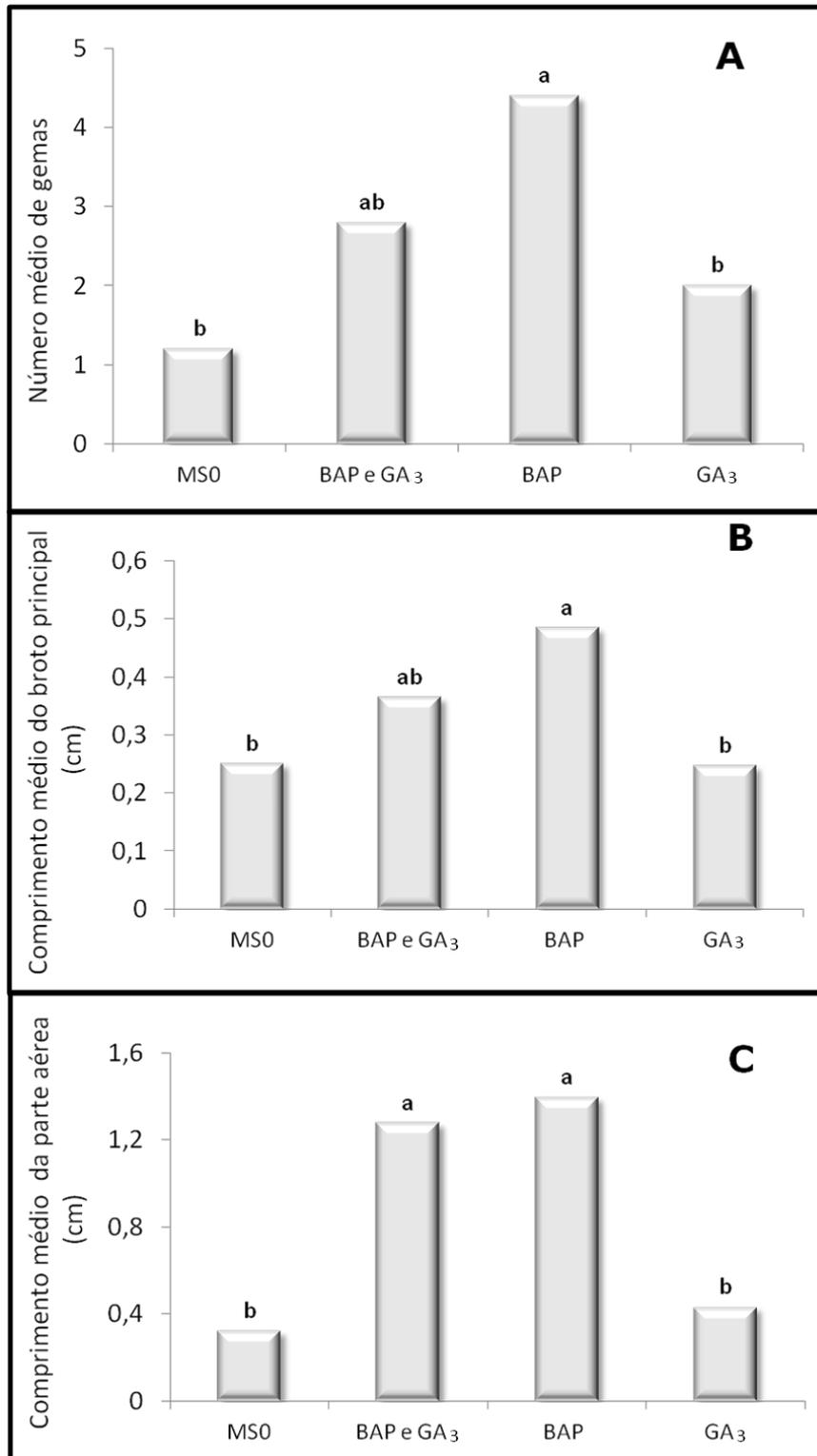
Diversos são os fatores responsáveis pela manifestação da vitrificação em plantas regeneradas em ambientes controlados. Este aspecto pode estar associado à concentração de agente gelificante no meio de cultivo (PALMA et al., 2011), umidade relativa nos frascos de cultivo (MAJADA et al., 1997) e também à presença de grandes quantidades de reguladores de crescimento (PARK et al., 2004), frequentemente atribuídos ao uso contínuo de citocininas no meio de cultura (PASQUAL et al., 1991). Esta última pode ser considerada como fator principal dessa resposta no presente trabalho. Portanto, torna-se imprescindível a investigação de outras concentrações de BAP a fim de reduzir o aparecimento de estruturas vitrificadas.

De acordo com os dados obtidos nessa investigação é possível verificar que os tratamentos com as maiores concentrações de GA₃ não influenciaram na formação de gemas e também no comprimento da parte aérea, diferentemente dos tratamentos com as concentrações superiores de BAP no qual, o comprimento das estruturas regeneradas foi superior.

5.1.3 - Efeito do uso combinado e individual de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA₃) no desenvolvimento de ápice caulinar de *J. curcas* L.

No estudo descrito anteriormente, a associação do BAP e GA₃ não apresentou bons resultados quanto ao desenvolvimento dos ápices caulinares de pinhão manso e também o aparecimento de estruturas vitificadas em todas as combinações exceto os tratamentos no qual o meio foi suplementado apenas com um dos reguladores de crescimento. Em vista desse comportamento testou-se o efeito de cada regulador, adicionado individualmente e em combinação no meio de cultura, com relação ao desenvolvimento de ápices caulinares de pinhão manso. Nesse caso, as características avaliadas foram o número médio de gemas, comprimento médio do broto principal (cm) e tamanho médio da parte aérea (cm).

O tratamento suplementado com 0,1 mg. L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) individualmente obteve média de 4,4 gemas formadas por explante, mesmo não havendo diferença significativa com o tratamento suplementado com os reguladores de crescimento estudados em associação (BAP e GA₃) que apresentou média de 2,8 gemas por explante. Os demais tratamentos mostraram formação de gemas inferior, nesses casos os valores foram de 2,0 (GA₃) e 1,2 (MS 0) número médio de gemas formadas por explante (Figura 3A). Esses resultados divergiram daqueles obtidos por Carvalho et al., (2007) ao induzirem o superbrotamento de mamona (*Ricinus communis* L.) var. BRS Nordestina, também membro da família Euphorbiaceae. Os autores utilizaram diferentes concentrações de BAP em associação com a giberelina (GA₃) em explantes de gema apical e de eixo embrionário onde, o meio suplementado com GA₃ e BAP (0,05 e 0,3 mg.L⁻¹ respectivamente) foi superior aos demais com uma média de 6,13 brotos por explante. Essa diferença indica que o GA₃ não influencia na formação de gemas axilares de pinhão manso.



**Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 3 – Desenvolvimento de partes aéreas de *Jatropha curcas* L., após 30 dias de cultivo *in vitro*, regeneradas em meio MS com as seguintes suplementações: MS0 (com ausência de regulador de crescimento); 0,1 mg.L⁻¹ BAP e 0,34 mg.L⁻¹ GA₃ (em associação no mesmo meio de cultivo); 0,1 mg.L⁻¹ de BAP e 0,34 mg.L⁻¹ de GA₃. **(A)** Número médio de gemas. **(B)** Comprimento médio do broto principal (cm). **(C)** Comprimento médio da parte aérea (cm).

O mesmo comportamento pode ser observado para o comprimento médio do broto principal onde o meio suplementado apenas com BAP foi de 0,48 cm, superior aos demais tratamentos, muito embora não diferiu significativamente do meio com associação da 6-benzilaminopurina e da giberelina (0,1 e 0,3 mg.L⁻¹ de BAP e GA₃ respectivamente) apresentando valor de 0,36 cm. Já os meios de cultura sem regulador de crescimento (MS 0) e aquele suplementado apenas com o ácido giberélico mostraram os menores valores sendo, 0,25 e 0,24 cm respectivamente, mas não diferem do meio com associação de ambos os reguladores (Figura 3B) ou seja, ocorreu desenvolvimento inferior dos ápices caulinares de pinhão manso (Figuras 4A e 4B).

Já com relação ao comprimento médio da parte aérea, medido da base até o ápice da folha posicionada paralelamente ao broto principal da estrutura regenerada, houve algumas diferenças do que já vinha ocorrendo nas características avaliadas anteriormente. Nesse caso, os meios com suplementação de BAP individualmente e em associação com GA₃, não diferiram estatisticamente, ou seja, sugere-se a mesma eficiência no comprimento das partes aéreas (Figura 3C). Esse comportamento pode ser justificado pelo alongamento dos pecíolos das folhas formadas, ocasionado pela presença da giberelina (GA₃) no meio de cultivo (Figura 4 C), enquanto que as partes aéreas formadas somente com a citocinina BAP mostraram estruturas bem mais vigorosas (Figura 4D).

A superioridade dos valores das características avaliadas nesse estudo para o tratamento com o BAP comprova a hipótese de que esse regulador presente individualmente no meio de cultura é mais eficaz quando comparado ao meio de cultura suplementado com BAP e GA₃ em associação. Singh et. al. (2010) obtiveram resultados que sugeriram que o BAP e o KIN (cinetina) tiveram um efeito sinérgico na indução de brotações de três genótipos de elite de *J. curcas* L. (CSMCRI-I, II e CSMCRI-CSMCRI-III) a partir de segmentos caulinares após quatro semanas de cultura, apresentando número médio de 10 a 15 gemas por explante.

A interação e o balanço entre os reguladores adicionados ao meio MS e os fitohormônios produzidos de forma endógena nas células, regulam o crescimento e a morfogênese de células e tecidos *in vitro*. Desta forma e de acordo com a parte da planta da qual foi retirado o explante, mesmo sendo da mesma planta ou de uma espécie para outra, as concentrações de reguladores a serem utilizados devem

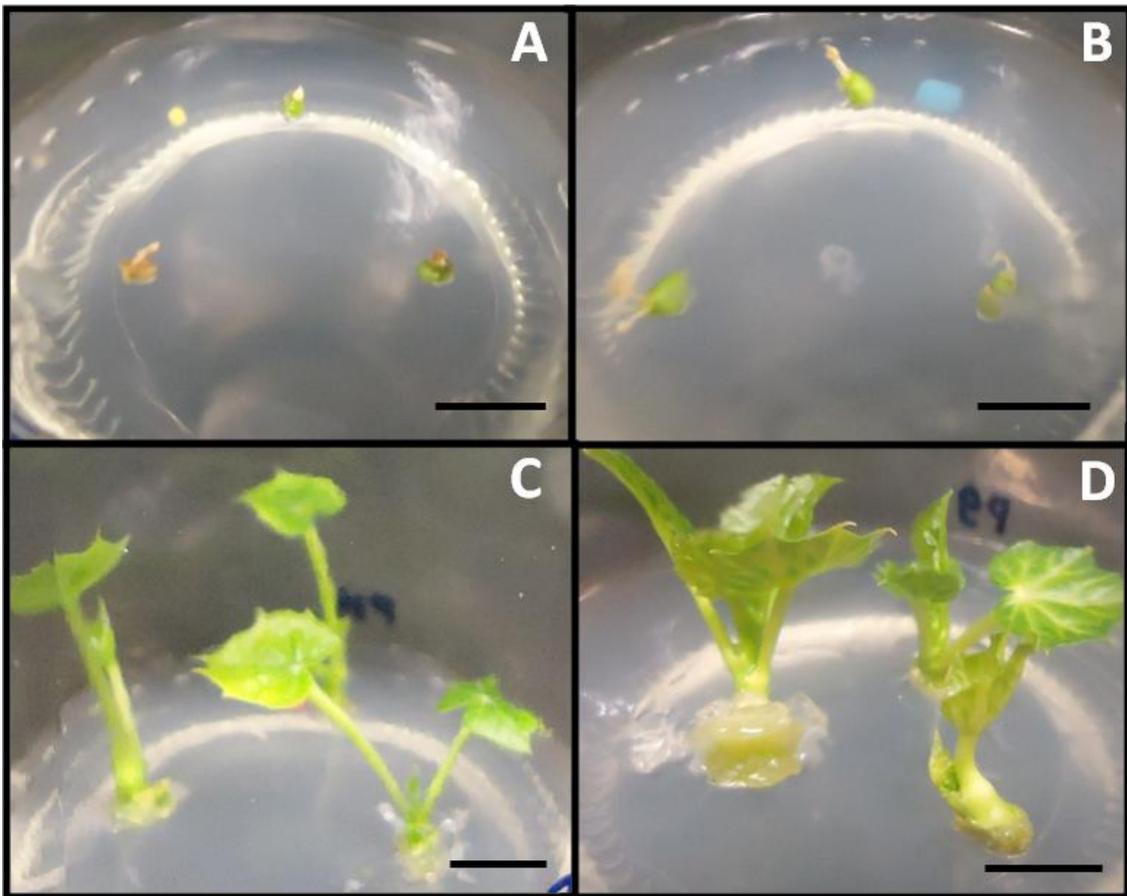


Figura 4- Regeneração de plantas de *Jatropha curcas* L. a partir de ápice caulinar após quatro semanas de cultivo *in vitro*. **(A)** Partes aéreas de pinhão manso em meio de cultivo com ausência de regulador de crescimento (MS 0). **(B)** Partes aéreas de pinhão manso em meio de cultivo com $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de giberelina (GA_3). **(C)** Partes aéreas de pinhão manso em meio de cultivo suplementado com $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP). **(D)** Partes aéreas de pinhão manso em meio de cultivo suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Barras: 1 cm para A-B-C-D.

variar, em função das diferenças endógenas naturais nos níveis dessas substâncias (CARVALHO et al., 2007). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o efeito mais conhecido das giberelinas (GA_3) *in vitro* é o alongamento das partes aéreas quando essas não estão em condições de serem individualizadas para o enraizamento, devido ao seu reduzido tamanho. Brotos pequenos, em geral, não enraízam bem e necessitam, portanto, de uma fase intermediária adicional de alongamento com o uso do GA_3 . Salientando que, o efeito benéfico do BAP (6-benzilaminopurina) na multiplicação das brotações pode ser relacionado com a influência desse regulador na divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical (BRUM et al., 2002). Vale ressaltar que os efeitos relacionados à regeneração e alongamento das plantas cultivadas *in vitro*, podem ser inerentes às diferenças entre as concentrações de reguladores de crescimento endógenos presentes nas estruturas vegetais e até mesmo a concentração das citocininas no meio de cultivo, muito embora, esse fato ainda continue sem confirmação (SCHWEEN e SCHWENKEL, 2003).

Diante do exposto, fica clara a necessidade da fase de alongamento no processo regenerativo do pinhão manso. O êxito nessa fase indica bom desempenho nas fases de multiplicação e enraizamento das partes aéreas propagadas *in vitro*. A partir das observações feitas nessa investigação, de maneira geral temos que o uso individual da citocinina BAP teve comportamento satisfatório no desenvolvimento dos ápices caulinares da espécie em estudo. Muito embora, não diferiram estatisticamente do meio suplementado com giberelina e BAP em associação. Esse cenário sugere que ainda deve-se estudar a melhor maneira de se utilizar o ácido giberélico no alongamento dos ápices caulinares de *J. curcas* L.

5.1.4 - Efeito do estágio de desenvolvimento das sementes utilizadas para o isolamento do embrião, fonte de explante, no desenvolvimento de ápices caulinares de *J. curcas* L.

As sementes de *J. curcas* L. utilizadas no experimento estavam em quatro diferentes fases de desenvolvimento sendo: 25, 25-30, 30 dias após a polinização (DAP) e sementes maduras, ou seja, aquelas que completaram seu desenvolvimento (Figura 5A, 5D, 5G e 5J respectivamente). Nessa investigação o objetivo foi avaliar a interação entre a influência do estágio de desenvolvimento da

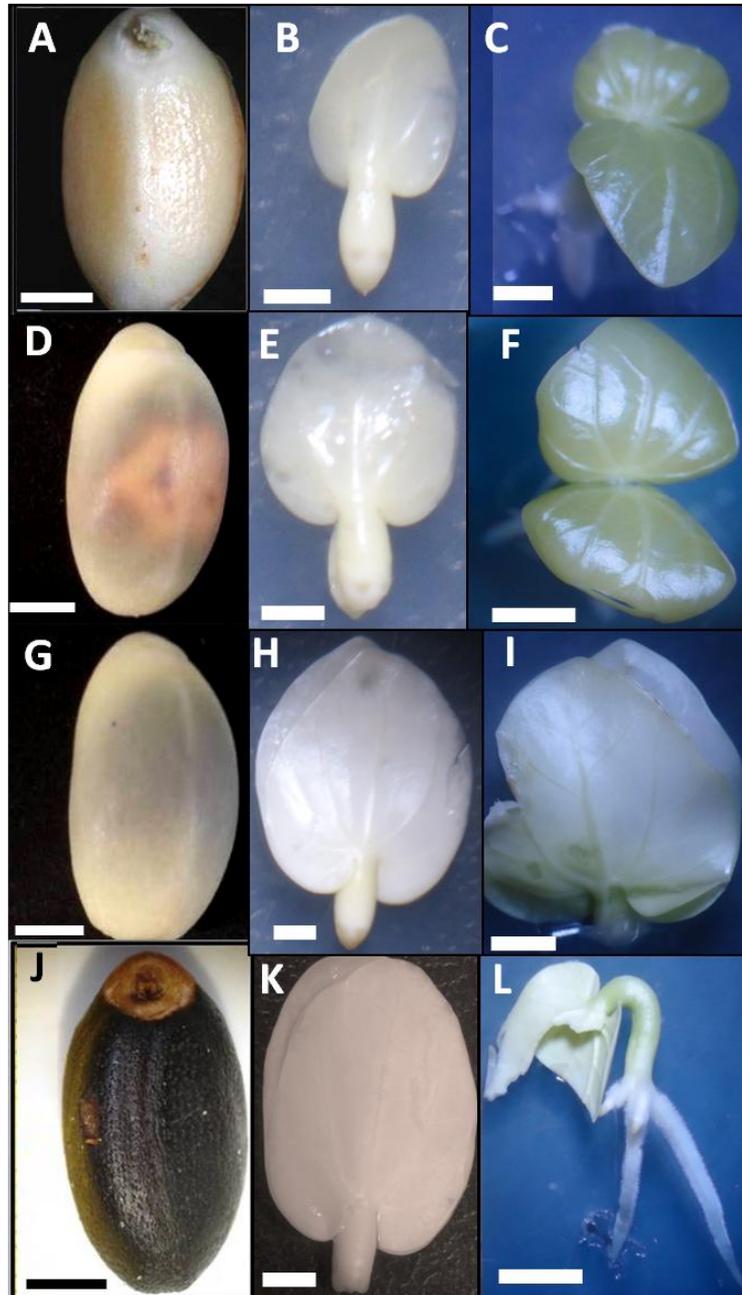


Figura 5 – Características morfológicas das sementes e embriões das sementes de *Jatropha curcas* L. **(A), (D), (G) e (J)** Sementes de pinhão manso com 25, 25-30 e 30 dias de desenvolvimento e semente madura, respectivamente; **(B), (E), (H) e (K)** Embriões isolados de sementes de pinhão manso com 25, 25-30 e 30 dias de desenvolvimento e semente madura, respectivamente. **(C), (F), (I) e (L)** Embriões de pinhão manso, germinados *in vitro*, por um período de quatro dias em meio MS meia força e com ausência de regulador de crescimento. Barras: 5 mm para A-D-G-J-L; 2 mm para H-K-F-I; 1,5 mm para B-E; 1 mm para C.

semente de pinhão manso utilizada para o isolamento do embrião, fonte de explante, (25, 25-30, 30 DAP e sementes maduras) associado com diferentes concentrações de BAP (0,01; 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹) no desenvolvimento dos ápices caulinares da espécie em estudo, no entanto, essa interação não foi significativa estatisticamente, ou seja, o desenvolvimento dos ápices caulinares de *J. curcas* L. não estava condicionado a relação entre esses dois fatores. Portanto a avaliação foi feita individualmente para cada característica aos 30 dias de cultivo em ambiente controlado. O estágio de desenvolvimento da semente não influenciou no desenvolvimento dos ápices caulinares. Em contrapartida, as concentrações de citocinina influenciaram no desenvolvimento dos ápices caulinares de pinhão manso, para tal as três diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina foram avaliadas ao final do período de cultivo com base nas seguintes características: comprimento médio do broto principal (cm) e comprimento médio da parte aérea (cm) e o número médio de gemas.

Os embriões de 25, 25-30, 30 DAP e também os maduros foram excisados das sementes de *J. curcas* L. (Figura 5B, 5E, 5H e 5K) e germinados *in vitro* em meio MS meia força (metade da quantidade de macronutrientes) (MURASHIGE e SKOOG, 1962) na ausência de regulador de crescimento (MS 0) por um período de quatro dias (Figura 5C, 5F, 5I e 5L), em seguida tiveram os ápices caulinares isolados e utilizados para a regeneração de parte aérea. Nos primeiros dias de cultivo foram observados intumescimento e alongamento dos ápices caulinares em todos os tratamentos, e ainda o aparecimento de algumas raízes, concomitantemente ao aparecimento das folhas primárias. A retirada ineficiente do ápice radicular no momento da excisão do ápice caulinar pode ter ocasionado o aparecimento de algumas raízes em algumas plantas no decorrer do período de cultivo.

Nesse estudo as partes aéreas de pinhão manso, regeneradas a partir de ápice caulinar isolado de embriões germinados de sementes maduras, após dez dias de cultivo em meio MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), concentração mais eficiente, com o desenvolvimento de folhas e em alguns ocorreu a formação de calos na base (Figura 6A). Características morfológicas semelhantes foram observadas após 15 dias de cultivo por Vianna et al. (2010) ao utilizarem gemas apicais de *J. curcas* L. obtidas de plântulas cultivadas *in vitro* para avaliação do seu desenvolvimento em meio de cultura MS

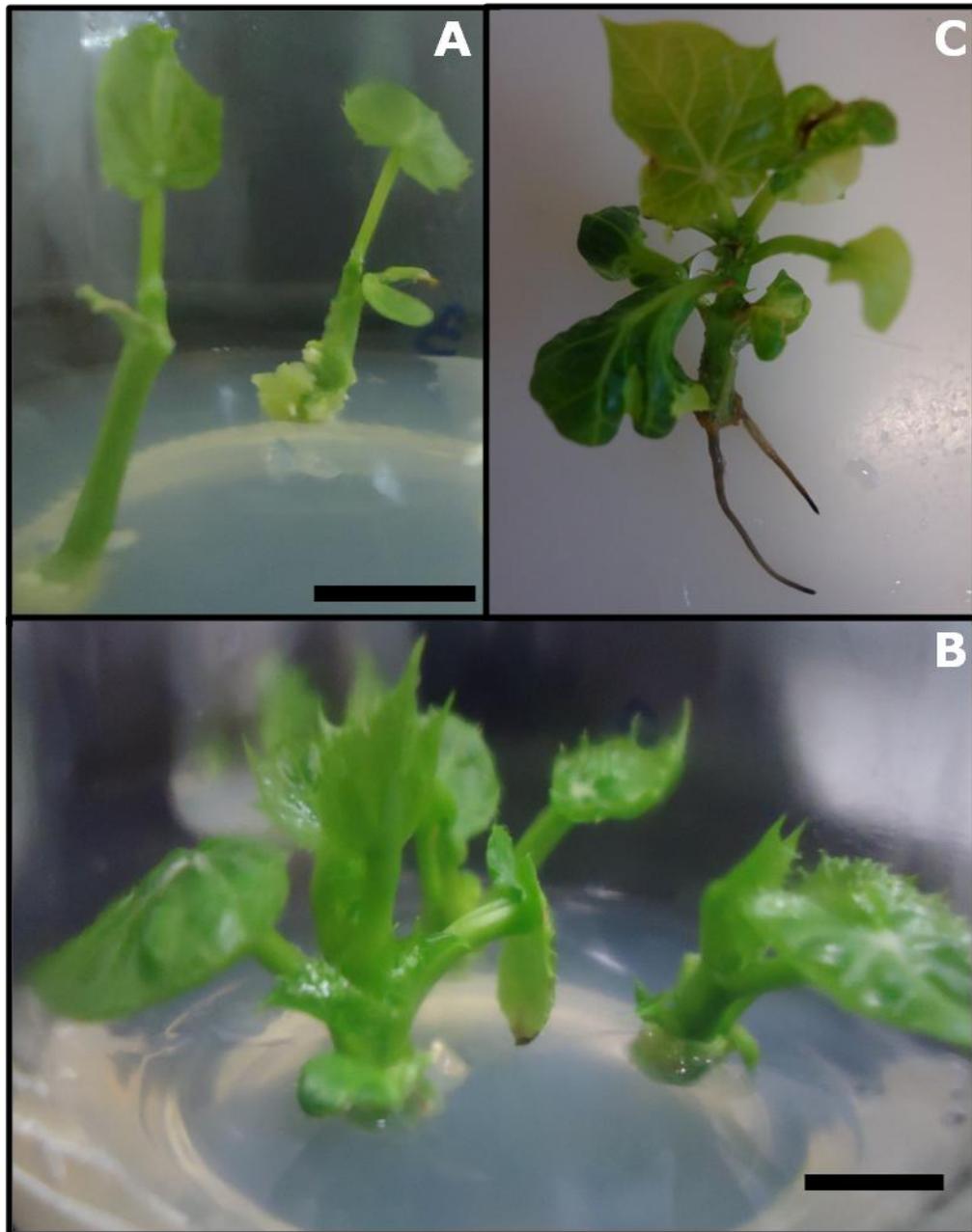


Figura 6 – Plantas de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) regeneradas a partir de ápice caulinar isolados de embriões de sementes maduras. **(A)** Partes aéreas de pinhão manso após 10 dias de cultivo em meio MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP 6-benzilaminopurina). **(B)** Partes aéreas de *J. curcas* L. regeneradas em meio MS suplementado com 0,5 mg. L⁻¹ de BAP por 30 dias e posteriormente alongadas em meio MS acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de GA₃ (giberelina) por 10 dias. **(C)** Plantas de pinhão manso enraizadas em meio MS contendo 0,1 mg.L⁻¹ de ácido indol-3-butírico (AIB) cultivadas por aproximadamente três semanas. Barras: 1 cm para A e B.

com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mg/L).

Ao final do período de cultivo (30 dias) foi feita uma avaliação levando em consideração as características já descritas anteriormente. Nesse caso os estádios de desenvolvimento das sementes de pinhão manso avaliados não tiveram influência significativa sobre o desenvolvimento dos ápices caulinares, enquanto que a maior concentração de BAP foi superior na formação de gemas, ou seja, os explantes submetidos a uma concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina formaram um número médio superior de gemas quando comparado a $0,01$ e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (Figura 7).

As partes aéreas de *J. curcas* L., obtidas após os 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP a partir de embriões germinados de sementes maduras, exibiram tamanho reduzido e internódios curtos, portanto foram alongadas em meio MS adicionado de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido giberélico por dez dias, baseado no trabalho de Purkayastha et al., (2010) (Figura 6B).

As partes aéreas alongadas foram transferidas para meio MS meia força suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido indol-3-butírico (AIB) para o enraizamento como foi descrito no trabalho de Purkayastha et al., (2010). Aproximadamente três semanas após esse procedimento, observou-se o aparecimento das primeiras raízes (Figura 6C). O uso dessa auxina individualmente no meio discorda do trabalho de Kumar et al., (2011) que necessitou utilizar a combinação de AIA, ANA e AIB para enraizar eficientemente as partes aéreas regeneradas. Portanto, no presente trabalho observou-se que a utilização individual do AIB foi eficiente no enraizamento dos ápices desenvolvidos de *J. curcas* L.

Na investigação de Purkayastha et al., (2010), utilizada como base para a realização desse estudo, a utilização de ápices caulinares derivados de embriões de sementes imaturas como explante mostraram ser ideais devido sua habilidade na proliferação extensiva. Além disso, explantes derivados de sementes são em geral tidos como mais receptivos aos reguladores de crescimento e também a regeneração *in vitro* é mais rápida (TIWARE e TULI, 2009), no entanto, explantes que provém de outras partes das plantas cultivadas em campo estão associados com alto grau de contaminação. Purkayastha et al., (2010) esclarecem que a idade dos explantes é um fator relevante para melhorar a frequência de regeneração de plantas. O não cumprimento deste pré-requisito pode acarretar problemas durante o processo de micropropagação *in vitro*. Li et al., (2007) em seu trabalho de

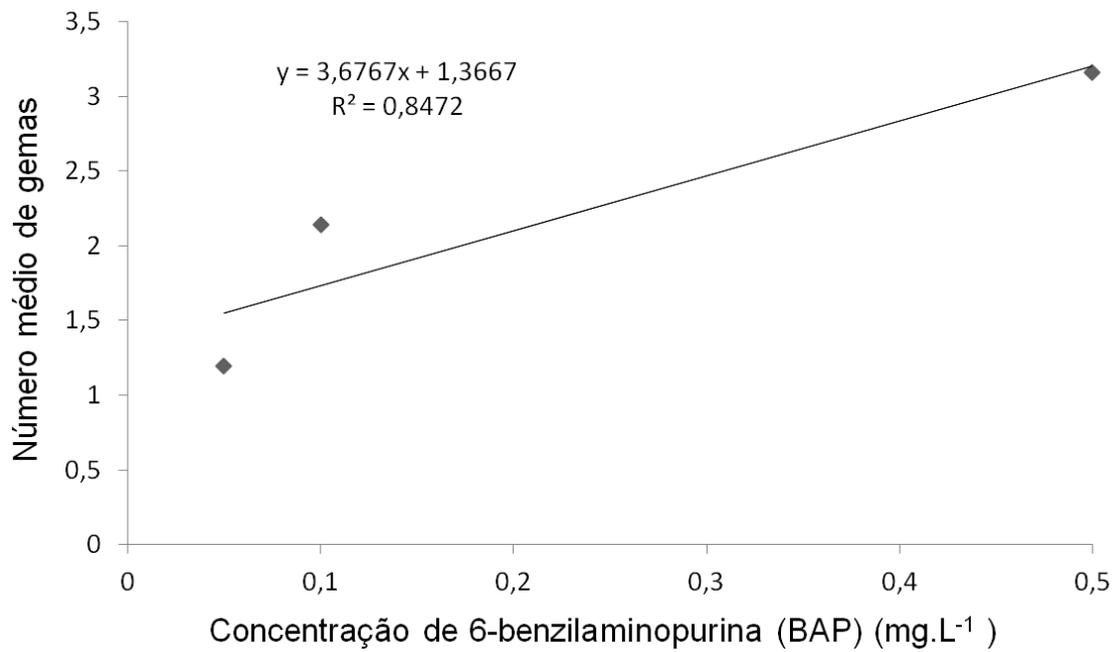


Figura 7 – Relação existente entre o número médio de gemas formadas por explante em função das diferentes concentrações de BAP (mg.L⁻¹), após 30 dias de cultivo, para a formação de partes aéreas de *J. curcas* L. ($7 \leq n \leq 15$).

transformação genética de pinhão manso mediada por *Agrobacterium* observaram que a ineficiência ou a dificuldade na reprodutibilidade dos protocolos são proposições atribuídas a idade inadequada dos explantes utilizados. Ainda nesse sentido, Mazumdar et al., (2010) ao testarem a idade (0, 7 e 14 dias) de folhas cotiledonares utilizadas para a indução de brotações de pinhão manso notaram que a percentagem de calo formado, a percentagem de calo que induziu múltiplas brotações e o número médio de brotos por calo diminuiu significativamente com o aumento da idade dos explantes. Esse mesmo autor elucida que, os tecidos de diferentes idades podem ter diferentes níveis de hormônios endógenos e, portanto, a idade de explantes teria um impacto crítico sobre a eficiência de regeneração.

O tipo de tecido a ser utilizado para a propagação *in vitro* de plantas deve ser considerado também como fator de relevante importância. O explante utilizado para o desenvolvimento do referido estudo foi o ápice caulinar de plantas de pinhão manso, escolha justificável por diversos fatores tais como: tecido jovem e em constante crescimento, indução de plantas homogêneas e capazes de induzir múltiplas brotações (ARAGÃO e RECH, 1997), micropropagação rápida e sucesso na transformação genética mediada por *Agrobacterium* e métodos diretos de transferência de DNA (STICKLEN e ORABY, 2005).

A 6-benzilaminopurina (BAP) é uma citocinina muito eficiente na multiplicação celular de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies: *Lychnophora pinaster* Mart (SOUZA et al., 2003); *Manihot esculenta* Crantz (FEITOSA et al., 2007; VIDAL, 2009); *Ricinus communis* L. (AIRES et al., 2008). Contudo, Figueiredo et al., (2001) elucida que o BAP tem sido frequentemente citado como indutor de proliferação de gemas adventícias e também como inibidor de alongamento.

O ácido giberélico é um tipo de regulador de crescimento que atua no alongamento de partes aéreas cultivadas *in vitro*, principalmente quando estas apresentam tamanho reduzido, impossibilitando a multiplicação e o enraizamento das estruturas regeneradas. Esse efeito também foi relatado em outras espécies como: *Paspalum notatum* (GRANDO et al., 2002); *Ricinus Communis* L. (CARVALHO et al., 2007); *Cedrela fissilis* Vell. (AMARAL, 2006); *Pongamia pinnata* (SUGLA et al., 2007); *Andrographis paniculata* Nees (PURKAYASTHA et al., 2008); *Anthurium andraeanum* Lind. (ANSANTE et al., 2011).

Ao final dessa investigação foi possível obter plantas inteiras de pinhão manso após aproximadamente dois meses de cultivo *in vitro*. No entanto há a necessidade de melhorias inerentes ao desenvolvimento do processo de micropropagação, principalmente na etapa de multiplicação das plantas.

5.1.5 - Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) no desenvolvimento de ápices caulinares provenientes de sementes maduras de *J. curcas* L.

No experimento descrito anteriormente observamos que, a utilização do ápice caulinar como explante isolados dos embriões dos diferentes estádios das sementes avaliados (25, 25-30, 30 DAP e maduras) não interferiram no desenvolvimento *in vitro* dos ápices caulinares. Além disso, o aumento gradativo das concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) propiciou os melhores resultados quanto ao número médio de gemas formadas. Com base nesses dados optou-se por fazer um novo estudo utilizando ápices caulinares, como tecido de origem, isolados de embriões de sementes maduras associado com diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹), com o objetivo de observar o comportamento de tais concentrações desse regulador de crescimento no desenvolvimento dos ápices caulinares de *J. curcas* L.

Inicialmente os embriões isolados das sementes maduras foram cultivados *in vitro*, em meio MS com ausência total de regulador de crescimento e após quatro dias, aqueles que apresentavam aspectos saudáveis tiveram seus ápices caulinares isolados e transferidos para o meio de regeneração de parte aérea (Figura 8A). Como já ocorrido nos experimentos descritos anteriormente, houve nos primeiros dias intumescimento dos ápices, primeiro indício de desenvolvimento do explante isolado.

Os dados relacionados ao número médio de gemas, comprimento médio do broto principal (cm) e comprimento médio da parte aérea (cm) obtidos após 30 dias de cultivo, foram submetidos à análise de regressão para avaliação do comportamento das diferentes concentrações de BAP no desenvolvimento de ápices caulinares de pinhão manso.

Para todas as características analisadas a concentração de 1 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) foi a mais eficiente (Figura 9A, 9B e 9C). Vale ressaltar

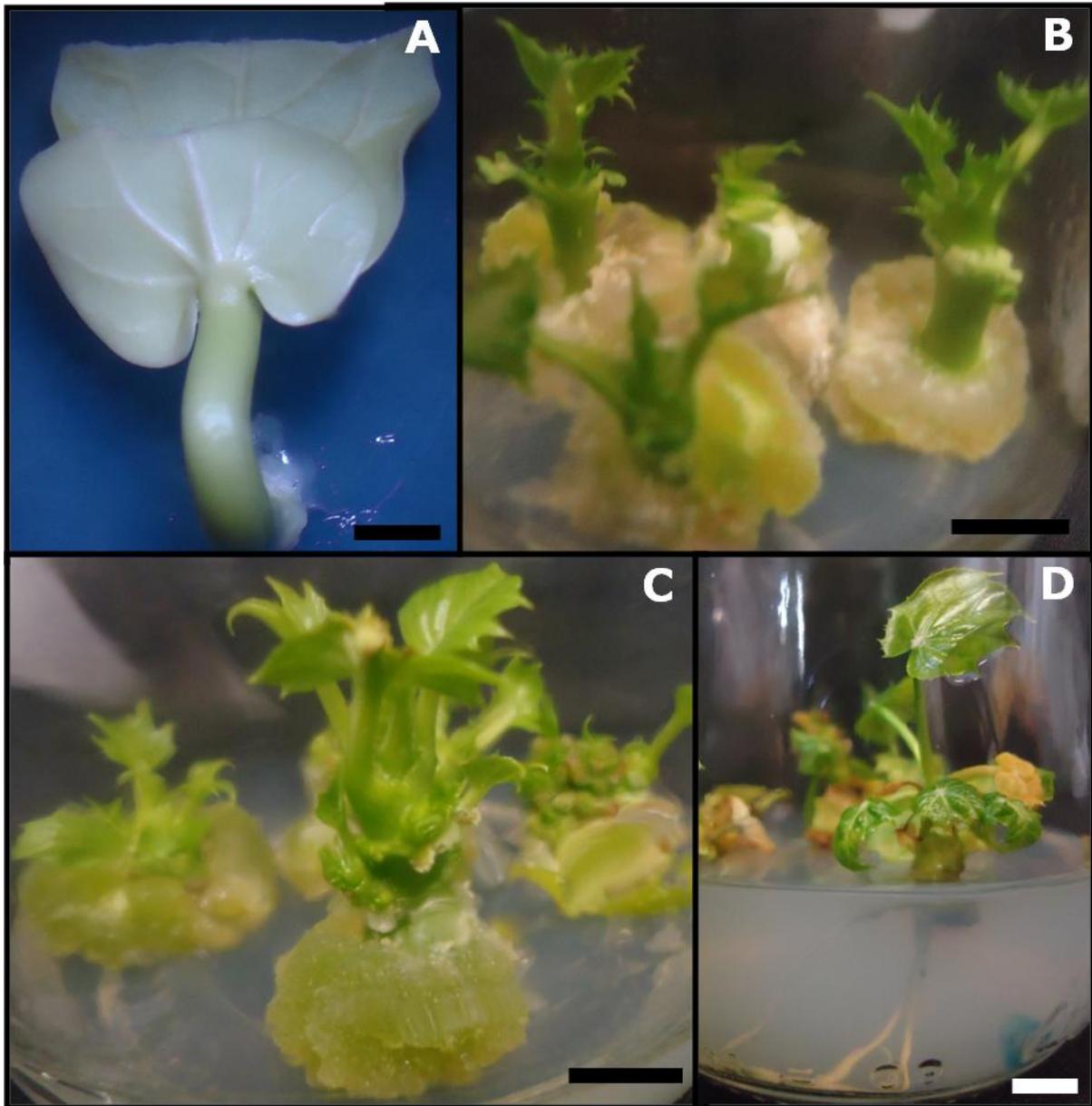


Figura 8 – Regeneração *in vitro* de plantas de *Jatropha curcas* L. **(A)** Embrião de semente madura de pinhão manso germinado *in vitro* em meio MS 0 (com ausência de regulador de crescimento) por quatro dias. **(B)** Partes aéreas de pinhão manso após 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com 1 mg.L^{-1} de BAP (6-benzilaminopurina). **(C)** Partes aéreas de pinhão manso alongadas em meio MS acrescido de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 **(D)** Plantas de *J. curcas* L. enraizadas em meio MS suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB (ácido indol-3-butírico), após aproximadamente 20 dias de cultivo. Barras: 2 mm para A; 1 cm para B-C; 5 mm para D.

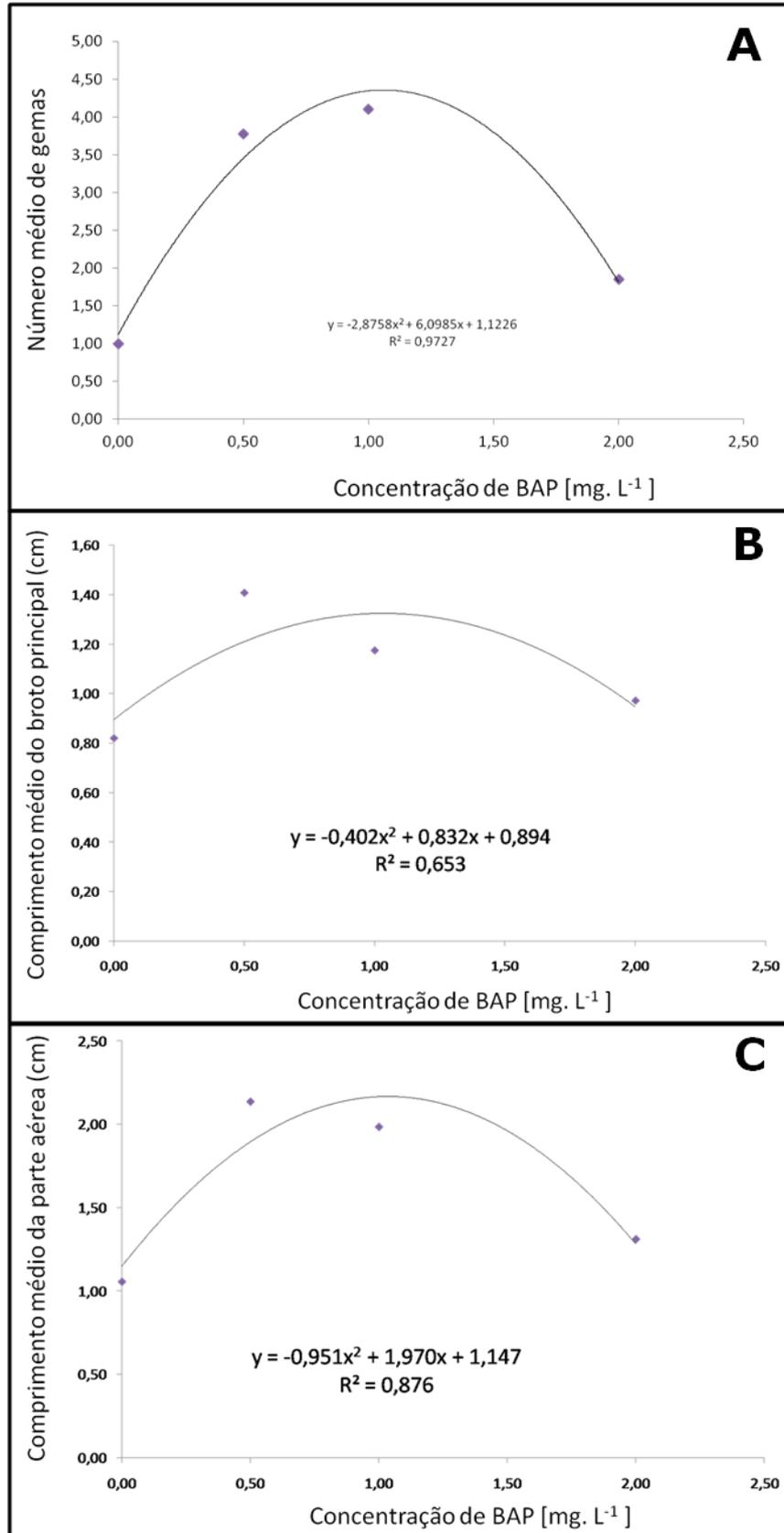


Figura 9 - Relação entre a formação do número médio de gemas **(A)**, comprimento médio do broto principal (cm) **(B)**, comprimento médio da parte aérea (cm) **(C)** por explante em função das diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L^{-1}), após 30 dias de cultivo, para a formação de partes aéreas de *Jatropha curcas* L.

que, ao atingir essa concentração, ocorreu uma queda gradativa do número de gemas, tamanho do broto principal e também do tamanho total das partes aéreas de pinhão manso. Esse fato pode ser explicado com o chamado efeito de saturação, ou seja, a utilização de concentrações de reguladores de crescimento acima do necessário acarreta efeito contrário, no caso, má formação das partes aéreas de *J. curcas* L. No cultivo *in vitro* são adicionados teores de hormônios exógenos sem a mensuração prévia da quantidade endógena de regulador de crescimento já contida naquele tecido, fazendo com que, a planta responda de diferentes maneiras de acordo com o equilíbrio dos reguladores de crescimento ali presentes.

O número médio de gemas formadas por cada explante foi de 1,0;3,78; 4,10 e 1,86, com relação ao tamanho médio das partes aéreas o comportamento foi semelhante com 1,06; 2,14; 1,99 e 1,31 cm quando submetido às concentrações de 0,0; 0,50; 1,00 e 2,00 mg.L⁻¹ de BAP respectivamente (Figura 9A e 9C). Esses resultados foram de encontro aqueles obtidos por Souza, et al., (2003) ao multiplicarem *in vitro* *Lychnophora pinaster* Mart, onde 1,0 mg.L⁻¹ de BAP propiciou número e tamanho de brotos menores. Além disso, esses apresentaram má formação e vitrificação também conhecida como hiperhidricidade, isso pode ocorrer com algumas espécies quando são adicionadas maiores concentrações de citocinina ao meio de cultura, causando certa toxidez. Em contrapartida concordaram com Vicente et al. (2009) ao multiplicar a espécie medicinal *Vernonia condensata* Baker. Neste caso, após 30 dias de cultivo observou-se maior taxa de explantes responsivos, 84% na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP, com produção de 4,0 brotos/explante.

No protocolo desenvolvido por PURKAYASTHA et al., (2010), utilizado como base para o referido estudo, os autores utilizaram meio MS suplementado com diferentes citocininas (BAP, KIN, TDZ e 2-iP) com o intuito de regenerar parte aérea de *J. curcas* L. a partir de explantes provenientes de sementes imaturas e, dentre essas, a que mostrou resultados mais satisfatórios foi a 6-benzilaminopurina (BAP) utilizadas na concentrações de 0,56 mg.L⁻¹ proporcionando ao final do período de cultivo valores de 2,4; 6,2; 4,1 e 3,5 número médio de partes aéreas por explante respectivamente. Ao analisar esses dados notamos que houve algumas distinções do estudo desenvolvido. De acordo com os dados obtidos, em todas as características estudadas determinou-se que a concentração de 1,0 mg.L⁻¹ foi superior e não a concentração de 0,56 mg.L⁻¹ de BAP como obtida pelos autores,

além disso como não houve diferença significativa entre as sementes maduras e imaturas determinou-se portanto o uso de sementes maduras para a obtenção de explantes que serão utilizados na regeneração de plantas de *J. curcas* L. Essas diferenças observadas podem ser justificadas pela utilização de genótipo distinto do empregado pelos autores acima citados, pois se sabe que a planta de pinhão manso ainda é considerada selvagem, não tendo cultivares definidas. Por isso, a necessidade de estudos a fim de se conhecer a genética dessa espécie é cada vez mais imprescindível. Essa ideia se reforça ainda mais tendo em vista que as exigências nutricionais requeridas para o crescimento de um tecido em condições *in vitro* variam de espécie para espécie, de variedade para variedade e até mesmo dentro da própria planta, necessitando-se, assim, aperfeiçoar os meios de cultura (NAGAO et al., 1994).

Outro aspecto observado foi o aparecimento acentuado de calos na base das partes aéreas cultivadas em meio MS acrescido da citocinina BAP excetuando apenas o tratamento com ausência total de regulador de crescimento (Figura 8B). Ao observar as estruturas foi possível notar que a quantidade de calo diminuía à medida que aumentava a concentração do regulador de crescimento corroborando com Madeira et al., (2005) que objetivou avaliar o efeito das concentrações de BAP e de GA₃ no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa, onde, segundo esses autores o aumento na concentração de BAP reduziu o tamanho dos calos formados na parte basal das plantas.

A formação excessiva de calos na base das partes aéreas em quaisquer que seja a cultura pode acarretar inúmeros problemas relacionados ao seu desenvolvimento. Segundo Grattapaglia e Machado (1998) a formação de calos na base do segmento nodal pode comprometer a proliferação de gemas axilares e afetar o enraizamento. Nesse mesmo sentido Castillo (1991) esclarece que um calo basal de tamanho excessivo é indesejável por ser potencial promotor de modificações genéticas e por exaurir os nutrientes do meio de cultura em detrimento da formação de folhas e raízes.

Os ápices caulinares desenvolvidos foram transferidas para meio MS contendo 0,3 mg.L⁻¹ de ácido giberélico, onde permaneceram por 10 dias, com o intuito de alongamento para posteriormente serem enraizadas (Figura 8C). Nessa fase foi realizado o subcultivo, onde as partes aéreas já alongadas foram divididas na região dos internódios onde havia gemas que apresentavam potencial para

vindouro desenvolvimento. Após esse procedimento, esse material foi colocado no meio de multiplicação, no caso meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, ou seja, aquela concentração de BAP que apresentou melhor desempenho no desenvolvimento dos ápices caulinares, permanecendo nesse meio por um período de 30 dias. Cada parte aérea só permitia a divisão em até duas gemas laterais, ou seja, uma parte aérea regenerada no meio inicial deu origem para duas partes aéreas subcultivadas (1:2). Vale ressaltar que de acordo com os dados cada parte aérea regenerada inicialmente desenvolveu aproximadamente cinco gemas laterais, mas por conta do reduzido espaço entre elas não era possível o corte, ficando evidente a ineficiência do alongamento acarretando assim problemas na fase subcultivo, inviabilizando, portanto a propagação em massa dessas plantas.

O enraizamento das brotações é fundamental para a obtenção de plantas aclimatadas e em condições de serem transferidas para campo (VICENTE, et al., 2009). Após o 30 dias de subcultivo as partes aéreas desenvolvidas foram transferidas para o meio de enraizamento (meio MS meia força adicionado de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB), e aproximadamente 15 a 20 dias após esse procedimento foi possível observar o aparecimento das primeiras raízes, mostrando portanto a eficiência do protocolo desenvolvido por PURKAYASTHA et al., (2010) (Figura 8D).

Mesmo com esses resultados é claramente necessária a melhoria na eficiência desse protocolo de regeneração. Vale ressaltar que o sucesso do enraizamento deve-se a eficácia de fases anteriores. No estudo aqui descrito identificamos o insucesso na fase de subcultivo das partes aéreas formadas inicialmente, devido principalmente à dificuldade de subdividi-las de modo a não danificar nenhuma das gemas ali presentes tendo em vista o reduzido espaço entre os internódios.

5.2 – Organogênese *in vitro* de *J. curcas* L. a partir de explante cotiledonar

5.2.1 Regeneração *in vitro*

O desenvolvimento de plantas *in vitro* de pinhão manso a muito vem sendo estudado através do estabelecimento de metodologias eficientes que visam regenerar a planta inteira. Na literatura é possível encontrar estudos que obtiveram sucesso, como é o caso de Khemkladngoen et al. (2011)a. A escolha para a

utilização desse trabalho em nossos estudos foi fundamentada na alta frequência de regeneração (aproximadamente 78%), além disso, a rapidez e a facilidade na execução das etapas demonstradas no processo regenerativo. Tomando por base esses resultados, verificou-se então a reprodutibilidade desse protocolo no genótipo utilizado. Logo, toda a metodologia utilizada nesse estudo foi baseada no protocolo citado acima.

5.2.1.1 Indução de parte aérea de *Jatropha curcas* L.

Após a germinação das sementes *in vitro* os cotilédones foram subdivididos em segmentos menores (Figura 10A) e colocados nas posições abaxial e adaxial em contato com o meio de cultivo MS acrescido de 3 mg.L^{-1} de BAP (6-benzilaminopurina) e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB (ácido indolbutírico) e mantidos nessa mesma formulação por seis semanas, para a formação de partes aéreas. A resposta inicial à exposição dos reguladores de crescimento foi claramente percebida na primeira semana de cultivo, onde os explantes mostraram expansão acentuada. A partir do quinto dia nessas condições, foi possível observar os primeiros indícios de formação de calos nas bordas dos explantes, principalmente nas regiões da nervura central (Figura 10B). Esses eventos ocorreram na totalidade dos explantes independente da posição em que foram inoculados no meio de cultura. Todas essas características também foram observadas por Khemkladngoen et al. (2011)a.

Posteriormente, a formação de estruturas que condizem com a organização de parte aérea foi observada no décimo quinto dia de cultura (Figura 10C). Essa gênese ocorreu nas regiões onde havia a presença de calos, ou seja, na região da nervura central em explantes que foram colocados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultivo (Figura 10D). Além disso, independente da posição do explante no meio, o tamanho e o número de brotações aumentaram nas semanas posteriores. Segundo Khemkladngoen et al. (2011)a a formação das partes aéreas foi observada na camada entre o calo e o tecido cotiledonar pela terceira ou quarta semana. Essa distinção relacionada ao tempo para o advento da estrutura primordial pode ser explicada pela diferença entre os genótipos utilizados no processo de regeneração *in vitro* de pinhão manso. A subcultura do material foi feita a cada duas semanas até totalizar as seis semanas (Figura 10E).

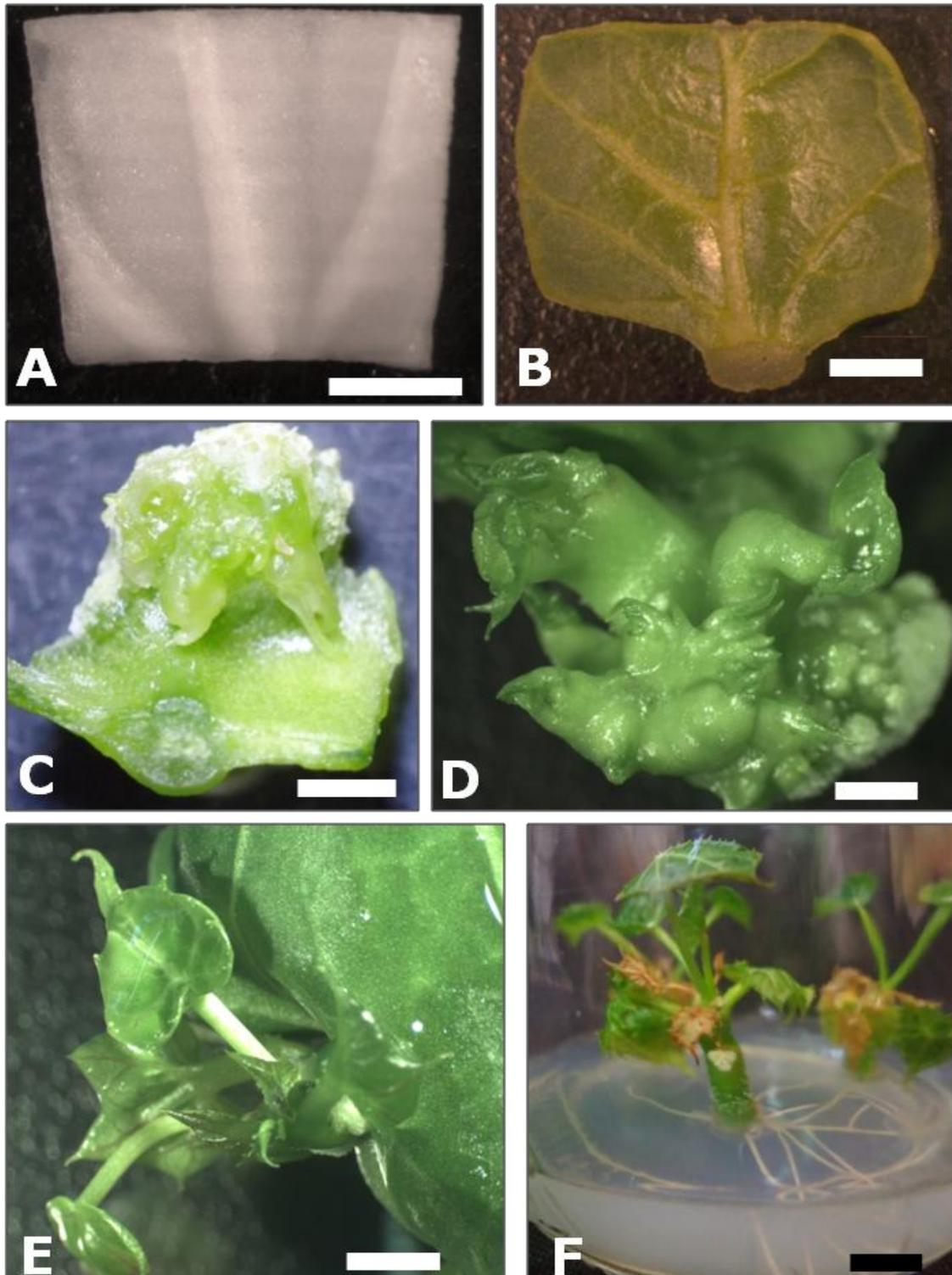


Figura 10 – Regeneração *in vitro* de *J. curcas* L. via organogênese. **(A)** Porção de cotilédone de pinhão manso, excisado de embrião germinado *in vitro*, a ser colocado no meio de regeneração de parte aérea. **(B)** Explante cotiledonar após cinco dias em meio de regeneração. **(C)**, **(D)** Formação de brotações após 15 e 25 dias em meio de regeneração de parte aérea de pinhão manso, respectivamente. **(E)** Parte aérea regenerada após seis semanas de cultivo *in vitro*. **(F)** Formação de raízes após duas semanas em meio de enraizamento. Barras: 2 mm para A-B-D-E; 1 mm para C e 5 mm para F.

Segundo Taiz e Zeiger (2006) uma baixa razão entre auxina e citocinina leva à formação de partes aéreas. Singh et al., (2010) afirmam em seu estudo, que meio MS suplemento com AIA em combinação com BAP foi considerada a melhor formulação para o alongamento, além disso, sugerem que o BAP em combinação com outras citocininas e até mesmo auxinas desempenham um papel importante na regeneração e alongamento de plantas de pinhão manso regeneradas *in vitro*. De acordo com Saravitz et al., (1993) a expansão do explante cotiledonar reflete a resposta induzida pela presença da auxina e citocinina em associação no meio de cultivo.

A utilização da combinação entre a citocinina BAP e a auxina AIB foi mostrada na indução de partes aéreas de *J. curcas* L. passando pela etapa de calo ou não (KAEWPOOA e TE-CHATO, 2009; KUMAR e REDDY, 2010; MAZUMDAR et al., 2010; MISRA et al., 2010). Vale ressaltar que, nos estudos citados, a combinação dos reguladores de crescimento (auxina e citocinina) teve como função estimular a formação de parte aérea, muito embora, acredita-se que somente a presença da citocinina no meio de cultivo fosse suficiente para a formação de parte aérea de pinhão manso principalmente quando se busca obter plantas regeneradas *in vitro* via organogênese direta. Em membros da família Euphorbiaceae tais como a *Manihot esculenta* Crantz (FEITOSA et al., 2007) e *Ricinus communis* L. (AIRES et al., 2008) a presença individual da citocinina BAP no meio de cultura foi eficiente na proliferação de brotações.

5.2.1.2 Alongamento e enraizamento das partes aéreas de *Jatropha curcas* L.

Após seis semanas em meio de cultura contendo 3 mg.L^{-1} de BAP e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, período destinado à regeneração, as partes aéreas de *J. curcas* L. foram transferidas para frascos de cultura acrescido de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina) e foram mantidas por quatro semanas, tendo como objetivo o alongamento. Ao final desse período os sinais de desenvolvimento em algumas plantas foram perceptíveis, enquanto outras não se desenvolveram satisfatoriamente, apresentando formação excessiva de calos e até mesmo oxidação de toda a estrutura.

As partes aéreas alongadas foram enraizadas em meio MS meia força acrescido de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB. A partir da primeira semana foi observado o

aparecimento das primeiras estruturas radiculares. Segundo Taiz e Zeiger (2006) as auxinas atuam no alongamento celular, sobretudo na promoção de raízes laterais e adventícias. É indispensável o uso dessa classe de regulador de crescimento quando se busca o enraizamento de parte aérea. O uso do AIB no enraizamento de partes aéreas de *J. curcas* L. micropropagadas *in vitro* pode ser observado nos estudos de diversos autores (DATTA et al., 2007; SINGH et al, 2010; KUMAR et al., 2011). Outro aspecto a ser considerado é o uso do meio de enraizamento com a redução de 50% dos sais ter sido eficaz na obtenção de raízes. Segundo Golle et al., (2012) a diminuição na quantidade de sais é considerada benéfica para a obtenção das raízes, isso pode estar ligado a alta relação carbono/nitrogênio (C/N), ou seja, redução da quantidade de nitrogênio e permanência da quantidade de carboidrato (sacarose) no meio de cultura.

5.2.2 - Efeito da posição dos explantes cotiledonares no meio de cultivo, para a formação de plantas inteiras de *J. curcas* L.

Ao final das seis semanas de cultivo foi realizada a contagem da quantidade de explantes que originaram parte aérea. De acordo com a análise estatística dos dados, a parte adaxial dos cotilédones em contato com o meio de cultivo apresentou diferenças significativas quanto à frequência de regeneração, onde 56% dos explantes formaram parte aérea, quando comparado à porção abaxial colocada em contato com o meio de cultivo, em que apenas 35% dos explantes deram origem a essa estrutura (Figura 11). Contrariamente, Mazumdar et al., (2010) observaram que, nas condições estudadas, os melhores resultados com *J. curcas* L. foram obtidos quando o lado abaxial da folha foi colocado em contato com o meio de cultura. Nesta posição, a regeneração obtida foi quase duas vezes maior que a dos explantes foliares cultivados com sua face adaxial em contato com o meio. Ainda segundo os autores os fatores que influenciaram significativamente a eficiência na indução de calos e na regeneração de plantas de pinhão manso a partir de segmentos de folhas cotiledonares utilizando meio suplementado com BAP e AIB foram, além da idade, a orientação (abaxial ou adaxial) dos explantes em cultura.

É sabido que o objetivo principal dos reguladores de crescimento é o de suprir possíveis deficiências nos teores endógenos de hormônio nos explantes isolados, além disso, visa a estimular certas respostas como a multiplicação da parte

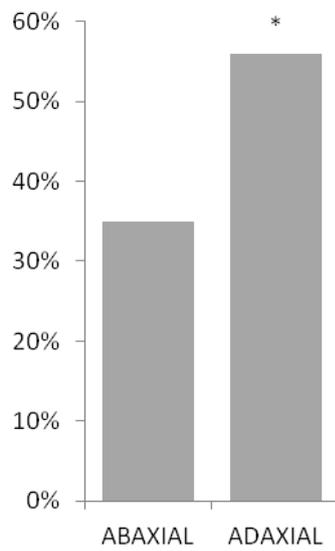


Figura 11 - Efeito da posição do explante cotiledonar sobre o percentual de regeneração de parte aérea de *Jatropha curcas* L. O asterisco (*) representa diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade. (abaxial n=138; adaxial n=150).

aérea ou a formação de raízes adventícias (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Nesse sentido, a resposta diferencial dos explantes pode ser atribuída à interação entre tipo de tecido e a concentração endógena de reguladores de crescimento (KAEWPOOA e TE-CHATO, 2009).

5.3 Análise histológica da organogênese de *J. curcas* L.

Nos resultados descritos anteriormente, observou-se que a posição adaxial do tecido de origem em contato com o meio de cultivo proporcionou maior frequência de regeneração (56%). Além disso, ensaios preliminares indicaram que as partes aéreas surgiam em regiões onde as nervuras eram proeminentes. Dessa forma, os explantes foram excisados nas regiões contendo a nervura mediana em intervalos selecionados sequencialmente de 0, 5, 10, 15 e 25 dias após o período de cultivo.

As folhas cotiledonares de *J. curcas* L., coletadas no tempo zero (controle) são anfiestomáticas e apresentam epiderme unisseriada. Em ambas as faces do cotilédone a epiderme apresentou células pequenas, justapostas, com citoplasma denso e vacúolos diminutos. O mesofilo dorsiventral (Figura 12A) é constituído por parênquima paliçádico unisseriado e parênquima esponjoso constituído por aproximadamente oito camadas de células. Na nervura central, o parênquima subjacente à epiderme da face adaxial apresentou células grandes e vacuoladas enquanto àquelas próximas à epiderme da face abaxial eram pequenas e de citoplasma denso. Na região mediana (nervura central) observou-se um feixe vascular semicircular formado pelo xilema e floema.

Após cinco dias em meio de regeneração de partes aéreas suplementado com BAP (3 mg.L^{-1}) e AIB ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) apresentaram-se os primeiros indícios de mudanças no explante cotiledonar. Essas mudanças ocorreram no parênquima da nervura central que passaram a apresentar citoplasma denso (Figura 12B). Tais alterações foram, também, acompanhadas da expansão nas células do parênquima paliçádico e demais células do parênquima esponjoso da lâmina foliar o que pode explicar o aumento no tamanho do explante original (Figura 12B).

As primeiras divisões celulares foram observadas após 10 dias de permanência do explante no meio suplementado com BAP (3 mg.L^{-1}) e AIB ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). Essas divisões foram encontradas no parênquima na região da nervura central

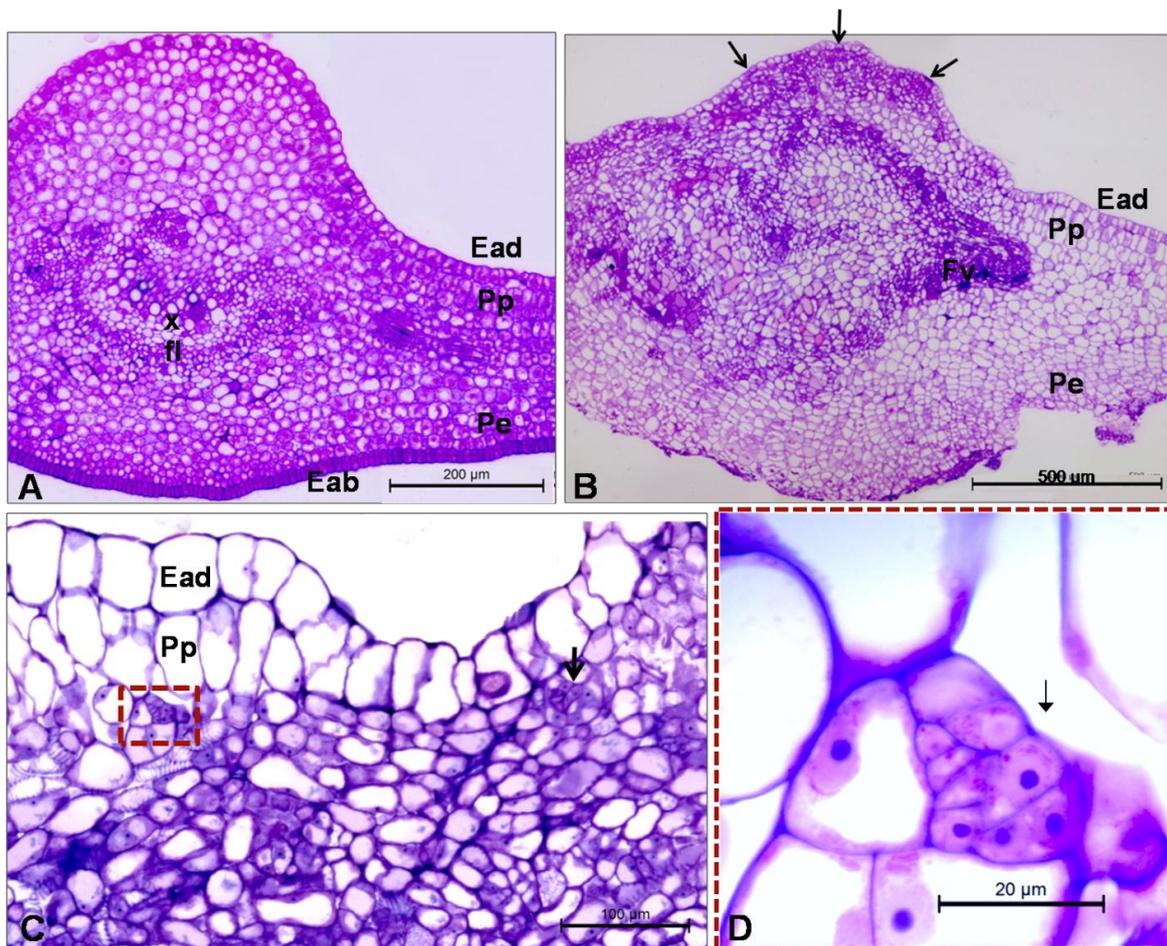


Figura 12 - Secções transversais de cotilédones de *J. curcas* colocados em meio de regeneração de partes aéreas em estágios iniciais da organogênese direta. **(A)**. Explante inicial. Ead - epiderme adaxial; Eab - epiderme abaxial; Pp – parênquima paliçádico; Pe – parênquima esponjoso; x – xilema; fl – floema. **(B)**. Explante após cinco dias de permanência no meio de regeneração. Ead - epiderme adaxial; Fv – feixe vascular; Pp – parênquima paliçádico; Pe – parênquima esponjoso; setas indicam células com citoplasma denso no parênquima subjacente à epiderme adaxial. **(C)**. Explante após 10 dias de permanência no meio de regeneração. Ead - epiderme adaxial; Pp – parênquima paliçádico; seta e quadrado pontilhado indicam divisão celular. **(D)**. Ampliação da região em destaque na figura C. Seta indica grupo de células meristemáticas em divisão celular.

logo abaixo da epiderme da face adaxial e também no parênquima esponjoso da região da lâmina foliar (Figura 12C e 12D). As células em divisão mostraram-se pequenas, com citoplasma denso, vacúolos pequenos, núcleo grande e nucléolo proeminente, características típicas de células meristemáticas.

A sequência de divisões das células com características meristemáticas deu origem a uma protuberância que rompeu a epiderme cotiledonar (Figura 13E). As características das células dessa nova estrutura são similares às aquelas observadas em meristemas apicais especialmente no promeristema.

Após 15 dias de permanência dos explantes no meio de regeneração, a expansão e o desenvolvimento da protuberância levaram a organização de meristemas apicais caulinares e primórdios foliares (Figuras 13F, 13G e 13H). Nesse período, observou-se a formação de um cordão de células meristemáticas que se estendia da parte aérea em desenvolvimento até o feixe vascular do explante (Figura 13F). Além disso, observou-se a presença de meristemas em diferentes fases de desenvolvimento o que indica a formação assíncrona de partes aéreas em *J. curcas*.

Partes aéreas completamente desenvolvidas foram observadas após 25 dias do explante no meio de cultivo (Figura 13H). Nessa fase, o meristema está bem organizado, composto de túnica e corpo, meristema fundamental, procâmbio e os primórdios foliares formados. As novas partes aéreas formadas, comumente apresentaram-se conectadas ao sistema vascular do explante parental (Figura 16H).

No decorrer do processo organogênico *in vitro* independente do explante a ser utilizado, é possível distinguir três etapas básicas, a primeira delas refere-se à aquisição de competência morfogênica, a segunda e a terceira referem-se à determinação das células após a aplicação exógena dos reguladores de crescimento e a diferenciação morfológica, respectivamente (CHRISTIANSON e WARNICK 1983; PRATHANTURARUG et al., 2007). As primeiras mudanças ocorreram com cinco dias de incubação do explante no meio de regeneração, no qual as células anteriormente vacuoladas apresentaram citoplasma denso, o que indica o início da formação de células meristemáticas, portanto, esse aspecto pode ser interpretado como o início da etapa de competência morfogênica.

Nesse estudo, a organização das células meristemáticas foi observada principalmente no limbo foliar logo abaixo do parênquima paliçádico e também no parênquima da nervura mediana, ambas próximas à região da epiderme da face

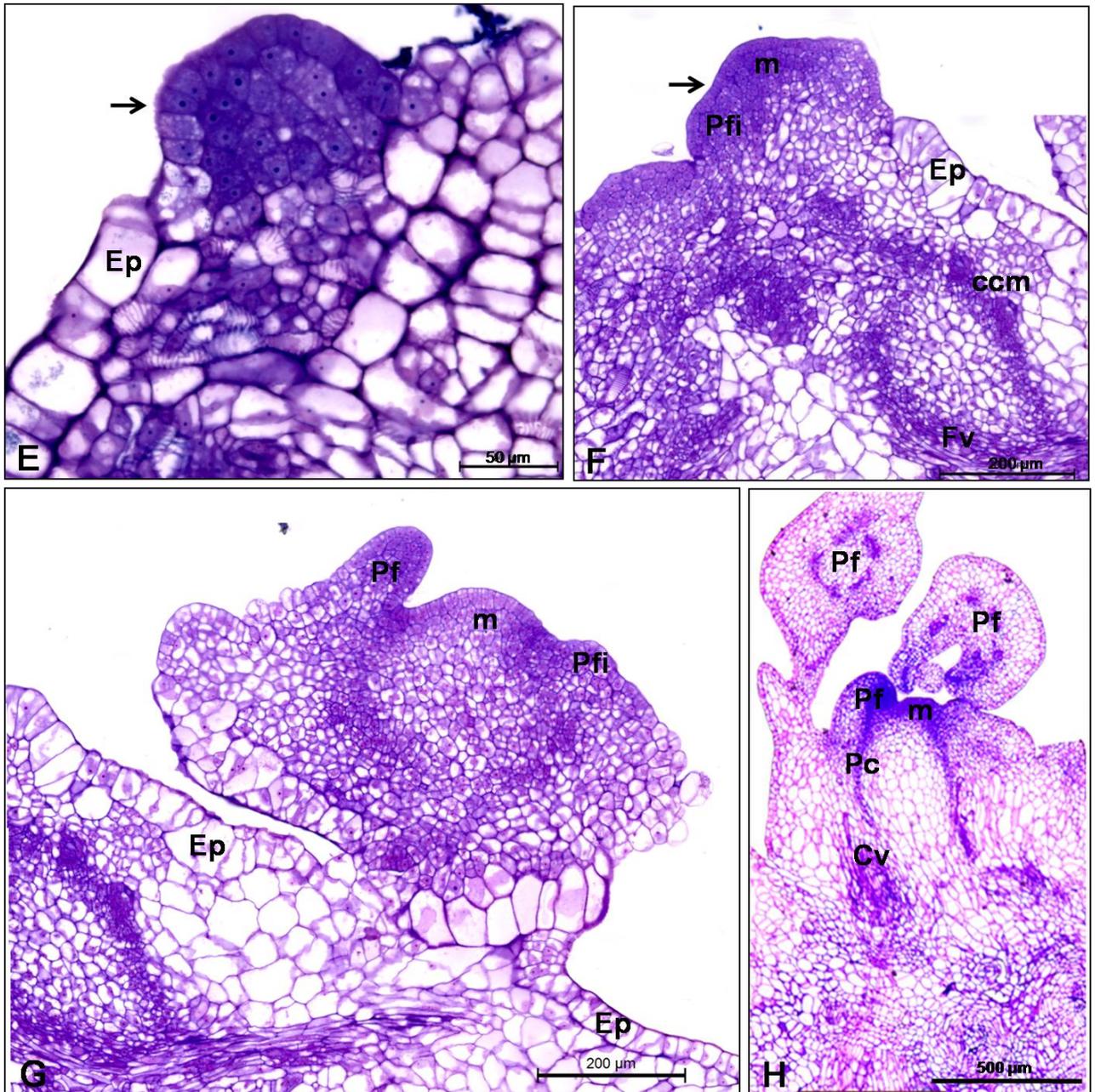


Figura 13 - Secções transversais de cotilédones de *J. curcas* L. colocados em meio de regeneração de partes aéreas em estágios avançados da organogênese direta. **(E)**. Explante após 10 dias de permanência no meio de regeneração. Ep. Epiderme; seta indica protuberância rompendo a epiderme. **(F)** e **(G)**. Explante após 15 dias de permanência no meio de regeneração. ccm – cordão de células meristemáticas; seta indica o início de organização do meristema. Ep – epiderme; m – meristema; Pf – primórdio foliar; Pfi – primórdio foliar incipiente. **(H)**. Partes aéreas adventícias completamente formadas após 15 dias de permanência do explante no meio de regeneração. Cv – conexão vascular; Pc – procâmbio; Pf – primórdio foliar; m – meristema.

adaxial do explante cotiledonar de pinhão manso. O mesmo comportamento foi descrito por Gloria et al. (1999) ao estudarem os processos anatômicos da organogênese de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., onde células meristemáticas originavam-se do parênquima fundamental adjacente a superfície adaxial, especialmente nas camadas subepidérmicas próximas a nervura central. Essa mesma observação foi feita por Saravitz et al. (1993) ao induzir formação de brotações adventícias *in vitro* de Fraser fir (*Abies fraseri*). De maneira contrária, Nogueira et al. (2011) ao induzir a organogênese de *J curcas* L. observaram que o processo de regeneração ocorreu na região abaxial do explante cotiledonar, onde verificou-se a presença de células meristemáticas em ativa divisão celular.

Pequenos aglomerados de células meristemáticas em intensa divisão foram observados nas camadas superficiais do parênquima da região adaxial, os quais se localizavam próximos um do outro. Esse fato justifica a formação de partes aéreas adjacentes. Segundo Ghimire et al., (2010) essa proximidade indica a presença de múltiplas células competentes perto umas das outras. Outro fator observado nesse estudo foi a falta de sincronia na regeneração de partes aéreas de pinhão manso. O processo assíncrono baseia-se na aquisição das diferentes fases de competência e determinação das células em um mesmo explante (LOMBARDI et al., 2007) ou seja, essas diferentes fases podem ser visualizadas em um mesmo estágio de desenvolvimento da organogênese *in vitro*.

A Figura 13 E mostra a protuberância constituída de células com características meristemáticas rompendo a epiderme do explante. Este rompimento da camada epidérmica da folha cotiledonar deve-se ao desenvolvimento da protuberância, não estando as células da epiderme relacionadas diretamente ao processo de regeneração do pinhão manso. De maneira análoga Nogueira et al., (2011) observaram o rompimento da camada epidérmica do explante cotiledonar após 12 dias de incubação em meio de competência organogênica, enquanto que nessa investigação esse acontecimento ocorreu no décimo dia de incubação dos explantes em meio de regeneração de parte aérea.

Ao iniciar a formação dos meristemas observou-se a presença de um cordão de células meristemáticas que se estendia da parte aérea em desenvolvimento até o feixe vascular do explante cotiledonar de pinhão manso. De maneira semelhante Glória et al., (1999) observaram esse comportamento. No entanto, esses autores elucidam que, mesmo havendo divisão próxima ao sistema

vascular, as estruturas meristemáticas que deram origem as partes aéreas originavam-se das camadas mais periféricas no qual apresentavam células de tamanho reduzido, citoplasma denso e núcleo proeminente. De maneira contrária Hervé et al., (2001) observaram que as partes aéreas de eucalipto (*Eucalyptus gunnii*) regeneradas a partir de explantes foliares tiveram origem no sistema vascular do explante, muito embora, não se pode descartar a hipótese de que células do parênquima também estariam envolvidas no processo regenerativo.

A sequência de mudanças ocorridas em células parenquimáticas, especificamente aquelas do parênquima esponjoso subjacente à epiderme adaxial nos leva a concluir que as partes aéreas adventícias de pinhão manso originaram-se via organogênese direta. Além disso, verificou-se uma conexão entre o sistema vascular da estrutura formada com o sistema vascular do explante cotiledonar de *J. curcas* L. Essa conectividade entre os feixes vasculares dos brotos com o explante também foi observada em *Passiflora edulis* Sims (ROCHA et al., 2012) e em *Orthophytum mucugense* (LIMA et al., 2012) levando esses autores a afirmarem que a regeneração dessas espécies ocorreu via organogênese direta.

A ontogenia das partes aéreas de pinhão manso se deu a partir da intensa divisão celular da região parenquimática próxima à região adaxial do explante cotiledonar. Observou-se também que a existência de células meristemáticas junto ao sistema vascular sugere que a origem da parte aérea regenerada de pinhão manso seja multicelular. Nogueira et al. (2011) também verificaram esse comportamento, onde células do parênquima e também células ao redor do sistema vascular mostraram ativa divisão celular levando os autores a afirmar que o processo de regeneração de pinhão manso *in vitro* tem origem multicelular. No entanto, Khemkladngoen et al. (2011)b ao desenvolver um protocolo de transformação genética de *J. curcas* L. mediado por *Agrobacterium* utilizando o protocolo de regeneração desenvolvido por Khemkladngoen et al. (2011)a, protocolo em estudo no trabalho aqui descrito, observaram que a expressão do gene *GUS* foi estável não apresentando a formação de estruturas quiméricas. Nesse caso, esse comportamento pode indicar que as plantas de pinhão manso regeneradas *in vitro* tenham origem unicelular. Vale ressaltar que é comum o relato de que processos organogênicos tenham origem multicelular, no entanto essa origem pode ser unicelular (ALMEIDA et al., 2002). Com isso fica evidente a necessidade de estudos mais aprofundados que nos levem a uma clara conclusão, pois essa informação

será de grande valia para a escolha das metodologias a serem utilizadas nos processos de transformação genética da cultura do pinhão manso em estudos posteriores.

Diante do exposto, ficou evidente que a regeneração de *J. curcas* L. ocorre diretamente. Khemkladngoen et al. (2011) estabeleceram o protocolo que está sendo testado e analisado. Esses autores deram indícios de que a regeneração do pinhão manso ocorreu por via direta, ou seja, a formação das partes aéreas foi observada entre o calo e o tecido cotiledonar utilizado como explante. No entanto não houve a realização de estudos anatômicos que confirmassem a origem das estruturas regeneradas. Isso indica a importância de se aliar estudos histológicos com a ontogenia de partes aéreas regeneradas *in vitro*, pois assim darão o suporte necessário as pesquisas nessa área.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que é possível a regeneração *in vitro* de pinhão manso via ápice caulinar. Para tal, o desenvolvimento do ápice caulinar deve ser feito com a utilização da citocinina BAP (6-benzilaminopurina), seguido do alongamento com a utilização do ácido giberélico (GA₃) e por fim o enraizamento com a auxina AIB (ácido-indol-butírico). Adicionalmente, não houve interferência do estágio de desenvolvimento das sementes para isolamento do embrião, fonte de explante, no desenvolvimento de ápices caulinares *J. curcas* L.

A regeneração das partes aéreas foi obtida com êxito ao utilizar o explante cotiledonar na posição adaxial em contato com o meio de cultivo. Além disso, os estudos anatômicos permitiram a compreensão do processo organogênico do protocolo estudado, em que células parenquimáticas próximas à região adaxial do explante cotiledonar entraram em processo de divisão celular até formarem as partes aéreas de *Jatropha curcas* L. Assim sendo, a organogênese ocorreu via organogênese direta e possivelmente apresenta origem multicelular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 37. p.260-258, 2008.
- AIRES, P. S. R.; CARVALHO, J. M. F. C. C.; PIMENTEL, N. W.; SILVA, H. Efeito da citocinina 6-bencilaminopurina na micropropagação in vitro da mamona utilizando o genótipo BRS nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, 2008.
- ALMEIDA, W. A. B; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. **Scientia Agricola**, v. 59 p.35-40, 2002.
- ALVES, J. M. A; SOUSA, A. A.; SILVA, S. R. G.; LOPES, G. N.; SMIDERLE, O. J.; UCHÔA, S. C. P. Pinhão-manso: Uma alternativa para a produção de Biodiesel na agricultura familiar da Amazônia brasileira. **Agro@ambiente On-line**, v.2, 2008.
- AMARAL, V. F. M. **Multiplicação in vitro de *Cedrela fissilis* Vell.** 2006 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos.** Embrapa Cerrados, Planaltina, 2002.
- ANSANTE, F. N.; LIMA, J. D.; NORUMA, E.; FUZITANE, E.J. Uso da giberelina na cultura de tecidos. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 2011.
- ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of a Carioca cultivar. **International Journal of Plant Sciences**, v. 158, n. 2, p. 157-163, 1997.
- ARAÚJO, L. G.; SOUSA, K. C. I. Pinhão manso para produção de biodiesel. **Revista Anhangüera**. v.9 n.1, p.95-119, 2008.
- ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**. v.8, p.789-799, 2004.
- BELTRÃO, N. E. M. Considerações gerais sobre o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras. 2006 Disponível em:< www.mda.gov.br>. Acesso em: 21 de ago. 2012.
- BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S.; Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresour. Technol.** 99, 1716–1721. 2008

BRUM, G.R.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação in vitro da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência Agrotécnica**, v.26, n.2, ed.esp., p.1403-9, 2002.

CAMPOS, A. X. . Avaliação dos aspectos fenológicos e da produção de massa seca da espécie de plântulas de Pinhão manso (*Jatropha curcas*), após aplicação de resíduos orgânicos, corretivos e fertilizantes minerais. **In: 1º Congresso Brasileiro de Pesquisa em pinhão manso**. Brasília-DF: CBPPM/EMBRAPA, 2009.

CARVALHO, J. M. F. C.; AIRES, P. S. R.; PIMENTEL, N. W.; SILVA, H.; SANTOS, J. W. Micropropagação In Vitro de *Ricinus Communis* L. Utilizando a Citocinina (6-Bencilaminopurina). Campina Grande: Embrapa - CNPA (**Embrapa-CNPA. Documento, 84**). 18 p, 2007.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais. Campina Grande: Embrapa - CNPA (**Embrapa-CNPA. Documento, 116**). 42 p, 2003.

CASTILLO, R. Manejo e conservação de germoplasma de tuberosas andinas. **Informe final de consultoria para el Centro Internacional de La Papa (CIP)**. CIP: Quito, 1991.

CASTRO, C. M.; DEVIDE, A. C. P.; ANACLETO, A. H. Avaliação de acessos de pinhão manso em sistema de agricultura familiar. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**. 2008.

CEASAR, S. A.; IGNACIMUTHU, S. Applications of biotechnology and biochemical engineering for the improvement of *Jatropha* and Biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.15 p.5176– 5185, 2011.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Competence and determination in the process of in vitro shoot morphogenesis. **Dev. Biol.** 95: 288–93, 1983.

CID, L. P. B. A propagação in vitro de plantas. O que é isso? **Biociência & Desenvolvimento**, 2001.

DATTA, M. M.; MUKHERJEE, P.; GHOSH, B.; JHA, T. B. In vitro clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). **Current Science**, v.93, n.10, p.1438-442, 2007.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA J. A.; TEIXEIRA, A. A.; GOMES, E. D.; Hernandez, F. F. Ácido giberélico (GA3) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento in vitro de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 934-938. 2003.

DIVAKARA, B.N., UPADHYAYA, H.D.;WANI, S.P.GOWDA, C.L.L., Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L: a review. **Applied Energy**,v.87, n.3, p 732-742, 2010.

DODE, L. B.; DONINI, L. PINTO, L. S.; BOBROWSKI, L.; TAVARES, V. R. S.; KREMER, F. S.; ANJOS & SILVA, S. D. Cultivo in vitro de pinhão-manso. **IN: II Congresso Brasileiro de Pesquisas de pinhão-manso**, Brasília- DF, 2011.

DRUMOND, M. A. MARTINS, J.; ANJOS, J.B.; MORGADO, L.B. Germinação de sementes de pinhão manso em condições de viveiro no Semi-árido pernambucano. **In: I Congresso Internacional de Agroenergia e Biocombustíveis**, Embrapa Meio Norte. Anais, 2007.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Ação da 6-benzilaminopurina e da qualidade da luz na FARIAS, M. P. **Estudos preliminares do protocolo de micropropagação do pinhão-manso (*Jatropha curcas*)**. 130f. 2008. Monografia- Instituto Ideal, Santa Catarina. 2008.

FARIAS, M. P. Estudos preliminares do protocolo de micropropagação do pinhão-manso (*Jatropha curcas*). 13f. 2008. **Monografia- Instituto Ideal**, Santa Catarina.

FEITOSA, T.; BASTOS, J. L. P.; PONTE, L. F. A.; JUCÁ, T. L.; CAMPOS, F. A. P. Somatic Embryogenesis in Cassava Genotypes from the Northeast of Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 50, n. 2, p. 201-206, 2007.

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R.C. Micro propagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**. v. 37. p. 4 71-475, 2001.

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação in vitro de *Ficus carica* L.: Efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.

GHIMIRE, B. K. SEONG, E. S.; GOH, E. J.; KIM, N. Y.; KANG, W. H.; KIM, E. H.; YU, C. Y.; CHUNG, I. M. High-frequency direct shoot regeneration from *Drymaria cordata* Willd. Leaves. **Plant Cell Tiss Organ Cult** v. 100 p.209–217, 2010.

GLORIA, B. A.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of in vitro organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.34, n.11, p.2007-2013, 1999.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e Desenvolvimento *In vitro* de *Eugenia involucrate* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria. v.22, n.1, p.207-214, 2012.

GRANDO, M. F.; FRANKLIN, C. I.; SHATTERS, R. G. Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from 'Tifton 9' bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) seed explants for genetic manipulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.**, v.71 p.213-222. 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, A. (Org.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1 ed. Brasília:Embrapa- SPI, 1998.

HELLER, J. Physic Nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. **Institute of Plant Genetics and Crop Research, & International Plant Genetic Resource Institute**, 1996.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N. BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science** v. 161 p. 645–653, 2001.

HU, C.Y., WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breedings**. New York, Mac-Millan, v. 1, p. 117-227. 1984.

JHA, T. B.; MUKHERJEE, P.; DATTA, M. M. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. **Plant Biotechnol Rep**, v.1, p.135-140, 2007.

KAEWPOOA, M.; TE-CHATO, S. Influence of explant types and plant growth regulators on multiple shoot formation from *Jatropha curcas* L. **ScienceAsia** 35. v.35 p. 353-357. 2009.

KALIMUTHU, K.; PAULSAMY, S.; SENTHILKUMAR, R.; SATHYA, M. In vitro Propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. **Plant Tissue Cult. & Biotech.** v. 17 n. 2 p.137-147, 2007.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v.27, p.137-138, 1965.

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

KHEMKLADNGOEN, N. CARTAGENA, J. A.; FUKUI, K. Physical wounding-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of juvenile cotyledons of a biodiesel-producing plant, *Jatropha curcas* L. **Plant Biotechnol Rep** v. 5 p. 235–243, 2011b.

KHEMKLADNGOEN, N.; CARTAGENA, J.; SHIBAGAKI, N.; FUKUI, K. Adventitious shoot regeneration from juvenile cotyledons of a biodiesel producing Plant, *Jatropha curcas* L. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 111, n. 1, p. 67–70, 2011a.

KING, A.J.; HE, W.; CUEVAS, J. A.; FREUDENBERGER, M.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, L.A. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.10, p.2897-2905, 2009.

KUMAR, N.; ANAND, K. G. V.; REDDY, M. P. Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. **Acta Physiologiae Plantarum** v. 32, p. 917–924, 2010.

- KUMAR, N.; ANAND, V.; REDDY, M. P. In vitro regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. **Industrial Crops and Products**, India, v. 33, p. 146–151, 2011.
- KUMAR, N.; REDDY, M. P. Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. **Annals of Applied Biology**. v.156 p.367–375. 2010.
- KUMARI, K. G.; GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Somatic organogenesis and plant regeneration in *Ricinus communis*. **BIOLOGIA PLANTARUM** v. 52 p.17-25, 2008.
- LI, M.; LI, H.; Jiang, H.; PAN, X.; WU, G. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v.92, p.173-181, 2007.
- LIMA, C. O. C.; MARCHI, M. N. G.; BRITO, A. L.; CARNEIRO, C. E.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, v.42, n.2, fev, 2012.
- LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. R. S.; NOGUEIRA, M. C. S.; GLÓRIA, B. A. In vitro Shoot Regeneration from Roots and Leaf Discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v.50, n. 2 p.239-247, 2007.
- MADEIRA, N. R.; TEIXEIRA, J. B.; ARIMURA, C. T.; JUNQUEIRA, C. S. Influência da concentração de BAP e AG3 no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.982-985, 2005.
- MAJADA, J. P.; FAL, M. A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Gaithersburg, v.33, p.62-69, 1997.
- MAKKAR H. P. S.; ADERIBIGBE A. O.; BECKER K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry**. v. 62, p. 207–215, 1998.
- MAO, HZ; YE, J; CHUA, NH. Genetic transformation of *Jatropha curcas*. **International Application**. No.:PCT/SG2009/000479. U.S.A., 2009.
- MARTINEZ-HERRERA, J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G.; DAVILA-ORTIZ, G.; BECKER, K. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **Food Chemistry**. v. 96, p.80–89, 2006.
- MAZUMDAR, P.; BASU, A.; PAUL, A.; MAHANTA, C.; SAHOO, L. Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of de novo plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in *Jatropha curcas* L. **South African Journal of Botany**. v.76, p. 337–344, 2010.

MISRA, P.; TOPPO, D. D.; GUPTA, N.; CHAKRABARTY, D.; TULI, R. Effect of antioxidants and associate changes in antioxidant enzymes in controlling browning and necrosis of proliferating shoots of elite *Jatropha curcas* L. **Biomass and Bioenergy**. v. 34 p. 1861-1869, 2010.

MOTHÉ, C. G.;CORREIA, D. Z.; CASTRO, B. C.S.;CAITANO, M. Otimização da produção de biodiesel a partir de óleo de mamona. **Revista Analytica**, n. 19, 2005.

MOURA, T. L.; ALMEIDA, W. A. B.; MENDES, B. M. J.; FILHO, F. A. A. M. Organogênese in vitro de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura Jaboticabal**, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, p.473- 97, 1962.

NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta-enxerto de citros. *Bragantia*, v.53, n.1, p.25-31, 1994.

NEVES, C.S.V.J.; MEDINA, C. de C.; AZEVEDO, M.C.B. de.; HIGA, A.R.; SIMON, A. Efeitos de substratos e recipientes utilizados na produção das mudas sobre a arquitetura do sistema radicular de árvores de cácianegra. **Revista Árvore**, v.29, n. 6, p.897-905, 2005.

NEVES. W. S.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P. A.; LOPES, E. A. Avaliação Fitossanitária de Sementes de Pinhão-Manso Provenientes dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** v. 3, n. 2, p. 17, 2009.

NOGUEIRA, A. R. C.; SOARES, A. A.; IBRAHIM, A. B.; CAMPOS, F. A. P. Analysis of organogenic competence of cotyledons of *Jatropha curcas* and their in vitro histological behavior. **African Journal of Biotechnology** Vol. 10(54), pp. 11249-11258, 2011.

NUNES, C.F. Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Lavras, 78p., 2007.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v.19, p.1-15, 2000.

PALMA, D.; SCHUELTER, A. R. STEFANELLO, S.; FORTES, A. M. T. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. **Bras. Agrociência**, Pelotas, v.17, n.2-4, p.174-184, 2011.

PAN, J.; FU, Q.; XU, Z. F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of biofuel plant *Jatropha curcas* using kanamycin selection. *African Journal of Biotechnology*. v. 9, p. 6477-6481, 2010.

PARAWIRA, W. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review. **Scientific Research and Essays**, 5 (14), 1796-1808. 2010.

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

PASQUAL, M.; LOPES, P. A.; ARELLO, E. F.; BARROS, I. Influência de 6-Benzilaminopurina, sacarose e ágar sobre a vitrificação de brotos de pereira in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.1919-1924, 1991.

PEREIRA, R. C. A.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CASTRO, E. M.; SILVA, F. G. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento in vitro de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (unha-de-gato). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.4, p.637-642, 2006.

PERES L. E. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da Pesquisa: Um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos: regeneração de plantas in vitro. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 25, I 2002.

PRATHANTURARUG, S.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHUAKUL, W.; PHAIDEE, Y.; SARALAMP, P. An improved protocol for micropropagation of *Mallotus repandus* (Willd.) Müll.Arg. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**. v. 43 p.275–279, 2007.

PURKAYASTHA, J.; SUGLA, T.; PAUL, A.; SOLLETI, S. K.; MAZUMDAR, P.; BASU, A.; MOHOMMAD, A.; AHMED, Z.; SAHOO, L. Efficient in vitro plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. **BIOLOGIA PLANTARUM**. v.54 n.1 p.13-20, 2010.

RAJORE, S.; BATRA, A. Efficient Plant Regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. **Journal Plant Biochemistry e Biotechnology**. v. 14 p. 73-75. 2005.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C.; CARNEIRO, A. G.; FERREIRA, S. F. Indução in vitro de brotos em paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*). **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.4, n.1, p. 15-20, 2008.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Anatomical and ultrastructural analyses of in vitro organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell Tiss Organ Cult** v. 111 p. 69–78, 2012.

SAHOO, N.; THIRUNAVOUKKARASU, N.; BEHERA, P. R.; SATPATHY, G. B.; PANDA, P. K. Direct shoot organogenesis from hypocotyl explants of *Jatropha curcas* L. an important bioenergy feedstock. **Bioenergy**, v. 4, p. 234–238, 2012.

- SALVADOR, T. L.; SALVADOR, T. L., LEMOS, E. E. P. Micropropagação e desenvolvimento *in vitro* de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **EnerBiomassa'12**, Maceió, Alagoas, Brasil, 2012.
- SARAVITZ, C. H.; BLAZICH, F. A.; AMERSON, H. V. Histology of *in vitro* adventitious bud development on cotyledons and hypocotyls of *Fraser fir*. *J Am Soc Hortic Sci* v. 118 p. 163–167. 1993.
- SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 22, n.1, p. 99-118, 2008.
- SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N.P. Cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Brasil, v.26, n.229, p.44-78, 2005.
- SCHWEEN, G.; SCHWENKEL, H. Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula* ssp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.72 p. 53–61, 2003.
- SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. **Energy & Fuels**, v.18, p.154-159, 2004.
- SINGH, A.; REDDY, R. M.; CHIKARA, J.; SINGH, S. A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* - A biodiesel plant. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 209–213, 2010.
- SOUZA, A. V.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V, CORRÊA, R. M. CASTRO, E. M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. Edição Especial, p.1532-1538, dez., 2003.
- STICKLEN, M. B.; ORABY, H. F. Invited review: shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**. v. 41 p.187–200, 2005.
- SUGLA, T.; PURKAYASTHA, J. SINGH, S. K.; SOLLETI, S. K.; SAHOO, L. Micropropagation of *Pongamia pinnata* through enhanced axillary branching. . **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**. v. 43 p.409–414, 2007.
- SUJATHA, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulation*, v.47, p.83-90, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 3ª ed., 2006. 720 p.
- TAMALAMPUNDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilised-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochem. Eng.**, J. 39: 185-189. 2008

TAVARES, L. F. S.; MAGALHÃES, A. M.; PETERS, J. A. Organogênese indireta de explantes de arroz da região meristemática de ápices caulinares. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 10, n. 2, p. 203-207, 2004.

TIWARI, S.; TULI, R. Multiple shoot regeneration in seed-derived immature leaflet explants of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Scientia Horticulturae** v.121 p. 223–227, 2009.

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

VIANNA, V. F.; VEDOVATO, N. P. F.; TREVISOLI, H. U.; BIZARI, E.; DI MAURO, A. O. Estabelecimento de gemas apicais de pinhão manso em meio de cultura contendo BAP (6-benzilaminopurina). In: III Semana de Tecnologia do Curso de Biocombustíveis da Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal. **Suplemento...** Jaboticabal: FATEC-JB, 2010.

VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. In vitro multiplication and acclimation of **Vernonia condensata** Baker. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais** v.11 n.2 p.176-183, 2009.

VIDAL, A. M. Micropropagação e embriogênese somática em variedades cultivadas de mandioca. 2009 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

YUI, E.; CORREA, D. M.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. Micropropagação in vitro da macieira (*Malus domestica* Borkh) cultivar Golden Delicious. **Ciência e Prática**, Lavras, v.14, n.1, p.56-61, 1990.

ZIV, M.; ARIEL, T. On the relation between vitrification in stomatal cell wall deformity in carnation leaves *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 314, p. 121-129, 1991.